



(51) МПК

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12Q 1/6876 (2018.01)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2023.08); G01N 33/57415 (2023.08); C12Q 1/6806 (2023.08); C12Q 1/6827 (2023.08); C12Q 1/686 (2023.08); C12Q 1/6876 (2023.08); C12Q 1/6886 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023118716, 14.07.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.07.2023Дата регистрации:
11.01.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.07.2023

(45) Опубликовано: 11.01.2024 Бюл. № 2

Адрес для переписки:

308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Лебедева Анна Сергеевна

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Павлова Надежда Витальевна (RU),
Елыкова Анна Владимировна (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: CN 105986024 A, 05.10.2016.ПАВЛОВА Н.В. и др. Особенности
ассоциаций полиморфных локусов генов
матриксных металлопротеиназ с различными
молекулярно-биологическими подтипами рака
молочной железы. Гинекология. 2022; 24(5):
393-398. ПАВЛОВА Н.В. и др. Роль
высокопенетрантных мутаций в генах BRCA1
и SNEK2 в характере ассоциаций
полиморфизма генов (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к клинической онкологии, медицинской генетике и молекулярной диагностике, и может быть использовано для прогнозирования риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы. Осуществляют выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ генетических полиморфизмов rs17576-rs3787268 гена MMR-9. При выявлении гаплотипа AA полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена

MMR-9 прогнозируют высокий риск развития тройного негативного подтипа рака молочной железы. Способ обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы у женщин русской национальности, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ, на основе данных о полиморфных локусах rs17576-rs3787268 гена MMR-9. 2 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

матриксных металлопротеиназ с раком молочной железы. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022; 8(2): 180-197.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/582 (2023.08); *G01N 33/57415* (2023.08); *C12Q 1/6806* (2023.08); *C12Q 1/6827* (2023.08); *C12Q 1/686* (2023.08); *C12Q 1/6876* (2023.08); *C12Q 1/6886* (2023.08)

(21)(22) Application: **2023118716, 14.07.2023**

(24) Effective date for property rights:
14.07.2023

Registration date:
11.01.2024

Priority:

(22) Date of filing: **14.07.2023**

(45) Date of publication: **11.01.2024** Bull. № 2

Mail address:

**308015, g.Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Lebedeva Anna Sergeevna**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Pavlova Nadezhda Vitalevna (RU),
Elykova Anna Vladimirovna (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD OF PREDICTING RISK OF DEVELOPING TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; clinical oncology; medical genetics; molecular diagnostics.

SUBSTANCE: invention can be used to predict the risk of developing triple-negative breast cancer in women of the Russian nationality. DNA is isolated from peripheral venous blood and genetic polymorphisms rs17576-rs3787268 of MMP-9 gene are analyzed. When identifying the AA haplotype of polymorphic loci rs17576-rs3787268 of MMP-9 gene, a high risk of

developing the triple-negative breast cancer is predicted.

EFFECT: method provides obtaining new criteria for assessment of the risk of development of triple-negative breast cancer in women of Russian nationality, natives of the Central Black Earth region of the Russian Federation, based on data on polymorphic loci rs17576-rs3787268-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 of MMP-9 gene.

1 cl, 2 dwg, 4 ex

**C1
7
2
5
7
1
1
8
2
8
1
1
2
5
7
R
U**

**R
U
2
8
1
1
2
5
7
C
1**

Изобретение относится к области медицины, в частности к клинической онкологии, медицинской генетике, молекулярной диагностике и может быть использовано для прогнозирования риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы.

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре онкопатологии у женщин во всем мире. Ежегодно в мире регистрируется более 1 млн случаев данной патологии, влекущей за собой летальный исход более чем 685 тыс. заболевших пациенток [Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J. Clin.* 2021. V.71. P. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.].

Тройной негативный рак молочной железы (ТН РМЖ) составляет от 10 до 20% всех опухолей молочной железы, это агрессивные опухоли, быстро дающие отдаленные метастазы, для них характерен плохой прогноз течения заболевания, однако некоторые больные показывают повышенный риск смерти в течение первых 5 лет, а другие выживают в течение более 10 лет после постановки диагноза. [Ващенко Л.Н., Карнаухов Н.С., Гудцкова Т.Н., Кварчия М.В. Сопоставление уровня экспрессии маркеров пролиферации ki-67 и циклина d1 в тройном негативном раке молочной железы с различным андрогеновым статусом // *Современные проблемы науки и образования.* – 2018. – № 4.].

Успехи лечения и прогноза РМЖ напрямую зависят от правильной и своевременной морфологической, иммуногистохимической, молекулярно-генетической диагностики данного заболевания [Ващенко Л.Н., Карнаухов Н.С., Гудцкова Т.Н., Кварчия М.В. Сопоставление уровня экспрессии маркеров пролиферации ki-67 и циклина d1 в тройном негативном раке молочной железы с различным андрогеновым статусом // *Современные проблемы науки и образования.* – 2018. – № 4.].

Ввиду отсутствия в клетках ТН РМЖ всех трех стандартных мишеней таргетной терапии (эстрогеновых рецепторов (ЭР), прогестероновых рецепторов (ПР) и HER2/neu-рецепторов), на сегодняшний день не существует специализированного лечения для этих опухолей, кроме терапии химиопрепаратами, действующими на все делящиеся клетки [Ващенко Л.Н., Кварчия М.В., Карнаухов Н.С., Гудцкова Т.Н. Циклин d1 как предиктор и потенциальная мишень для терапии тройного негативного рака молочной железы // *Современные проблемы науки и образования.* – 2019. – № 3.].

За последние годы опубликовано множество работ, авторы которых доказывают, что ТН РМЖ является гетерогенным типом, в который входит от 3 до 5 подтипов. Однако критерии выделения этих подтипов крайне противоречивы [Ващенко Л.Н., Карнаухов Н.С., Гудцкова Т.Н., Кварчия М.В. Сопоставление уровня экспрессии маркеров пролиферации ki-67 и циклина d1 в тройном негативном раке молочной железы с различным андрогеновым статусом // *Современные проблемы науки и образования.* – 2018. – № 4.].

Ключевую роль в канцерогенезе играет микроокружение опухоли: экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ), стромальные клетки (эндотелиальные и иммунные), фибробласты и адипоциты. Основными ферментами, регулирующими состояние ЭЦМ, являются матриксные металлопротеиназы (MMPs) и их тканевые ингибиторы (TIMP) [Zajkowska M, Gacuta E, Kozłowska S, Lubowicka E, Głażewska EK, Chrostek L, Szmítkowski M, Pawłowski P, Zbucka-Krętowska M, Ławicki S. Diagnostic power of VEGF, MMP-9 and TIMP-1 in patients with breast cancer. A multivariate statistical analysis with ROC curve. *Adv Med Sci.* 2019 Mar;64(1):1-8. doi: 10.1016/j.advms.2018.07.002. Epub 2018 Sep 15. PMID: 30227310.].

Проведённые зарубежные исследования показали значимую роль MMPs в

канцерогенезе при РМЖ [Association of matrix metalloproteinases 3 and 9 single nucleotide polymorphisms with breast cancer risk: A case control study / F.A. Ibrahim, S.E. Elfeky, M. Haroun [et al.] // *Mol Clin Oncol.*-2020.-N.13.-P.54-62.; Kaczorowska, A. Selected Matrix Metalloproteinases (MMP-2, MMP-7) and Their Inhibitor (TIMP-2) in Adult and Pediatric Cancer / A. Kaczorowska, N. Miękus, J. Stefanowicz [et al.] // *Diagnostics (Basel).*-2020.-V.10.-N.8.-P.547. doi: 10.3390/diagnostics10080547]. Показано, что дисбаланс матриксных металлопротеиназ вызывает повреждение ДНК и нестабильность генома, при этом MMPs формируют опухолевое микроокружение, открывая пути для ангиогенеза, а также воздействуя на фибробласты стромы и адипоциты, формируя условия для эпителиально-мезенхимального перехода [Candido S., Abrams S.L., Steelman L.S., Lertpiriyapong K., Fitzgerald T.L., Martelli A.M., Cocco L., Montalto G., Cervello M., Polesel J., et al. Roles of ngal and MMP-9 in the tumor microenvironment and sensitivity to targeted therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1863:438–448.].

Семейство MMPs (матриксинов) представляет собой пул эндопептидаз, содержащих ионы Zn^{2+} и Ca^{2+} в своих активных сайтах. Наиболее значимые представители из них это коллагеназы, не обладающие специфичностью (например, MMP 1,8,13), желатиназы, или специфические коллагеназы коллагена 4-го типа (MMP 2 и 9), стромелизины (например, MMP 3 и 10), матрилизины (MMP 7, MMP 26) и особый тип MMP – мембранный (MMP 14, 15,16, 24) [Conlon GA, Murray GI. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol.* 2019 Apr;247(5):629-640. doi: 10.1002/path.5225. Epub 2019 Feb 15. PMID: 30582157.].

В отдельных исследованиях показаны ассоциации с развитием РМЖ полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ. Однако, следует отметить, что подавляющее большинство этих исследований выполнено зарубежными учеными, тогда как в Российской Федерации подобные исследования единичны. Также, следует отметить, что полученные в разных популяциях результаты нередко отличаются между собой, что может быть обусловлено как этиопатогенетическими особенностями возникновения и течения РМЖ у индивидуумов из различных этнотерриториальных групп народонаселения, так и разным дизайном исследований.

Одной из важных задач современной онкологии является изучение причин и механизмов развития рака молочной железы, среди которых значимую роль играют генетические факторы.

В Российской Федерации исследования вовлеченности гена MMP-9 в формирование предрасположенности к тройному негативному подтипу рака молочной железы единичны и фрагментарны, а данные о роли генетических вариантов rs17576-rs3787268 гена MMP-9 в развитии тройного негативного подтипа рака молочной железы отсутствуют.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2022 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров гена MMP-9. Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы на основе данных о полиморфных локусах rs17576-rs3787268 гена MMP-9.

Известен патент RU №2741232 (опубл. 22.01.2022) Способ прогнозирования

прогрессирования рака молочной железы, включающий определение в периферической крови промежуточного метаболита витамина D 25(OH)D. При значении его содержания в сыворотке крови $\leq 18,9$ нг/мл прогнозируют прогрессирование заболевания. Способ обеспечивает повышение точности прогнозирования прогрессирования рака молочной железы за счет определения промежуточного метаболита витамина D 25(OH)D в венозной крови, проявляющееся в снижении показателя промежуточного метаболита витамина D 25(OH)D, предшествующем прогрессированию заболевания. Недостатком этого способа является трудоемкость выполнения и кроме того не учитывается роль генетических полиморфизмов.

Известен патент RU №2336822 (опубл. 27.08.2008) Способ прогнозирования прогрессирования рака молочной железы, включающий исследование крови пациента. Дополнительно при обследовании определяют показатели: возраст, социальный статус, сопутствующие заболевания, количество моноцитов крови, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), общий билирубин крови, креатинин крови, удельный вес мочи, реакцию мочи. Затем определяют прогностический коэффициент (ПК) для каждого показателя. В системе возраст при маркере до 20 лет устанавливают ПК равным (0), при маркере 20-29 лет - равным (-10), при маркере 30-39 лет - равным (-7), при маркере 40-49 лет - равным (+4), при маркере 50-59 лет - равным (+3), при маркере 60-69 лет - равным (+2), при маркере 70-79 лет - равным (+4), при маркере 80 и более лет - равным (-3). В системе социальный статус при маркере рабочие устанавливают ПК равным (+4), при маркере служащие - равным (-1), при маркере учащиеся - равным (0), при маркере безработные - равным (-12), при маркере пенсионеры и инвалиды труда (ИТР) - равным (+1). В системе сопутствующие заболевания при маркере заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) устанавливают ПК равным (-10), при маркере заболевания сердечно-сосудистой системы - равным (+2), при маркере заболевания эндокринной системы - равным (+1,5), при маркере заболевания дыхательной системы - равным (0), при маркере заболевания опорно-двигательного аппарата - равным (0), при маркере заболевания мочеполовой системы - равным (-13), при маркере сочетание сопутствующий заболеваний - равным (-1), при маркере отсутствие сопутствующих заболеваний - равным (+2). В системе моноциты крови при маркере нет устанавливают ПК равным (0), при маркере 1-3% - равным (-2,5), при маркере 4-6% - равным (+2), при маркере 7-10% - равным (+2,5), при маркере более 10% - равным (0). В системе скорость оседания эритроцитов при маркере - 1-10 мм/ч устанавливают ПК равным (-1), при маркере 11-20 мм/ч - равным (-3), при маркере 21-30 мм/ч - равным (+7), при маркере 31-40 мм/ч - равным (0), при маркере более 40 мм/ч - равным (0). В системе общий билирубин при маркере менее 8,8 мкмоль/л устанавливают ПК равным (0), при маркере 8,8-17 мкмоль/л - равным (-1), при маркере более 17 мкмоль/л - равным (+5,5). В системе креатинин при маркере менее 0,07 ммоль/л устанавливают ПК равным (+11), при маркере 0,07-0,17 - равным (-3), при маркере более 0,17 мкмоль/л - равным (0). В системе удельный вес мочи при маркере менее 1008 устанавливают ПК равным (0), при маркере 1008-1026 - равным (+2), при маркере более 1026 - равным (+6). В системе реакция мочи при маркере кислая, устанавливают ПК равным (+3), при маркере нейтральная - равным (-3), при маркере щелочная - равным (-12). При сумме ПК от (-54,5) до (-21,5) прогнозируют низкую вероятность рака молочной железы, при сумме от (+11) до (+44,5) прогнозируют высокую вероятность рака молочной железы. Однако прогнозирование таким способом рака молочной железы сопряжено с профилактическими осмотрами, при этом диспансеризация лиц из групп повышенного риска должна проводиться длительное время вплоть до возраста 55 лет.

Известен патент RU № 2263319 (опубл. 27.10.2005) Способ доклинической диагностики рецидива рака молочной железы, включающий биохимическое исследование биологической жидкости пациента, отличающийся тем, что у менопаузальных женщин после комплексного лечения рака молочной железы в динамике определяют концентрацию эстриола, эстрона и эстрадиола в моче, вычисляют соотношение эстриола к эстрону и эстрадиолу и при значении его $1,68 \pm 0,23$ констатируют отсутствие рецидива, а при его снижении до значений $0,74 \pm 0,12$ у пациенток, проживающих без рецидива менее 1 года, до $0,65 \pm 0,13$ у пациенток, проживших без рецидива от 2 до 6 лет, и до $0,50 \pm 0,10$ у пациенток, проживших без рецидива от 6 до 10 лет, констатируют развитие рецидива. Недостатком данного способа является высокая стоимость анализа, что особенно важно при его многократном повторении в ходе наблюдения за больными после комплексного лечения.

Патент RU № 2522501 (опубл. 20.07.2014), в котором описан способ прогнозирования наследственной предрасположенности к раку молочной железы. Сущность способа заключается в том, что проводят амплификацию коротких фрагментов гена BLM протяженностью до 200 п.о., с последующим высокоразрешающим плавлением, включающим оптимизированный для гена BLM этап формирования гетеродуплексов: быстрый нагрев до 95°C и медленное снижение температуры до 50°C ; выбирают один фрагмент с aberrантным профилем плавления для секвенирования, секвенируют выбранный фрагмент и при выявлении мутации гена BLM прогнозируют наследственную предрасположенность к раку молочной железы. Недостатком этого способа является его трудоемкость, он не учитывает роль генетических полиморфизмов.

Известен патент RU № 2204836 (опубл. 20.05.2003) Способ прогнозирования генерализации рака молочной железы В данном способе проводят диагностическое наблюдение больных раком молочной железы. Определяют тромбоцитарную активность MAO-B в плазме крови, что обеспечивает доклиническое выявление генерализации рака молочной железы. При снижении тромбоцитарной активности MAO-B в 4-6 раз по отношению к норме прогнозируют генерализацию процесса. Недостатком предлагаемого способа является использование в качестве маркера только одного показателя - тромбоцитарной активности MAO-B в плазме крови, применение способа в отношении уже больных раком молочной железы, преимущественная информативность предлагаемого показателя тромбоцитарной активности MAO-B в период генерализации процесса при наличии отдаленных метастазов, что делает невозможным применение способа в ранней диагностике рака молочной железы.

Патент RU № 2631940 (опубл. 28.09.2017), в котором описан способ прогнозирования рака молочной железы. Сущность способа заключается в том, что определяют факторы риска: ношение тугого бюстгальтера (Б), возраст (В), перенесенные воспалительные заболевания молочной железы (ЗМЖ), перенесенные заболевания щитовидной железы (ЗЩЖ), индекс массы тела (ИМТ), частое употребление жирной, жареной и копченой пищи (Калл), некормление ребенка грудью (НКГ), кормление ребенка грудью год и более ($\text{КГ} \geq 1$ год), позднее наступление менструации (ПНМ), длительное проживание в военных городках (ПВО), перенесенные травмы молочной железы (ТМЖ). Отсутствие каждого из указанных факторов оценивают как «0 баллов», а наличие - «1 балл». Показатели ПНМ, В, ИМТ оценивают количественно. Рассчитывают прогностический коэффициент ПК по заявленной формуле. Если значение ПК меньше 0,2197, то прогнозируют низкий риск, а если ПК от 0,2197 и более - высокий риск рака молочной железы. Недостатком способа является сложность расчетов и не учитываются генетические факторы.

Прогнозирование риска рака молочной железы на основе естественных исследований // Зиннатуллина Г.Ф., Бермишева М.А., Кононова В.А., Фарахтдинова А.Р., Хуснутдинова Э.К. // Креативная хирургия и онкология. 2009. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/prognozirovanie-vozniknoveniya-riska-raka-molochnoy-zhelezy-na-osnove-geneticheskikh-issledovaniy> (дата обращения: 24.07.2022), характеризуется проведением анализа распространенности двух вариантов гена NBN (с.657del5 и р.R215W) у больных раком молочной железы в Республике Башкортостан и Ханты-Мансийском автономном округе. Недостатком данного исследования является применение только для коренных жителей Республики Башкортостан и Ханты-Мансийского автономного округа.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы на основе данных о полиморфных локусах rs17576-rs3787268 гена MMP-9.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы у женщин русской национальности, уроженок Центрально – Черноземного региона РФ, на основе данных о полиморфных локусах rs17576-rs3787268 гена MMP-9, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9;
- прогнозирование высокого риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы при выявлении гаплотипа AA полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития тройного негативного подтипа рака молочной железы у пациенток на основе данных о гаплотипе AA полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9.

Способ осуществляют следующим образом:

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции (Miller, S. A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells / S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky // Nucleic Acids. Res. – 1988. – Vol. 16, № 3. – P. 1215) в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об./мин. в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об./мин. в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. После лиофилизации полученную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -200С.

Анализ полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9 осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере CFX-96 Real-Time System (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов (синтезированы в ООО «Тест - Ген» (Ульяновск)).

Амплификация геномной ДНК производилась в реакционной смеси, суммарным объемом 10 мкл, включающей смесь для ПЦР ММР-9 – 4 мкл, Taq-полимеразу - 2 мкл, исследуемый образец (~30 нг ДНК/мкл) - 1 мкл, деионизированная вода – 3мкл.

Генотипирование исследуемых образцов осуществлялось с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) (фиг. 1, фиг. 2).

Изобретение характеризуется фигурами:

Фиг. 1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs17576 ММР-9 (● - AA, ■ - GG, ▲ - AG, ■ - отриц. контр.).

Фиг. 2. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs3787268 ММР-9 (● - AA, ■ - GG, ▲ - GA, ■ - отриц. контр.).

Определение частот гаплотипов и анализ ассоциаций гаплотипов с развитием РМЖ проводилось с помощью логистического регрессионного анализа в программе PLINK v. 2.050 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>). При необходимости в исследование включали ковариаты (возраст, индекс массы тела). После проведения пермутационного теста (выполнялось 1000 пермутаций) за статистически значимый уровень принимали $p < 0,05$.

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития РМЖ подтверждает анализ результатов наблюдений 854 пациенток, из них 108 больные с раком молочной железы тройного негативного подтипа и 746 женщин контрольной группы. Средний возраст больных составил $54,74 \pm 12,73$ лет (варьировал от 25 до 84 лет). Возрастные характеристики больных и контроля были сопоставимы. В выборки для исследования включались (критерии включения): 1) пациентки русской национальности, являющиеся уроженками Центрального Черноземья РФ, не имеющие родства между собой и проживающие в Белгородской области (Чурносов М.И., Сорокина И.Н., Балановская Е.В. Генофонд населения Белгородской области. Динамика индекса эндогамии в районных популяциях // Генетика. 2008. Т. 44. № 8. С. 1117-1125), добровольно согласившиеся на проведение исследования; 2) в группу больных включались пациентки только после установления диагноза заболевания РМЖ, подтвержденного с помощью клинических и лабораторно-инструментальных, в т.ч. морфологических методов обследования.

Обследование больных РМЖ проводилось на базе поликлинического и химиотерапевтического отделений Белгородского областного онкологического диспансера; формирование контрольной группы без клинико-анамнестических признаков РМЖ проводилось на базе перинатального центра БОКБ Святителя Иоасафа в ходе проф. осмотров.

Все больные РМЖ и женщины контрольной группы подписали информированное согласие на участие в исследовании, проведение исследования было согласовано с этическим комитетом медицинского института НИУ «БелГУ».

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось на кафедре медико-биологических дисциплин медицинского института НИУ «БелГУ».

При расчете частот гаплотипов и анализе их ассоциаций у пациенток установлена связь с формированием тройного негативного подтипа рака молочной железы гаплотипа AA полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена ММР-9. Гаплотип AA полиморфных

локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9 является фактором риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы (OR=2,58).

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование русских женщин, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ и не являющихся родственницами между собой: проведено генетическое исследование по полиморфным локусам rs17576-rs3787268 гена MMP-9.

У пациентки Л. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип AG полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9, что позволило отнести пациентку в группу женщин с низким риском развития РМЖ. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы у пациентки Л. не подтвердился.

У пациентки Д. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип AA полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9, что позволило отнести пациента в группу пациенток с повышенным риском развития РМЖ. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз рака молочной железы у пациентки Д.

У пациентки В. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип GG полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9, что позволило отнести пациентку в группу больных с пониженным риском развития тройного негативного подтипа рака молочной железы. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз рака молочной железы у пациентки.

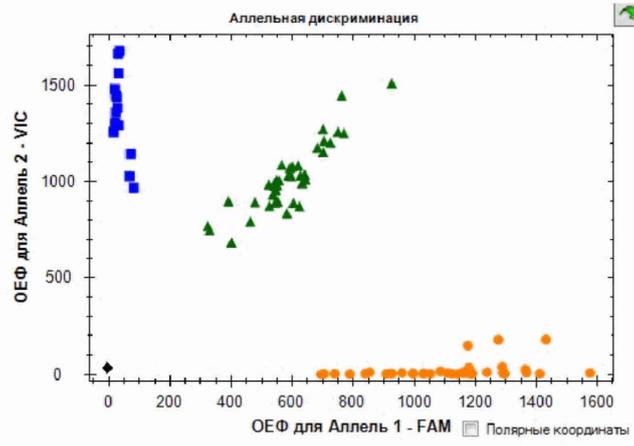
У пациентки П. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип AA полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9, что позволило отнести пациентку в группу индивидуумов с повышенным риском развития тройного негативного подтипа рака молочной железы. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы у пациентки П. подтвердился.

Применение данного способа позволит на доклиническом этапе формировать среди пациенток группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития тройного негативного подтипа рака молочной железы.

(57) Формула изобретения

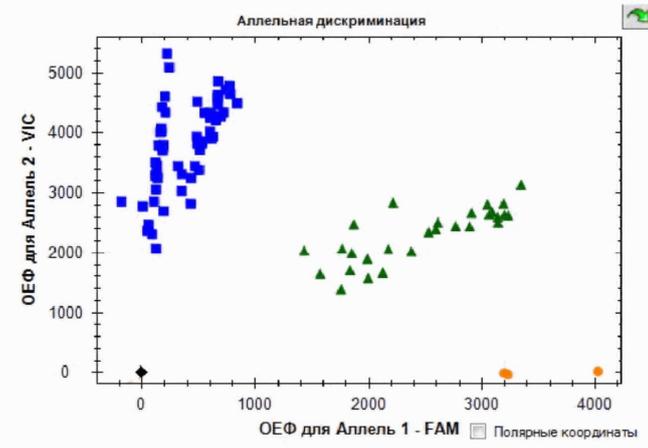
Способ прогнозирования риска развития тройного негативного подтипа рака молочной железы, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генетических полиморфизмов rs17576-rs3787268 гена MMP-9, высокий риск развития тройного негативного подтипа рака молочной железы прогнозируют при выявлении гаплотипа AA полиморфных локусов rs17576-rs3787268 гена MMP-9.

1



Фигура 1

2



Фигура 2