



(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 33/58 (2023.02); *G01N 33/57415* (2023.02); *C12Q 1/6806* (2023.02); *C12Q 1/6827* (2023.02); *C12Q 1/686* (2023.02); *C12Q 1/6876* (2023.02); *C12Q 1/6886* (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2023102767, 07.02.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.02.2023Дата регистрации:
11.05.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.02.2023

(45) Опубликовано: 11.05.2023 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Шевцова Ирина Владимировна

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
 Павлова Надежда Витальевна (RU),
 Елыкова Анна Владимировна (RU),
 Пономаренко Ирина Васильевна (RU),
 Чурносова Мария Михайловна (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: RU 2745424 C1, 25.03.2021. WO
 2013151413 A1, 10.10.2013. CN 101346629 A,
 14.01.2009. ПАВЛОВА Н.В. и др. Роль
 высокопенетрантных мутаций в генах BRCA1
 и SNEK2 в характере ассоциаций
 полиморфизма генов матриксных
 металлопротеиназ с раком молочной железы.
 Научные результаты биомедицинских
 исследований. 2022; 8 (2): 180-197. Принята к
 печати 2 марта (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития рака молочной железы у женщин без ожирения

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к клинической онкологии, медицинской генетике, молекулярной диагностике, и может быть использовано для прогнозирования риска развития рака молочной железы (РМЖ) у женщин без ожирения русской национальности. Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ полиморфных локусов гена MMP-9. При выявлении гаплотипа ССА

полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена MMP-9 прогнозируют высокий риск развития РМЖ у женщин без ожирения. Способ обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития РМЖ у женщин русской национальности, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ, на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576 гена MMP-9. 3 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

2022 г. DOFARA S.G. et al. Gene Polymorphisms and Circulating Levels of MMP-2 and MMP-9: A Review of Their Role in Breast Cancer Risk. Anticancer Research. 2020 Jul; 40 (7): 3619-3631.



(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 33/58 (2023.02); G01N 33/57415 (2023.02); C12Q 1/6806 (2023.02); C12Q 1/6827 (2023.02); C12Q 1/686 (2023.02); C12Q 1/6876 (2023.02); C12Q 1/6886 (2023.02)(21)(22) Application: **2023102767, 07.02.2023**(24) Effective date for property rights:
07.02.2023Registration date:
11.05.2023

Priority:

(22) Date of filing: **07.02.2023**(45) Date of publication: **11.05.2023** Bull. № 14

Mail address:

**308015, g.Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Shevtsova Irina Vladimirovna**

(72) Inventor(s):

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

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)****(54) METHOD FOR PREDICTION OF BREAST CANCER RISK DEVELOPMENT IN NON-OBESE WOMEN**

(57) Abstract:

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

SUBSTANCE: invention can be used to predict the risk of developing breast cancer in non-obese women of the Russian nationality. DNA from the peripheral venous blood is isolated. Polymorphic loci of MMP-9 gene are analyzed. When the CCA haplotype of polymorphic loci rs3918242-rs3918249-rs17576 of the MMP-9 gene is detected, a high risk of developing

breast cancer in non-obese women is predicted.

EFFECT: method provides obtaining new criteria for assessment of breast cancer risk developing in patients of Russian nationality, natives of the Central Black Earth region of the Russian Federation, based on data on polymorphic loci rs3918242-rs3918249-rs17576 of the MMP-9 gene.

1 cl, 3 dwg, 4 ex

Изобретение относится к области медицины, в частности, к клинической онкологии, медицинской генетике, молекулярной диагностике и может быть использовано для прогнозирования риска развития рака молочной железы у женщин без ожирения.

На сегодняшний день рак молочной железы (РМЖ) можно охарактеризовать как достаточно распространенную среди женского населения онкологическую патологию. В структуре онкологической заболеваемости в России РМЖ занимает первое место, составляя 20,8% от всех злокачественных опухолей. РМЖ является самой частой причиной смерти женщин с онкологическими заболеваниями, занимая 17,0% в структуре летальности. Средний возраст заболевших составляет 62 года, но вместе с тем отмечается тенденция к «омоложению» данной категории заболеваний, что и является одной из ключевых детерминант развития и совершенствования лечебно-диагностического процесса в сфере онкологии с непосредственной актуализацией данного заболевания: совершенствование и «переосмысление» уже существующих методов, разработка принципиально новых методик (хирургических и консервативных) [Пасечникова Е.А., Бодня В.Н., Кадомцев Д.В., Шаров Д.-М.А., Нибо К.Б., Георгиева А.Ю., Торосян О.Т., Тихонова Е.Н., Максимовских В.М., Азаркин Е.В., Занина Е.С. Роль интраоперационной лучевой терапии в комплексном лечении рака молочной железы: современное состояние проблемы // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 1.].

Согласно данным Cancer Research UK. Risk factors for breast cancer (2020) [Cancer Research UK. Risk factors for breast cancer. URL: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/risks-causes/risk-factors> (дата обращения: 02.07.2022).], выделяют более 20 факторов возникновения и развития РМЖ, большинство из которых включены в современные модели расчёта рисков изучаемого заболевания (Gail, Tyrer-Cusick, Rosner Colditz BCRA1, BCPR0, and BOADICEA) [Olsson HL and Olsson ML (2020) The Menstrual Cycle and Risk of Breast Cancer: A Review. Front. Oncol. 10:21. doi: 10.3389/fonc.2020.00021].

Эндогенный гормональный фон представляется доминирующим механизмом во взаимосвязи ожирения и риска РМЖ. В постменопаузе происходит снижение продукции гормонов в яичниках, активируется синтез эстрогенов в жировой ткани и печени при участии ароматазы. Таким образом, избыточное количество жировой ткани становится причиной гиперэстрогении и, соответственно, повышенного риска РМЖ. У молодых женщин в пременопаузе избыточная масса тела не является фактором риска РМЖ. В развитых странах лица, страдающие различными формами ожирения, составляют 20–30% от общего числа популяции, а 40–50% имеют избыточную массу тела. Согласно эпидемиологическим прогнозам, предполагается, что к 2025 г. ожирением будут страдать около 40% мужчин и 50% женщин. При ожирении у женщин происходит изменения функции гипоталамо-гипофизарной системы, нарушается гипоталамический контроль за продукцией фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов яичника. Эти нарушения приводят к аменорее, меноррагиям или удлинению менструального цикла – факторам риска РМЖ. Ожирение практически всегда сочетается с диабетом и артериальной гипертензией. Исследования показывают, что сочетание диабета и сердечных заболеваний увеличивает риск развития РМЖ в 2,2 раза [Федоров В.Э., Чебуркаева М.Ю. Распространенность и факторы риска рака молочной железы // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1-2. – С. 414-419].

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].

Семейство MMPs (матриксинов) представляет собой пул эндопептидаз, содержащих ионы Zn²⁺ и Ca²⁺ 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 РМЖ единичны и фрагментарны, а данные о роли генетических вариантов полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена MMP-9 в развитии РМЖ у женщин без ожирения 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 рака молочной железы у женщин без ожирения 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 РМЖ у женщин без ожирения на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576 гена MMP-9.

Известен патент RU №2741232 (опубл. 22.01.2022), в котором описан 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), в котором описан способ прогнозирования 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), в котором описан способ прогнозирования 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, эстрогена и эстрадиола в моче, вычисляют соотношение эстриола к эстрогену 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.

Известен 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 абберантным 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), в котором описан 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.

Известен 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 бюстгалтера (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 (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 РМЖ у женщин без ожирения на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития РМЖ русской национальности, уроженок Центрально – Черноземного региона РФ, на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9;
- прогнозирование высокого риска развития РМЖ у женщин без ожирения при выявлении гаплотипа ССА полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития РМЖ у женщин без ожирения на основе данных о гаплотипе ССА полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-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 Х-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-НСl (рН=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 (рН=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 rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-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)).

Аmplification 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, деионизованная 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, фиг. 3).

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 rs3918242 ММР-9 (● - ТТ, ■ - СС, ▲ - СТ, ■ - отриц. контр.).

5 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 rs3918249 ММР-9 (● - ТТ, ■ - СС, ▲ - ТС, ■ - отриц. контр.).

10 Фиг. 3. 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 (● - АА, ■ - GG, ▲ - AG, ■ - отриц. контр.).

15 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 $P_{perm} < 0,05$.

20 Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития РМЖ у женщин без ожирения подтверждает анализ результатов наблюдений 895 пациенток, из них 239 больные с раком молочной железы без ожирения и 556 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, М.И., не имеющие родства между собой и проживающие в Белгородской области (Чурносов 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.

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

35 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»).

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

45 При расчете частот гаплотипов и анализе их ассоциаций у пациенток установлена связь с формированием РМЖ у женщин без ожирения гаплотипа ССА полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9. Гаплотип ССА полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9 является фактором риска развития РМЖ у женщин без ожирения ($OR=2,99$).

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

локусам rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9.

У пациентки П. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип TCG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9, что позволило отнести пациентку в группу женщин с низким риском развития РМЖ без ожирения. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы у пациентки П. не подтвердился.

У пациентки О. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип ССА полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9, что позволило отнести пациента в группу пациенток с повышенным риском развития РМЖ без ожирения. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз рака молочной железы у пациентки О.

У пациентки К. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип TTG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9, что позволило отнести пациентку в группу больных с пониженным риском развития РМЖ без ожирения. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз рака молочной железы у пациентки.

У пациентки Ц. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип ССА полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9, что позволило отнести пациентку в группу индивидуумов с повышенным риском развития РМЖ без ожирения. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы у пациентки Ц. 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 РМЖ у женщин без ожирения.

(57) Формула изобретения

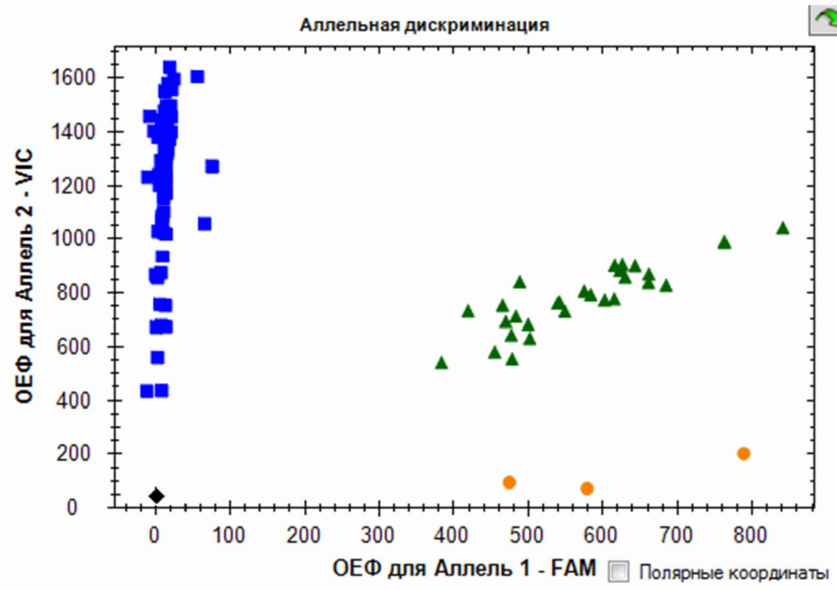
Способ прогнозирования риска развития рака молочной железы у женщин без ожирения русской национальности, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфных локусов гена ММР-9, отличающийся тем, что при выявлении гаплотипа ССА полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576 гена ММР-9 прогнозируют высокий риск развития рака молочной железы у женщин без ожирения.

35

40

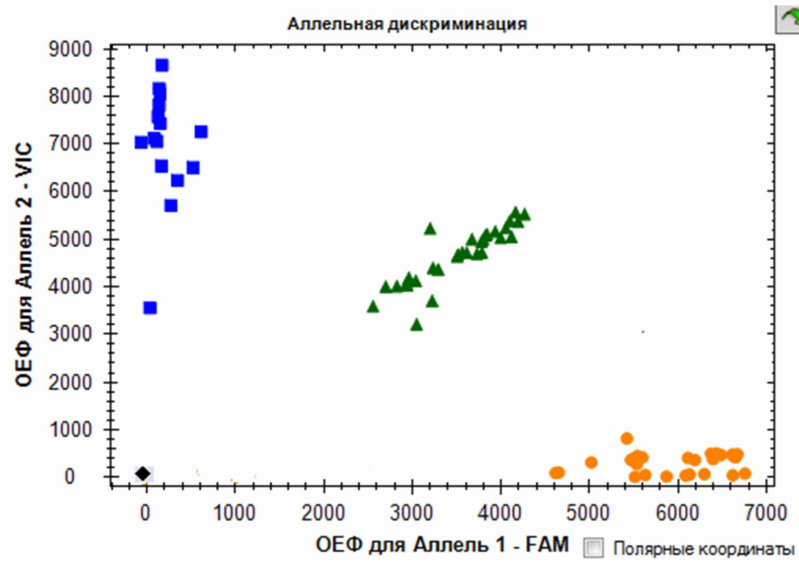
45

1

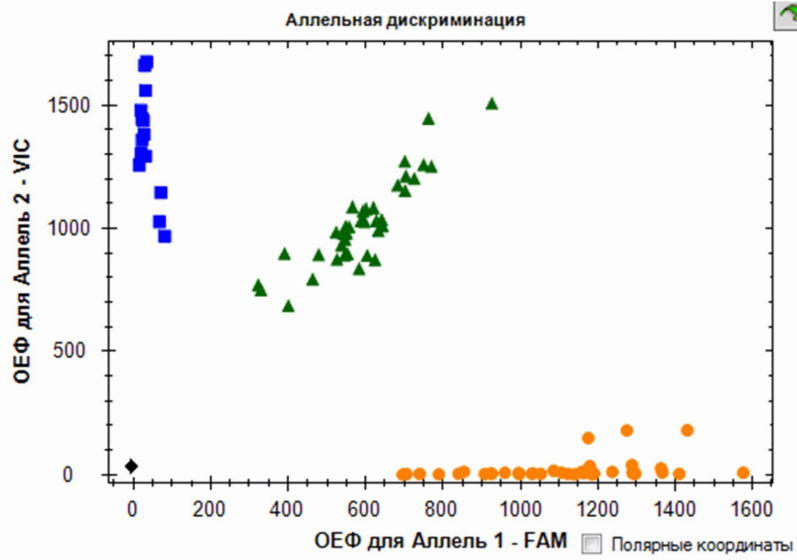


Фигура 1

2



Фигура 2



Фигура 3