



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
C12Q 1/68 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022126931, 17.10.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.10.2022

Дата регистрации:  
15.05.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.10.2022

(45) Опубликовано: 15.05.2023 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.  
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Шевцовой  
И.В.

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),  
Павлова Надежда Витальевна (RU),  
Елыкова Анна Владимировна (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: VICTOR ALVES DE OLIVEIRA et  
al., Association between matrix metalloproteinase-  
9 gene polymorphism and breast cancer in  
Brazilian women, Clinics (Sao Paulo). 2020; 75:  
e1762, Published online 2020 Oct 21.  
WIECZOREK E, et al., Genetic polymorphism  
of matrix metalloproteinases in breast cancer;  
Neoplasma, 2012;59(3):237-47, abstract.  
ЗИННАТУЛЛИНА (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития рака молочной железы у женщин с использованием молекулярно-генетических данных

(57) Реферат:

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 с использованием молекулярно-генетических данных. Предложен способ прогнозирования риска развития рака молочной железы у женщин. Выделяют ДНК из периферической венозной крови, производят анализ генетических маркеров гена ММР-9, прогнозируют высокий риск развития рака

молочной железы у женщин с использованием молекулярно-генетических данных при выявлении гаплотипа СТААС полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9 (OR=3,55, p=0,002). Изобретение позволяет оценить риск развития рака молочной железы у женщин русской национальности, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9. 5 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

Г.Ф. и др., Прогнозирование возникновения риска рака молочной железы на основе генетических исследований, Креативная хирургия и онкология. 2009, N 2, с. 61-62. RU 2522501, 20.07.2014.

R U 2 7 9 5 8 9 7 C 1

R U 2 7 9 5 8 9 7 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C12Q 1/68 (2023.02)*

(21)(22) Application: **2022126931, 17.10.2022**

(24) Effective date for property rights:  
**17.10.2022**

Registration date:  
**15.05.2023**

Priority:

(22) Date of filing: **17.10.2022**

(45) Date of publication: **15.05.2023** Bull. № 14

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Shevtsovoj I.V.**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),  
Pavlova Nadezhda Vitalevna (RU),  
Elykova Anna Vladimirovna (RU),  
Churnosova Mariya Mikhajlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU "BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTING THE RISK OF DEVELOPING BREAST CANCER IN WOMEN USING MOLECULAR GENETIC DATA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to clinical oncology, medical genetics, molecular diagnostics, and can be used to predict the risk of developing breast cancer in women using molecular genetic data. A method for predicting the risk of developing breast cancer in women is proposed. DNA is isolated from peripheral venous blood, genetic markers of the MMP-9 gene are analyzed, a high risk of developing breast cancer in women is predicted using molecular genetic

data when the CTAAC haplotype of polymorphic loci rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 of the MMP-9 gene is detected (OR=3.55, p=0.002).

EFFECT: invention makes it possible to assess the risk of developing breast cancer in Russian women, natives of the Central Black Earth region of the Russian Federation, based on data on the rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 polymorphic loci of the MMP-9 gene.

1 cl, 5 dwg, 4 ex

**RU 2 795 897 C1**

**RU 2 795 897 C1**

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 с использованием молекулярно-генетических данных.

5 Рак молочной железы (РМЖ) это опухоль молочной железы злокачественного характера, имеющая эпителиальное происхождение [Gradishar W.J., Anderson B.O., Blair S.L. et al. Breast cancer version 3.2014. J Natl Compr Canc Netw 2014;12(4):542–590]. Согласно данным мировой статистики (материалы Международного агентства по изучению рака) в настоящее время ежегодно среди населения мира выявляется более 2 миллионов  
10 новых случаев РМЖ. Среди всех случаев рака (ежегодно в мире регистрируется 19,3 млн новых случаев онкопатологии) РМЖ является наиболее частым (11,7%) [Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. Int. J. Cancer. 2021;149:778–789. doi: 10.1002/ijc.33588]. Среди женского населения удельный вес РМЖ среди всех онкозаболеваний составляет 24,5%  
15 [Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin. 2021;71:209–249. doi: 10.3322/caac.21660]. По данным Росстата в 2020 году в Российской Федерации количество женщин, у которых был впервые в жизни установлен диагноз РМЖ, составило 65,0 тысяч человек, а показатель  
20 заболеваемости был равен 82,8 на 100000 человек [Здравоохранение в России. 2021: Стат. сб./Росстат. - М., 3-46 2021. – 171 с.]. Обращает на себя внимание имеющаяся тенденция к росту заболеваемости РМЖ в РФ: стандартизованный показатель заболеваемости на 100000 населения (мировой стандарт) за последние десять лет вырос с 42,83 в 2008 г. до 51,63 в 2018 г., параметр среднегодового темпа прироста  
25 заболеваемости составил 1,97%, а показатель прироста заболеваемости за данный временной период - 22,15% [5. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году. М., 2019. 250 с. [Kaprin A.D., Starinskij V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2018. Moscow: 2019. 250 p. (in Russian)].

30 Несмотря на активное исследование генетических основ РМЖ, которое активно проводится многочисленными научными коллективами, в течение последних десятилетий, значительная часть генетических детерминант, вовлеченных в возникновение заболевания, до настоящего времени остается неизвестной, что диктует необходимость продолжения генетико-эпидемиологических исследований РМЖ.

35 Среди «потенциальных» генов-кандидатов РМЖ активно изучаются гены матриксных металлопротеиназ (ММП) [Dofara SG, Chang SL, Diorio C. Gene Polymorphisms and Circulating Levels of MMP-2 and MMP-9: A Review of Their Role in Breast Cancer Risk. Anticancer Res. 2020;40(7):3619-3631. doi:10.21873/anticancer.14351]. Связь продуктов экспрессии этих генов (одноименные белки) с заболеванием в настоящее время не  
40 вызывает сомнений. За счет своей коллагеназной активности, способности расщеплять проапоптотические факторы, мобилизовывать/активировать проангиогенные факторы (факторы роста), подавлять выработку ингибиторов ангиогенеза (ангиостатин, эндостатин) ММП обеспечивают деградацию компонентов стромальной соединительной ткани и базальной мембраны ММП, что имеет «ключевое» значение в процессах  
45 ангиогенеза, инвазии и метастазирования опухоли [Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. Front Biosci (Landmark Ed). 2015;20(7):1144-1163. Published 2015 Jun 1. doi:10.2741/4364]. Повышенная экспрессия ММП (ММП1, ММП2, ММП9, др.) в очаге поражения индуцирует рост опухолевой

ткани, инициирует ее инвазию и метастазирование [Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol*. 2002 Oct;55(5):300-4. doi: 10.1136/mp.55.5.300.]. Имеются убедительные данные о связи ММР с выживаемостью больных РМЖ [Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015;20(7):1144-1163. Published 2015 Jun 1. doi:10.2741/4364].

В мировой литературе представлено достаточно большое количество генетико-эпидемиологических исследований, более 50, посвященных изучению роли функционально значимого полиморфизма генов ММР в формировании РМЖ в различных этно-территориальных группах народонаселения. Однако, несмотря на это, полученные в результате проведенных исследований результаты, нередко неоднозначны, а для отдельных полиморфных локусов – противоречивы.

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 ММР-9 в формирование предрасположенности к РМЖ у женщин единичны и фрагментарны, а данные о роли генетических вариантов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9 в развитии РМЖ 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 на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров гена ММР-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 на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9.

Известен способ прогнозирования прогрессирования рака молочной железы по патенту RU №2741232 (опубл. 22.01.2022), 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 способ прогнозирования рака молочной железы по патенту RU №2336822 (опубл. 27.08.2008), 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 способ прогнозирования рецидива рака молочной железы по патенту RU №2263319 (опубл. 27.10.2005), 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 отношение 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  $95^{\circ}\text{C}$  и медленное снижение температуры до  $50^{\circ}\text{C}$ ; 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.

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

10 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.

15 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.

20 Задачей настоящего исследования является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития РМЖ у женщин на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена MMP-9.

25 Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития рака молочной железы у женщин русской национальности, уроженок Центрально – Черноземного региона РФ, на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена MMP-9, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;  
 - анализ полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9;

5 - прогнозирование высокого риска развития рака молочной железы у женщин при выявлении гаплотипа СТААС полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития рака молочной железы у пациенток на основе данных о гаплотипе СТААС полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-  
 10 rs3787268-rs2250889 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  
 15 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 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ 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  
 20 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10 мг/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  
 25 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 -20°C.

Анализ полиморфных маркеров rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9 осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на  
 30 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,  
 35 исследуемый образец (~30 нг ДНК/мкл) - 1 мкл, деионизованная вода – 3 мкл.

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, фиг. 4,  
 фиг. 5).

40 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.).

45 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.).



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 MMP-9 (● - AA, ■ - GG, ▲ - AG, ■ - отриц. контр.).

5 Фиг. 4 - 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 MMP-9 (● - AA, ■ - GG, ▲ - GA, ■ - отриц. контр.).

10 Фиг. 5 - 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 rs2250889 MMP-9 (● - CC, ■ - GG, ▲ -CG, ■ - отриц. контр.).

15 Определение частот гаплотипов и анализ ассоциаций гаплотипов с развитием РМЖ у женщин проводилось с помощью логистического регрессионного анализа в программе PLINK (версия 1.07) [Ponomarenko, I.V., Polonikov, A.V., Churnosov, M.I. Association of ESR2 RS4986938 polymorphism with the development of endometrial hyperplasia (2019) Akusherstvo i Ginekologiya (Russian Federation), 2019 (4), pp. 66-72]. При необходимости в исследование включали ковариаты (возраст, индекс массы тела). После проведения пермутационного теста (выполнялось 1000 пермутаций) за статистически значимый  
20 уровень принимали  $p_{perm} < 0,05$ .

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития РМЖ у женщин с использованием молекулярно-генетических данных подтверждает анализ результатов наблюдений 1104 пациенток, из них 358 больные с  
25 раком молочной железы 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  
30 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-  
35 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-anamnestических признаков РМЖ) проводилось на базе перинатального центра БОКБ Святителя Иоасафа в ходе профилактических осмотров.

40 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  
45 медико-биологических дисциплин медицинского института НИУ «БелГУ».

При расчете частот гаплотипов и анализе их ассоциаций у пациенток установлена связь с формированием РМЖ гаплотипа СТААС полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена MMP-9. Гаплотип СТААС полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена MMP-9 является фактором

риска развития РМЖ у женщин с использованием молекулярно-генетических данных (OR=3,55, p=0,002).

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 rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9.

У пациентки Л. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип СТАGG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9, что позволило отнести пациентку в группу женщин с низким риском развития РМЖ у женщин с использованием молекулярно-генетических данных. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы у пациентки Л. не подтвердился.

У пациентки Ш. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип СТААС полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9, что позволило отнести женщину в группу пациенток с повышенным риском развития РМЖ с использованием молекулярно-генетических данных. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз рака молочной железы у пациентки Ш.

У пациентки В. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип ТТАAG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9, что позволило отнести пациентку в группу больных с пониженным риском развития РМЖ с использованием молекулярно-генетических данных. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз рака молочной железы у пациентки.

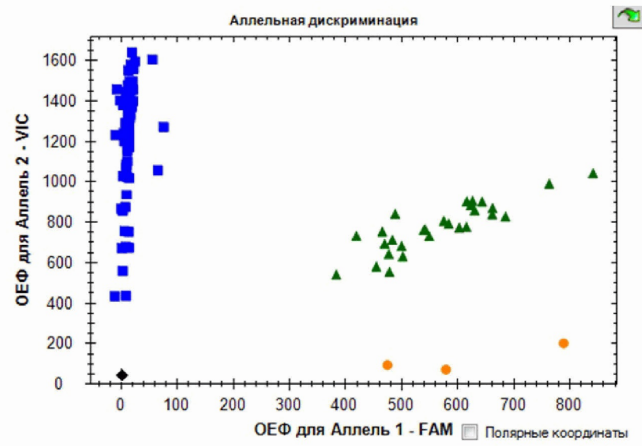
У пациентки С. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип СТААС полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9, что позволило отнести пациентку в группу индивидов с повышенным риском развития РМЖ. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы у пациентки С. 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 с использованием молекулярно-генетических данных.

#### (57) Формула изобретения

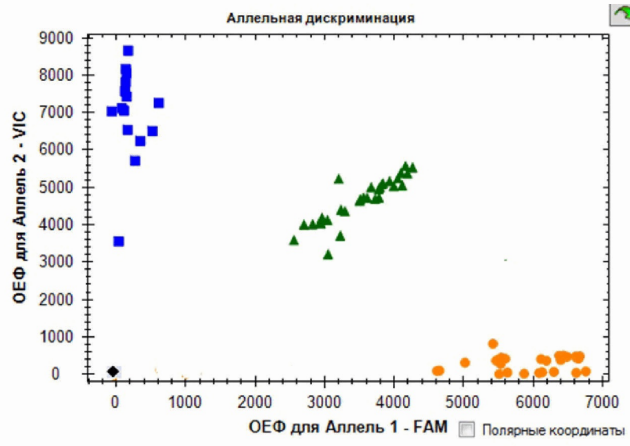
Способ прогнозирования риска развития рака молочной железы у женщин с использованием молекулярно-генетических данных, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генетических маркеров гена ММР-9, отличающийся тем, что высокий риск развития рака молочной железы у женщин с использованием молекулярно-генетических данных прогнозирует выявление гаплотипа СТААС полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 гена ММР-9.

1

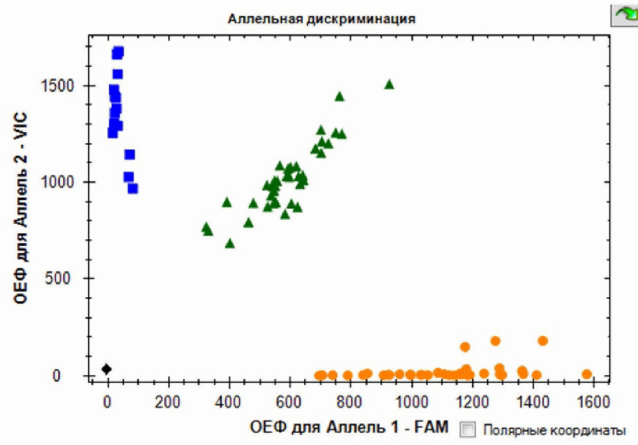


Фигура 1

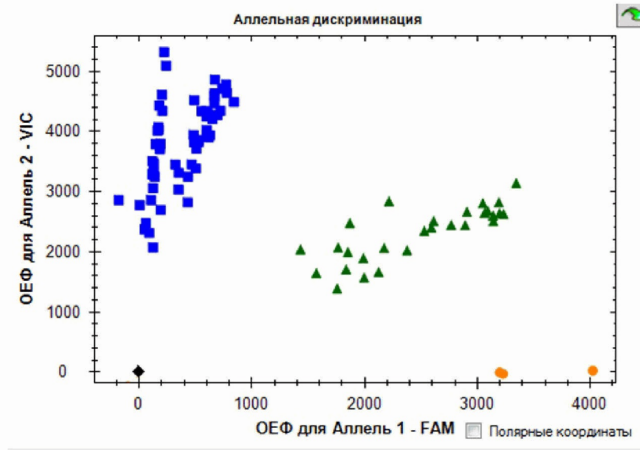
2



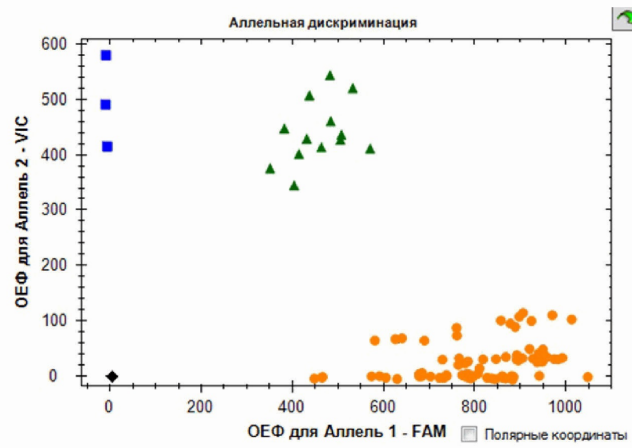
Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4.



Фигура 5.