



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК  
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 33/57415 (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: 2022126127, 06.10.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.10.2022Дата регистрации:  
28.04.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.10.2022

(45) Опубликовано: 28.04.2023 Бюл. № 13

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: RU 2617936 C2, 28.04.2017. 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 повышенного риска развития рака молочной железы 1-2 стадий у женщин на основе полиморфизма гена матриксной металлопротеиназы 9

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к клинической онкологии, медицинской генетике, молекулярной диагностике, и может быть использовано для прогнозирования повышенного риска развития рака молочной железы 1-2 стадий у женщин русской национальности на основе полиморфизма гена матриксной металлопротеиназы 9 (ММР-9). Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ полиморфизмов. При выявлении гаплотипа TCGGCG полиморфных локусов

rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена ММР-9 прогнозируют высокий риск развития рака молочной железы 1-2 стадий у женщин. Способ обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития рака молочной железы 1-2 стадий у женщин русской национальности, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ, на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена ММР-9. 6 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

2022 г. OLIVEIRA V.A. et al. Association between matrix metalloproteinase-9 gene polymorphism and breast cancer in Brazilian women. Clinics (Sao Paulo). 2020; 75: e1762. Published 2020 Oct 26.

R U 2 7 9 5 1 0 0 C 1

R U 2 7 9 5 1 0 0 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*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 33/57415* (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: **2022126127, 06.10.2022**

(24) Effective date for property rights:  
**06.10.2022**

Registration date:  
**28.04.2023**

Priority:

(22) Date of filing: **06.10.2022**

(45) Date of publication: **28.04.2023** Bull. № 13

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 PREDICTION OF INCREASED RISK OF DEVELOPING STAGE 1-2 BREAST CANCER IN WOMEN BASED ON POLYMORPHISM OF THE MATRIX METALLOPROTEINASE 9 GENE**

(57) Abstract:

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

SUBSTANCE: isolate DNA from the peripheral venous blood. Analyze polymorphisms. If TCGGCG haplotype of polymorphic loci rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 of the MMP-9 gene is detected, high risk of developing breast cancer of stages 1-2 in women is predicted.

EFFECT: method provides obtaining new criteria for assessment of breast cancer stage 1-2 risk development 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-rs3787268-rs2250889-rs17577 of the MMP-9 gene.

1 cl, 2 dwg, 6 ex

RU 2 795 100 C1

RU 2 795 100 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 1-2 стадий у женщин на основе полиморфизма гена матриксной металлопротеиназы 9.

5 Рак молочной железы (РМЖ) – злокачественная опухоль, исходящая из эпителия ткани молочной железы [Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. — 250 с. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Ed by Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. Moscow: MNIIOI im. P. A. Herzen, branch of FSBI «NMITS radiology» of the Ministry of health of Russia; 2018. 250 p. (In Russ).].

15 Исследования, посвящённые этиопатогенезу РМЖ, многочисленны, однако при этом не существует единой теории возникновения и развития заболевания. Реализация злокачественного фенотипа становится возможной благодаря взаимодействию различных генетических и эпигенетических нарушений, эндокринных стимулов, а также внешне-средовых воздействий в присутствии факторов риска [Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. Cancers (Basel). 2021 Aug 25;13(17):4287. doi: 10.3390/cancers13174287. PMID: 34503097; PMCID: PMC8428369.].

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 BCRA, BCPR, 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].

30 Большинство авторов считает, что вне зависимости от конечного фенотипа и рецепторного статуса злокачественное новообразование молочной железы, начальные этапы канцерогенеза ключевым образом зависят от действия эстрогенов и прогестерона. Очевидным фактором риска является женский пол, при этом заболеваемость раком грудной железы среди мужчин составляет менее 2% от общего количества заболевших [Hilton, Heidi N.; Clarke, Christine L.; Graham, J. Dinny (2017). Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. Molecular and Cellular Endocrinology, S0303720717304331–. doi:10.1016/j.mce.2017.08.011].

В виду того, что РМЖ является гетерогенным заболеванием, имеющим несколько патогенетических разновидностей, их биологическое поведение зависит от рецепторного статуса опухоли и активации определённых сигнальных путей различными стимулами [Имянитов Е.Н. Скрининг для лиц с наследственной предрасположенностью к раку / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология.- 2010.- т. 11, № 2.- С. 102-109.].

45 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, Głazewska EK, Chrostek L, Szmitkowski M, Pawłowski P, Zbucka-Krętońska 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<sup>2+</sup>- и Ca<sup>2+</sup> 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 1-2 стадий у женщин, среди которых значимую роль играют генетические факторы.

В Российской Федерации исследования вовлеченности гена MMP-9 в формирование предрасположенности к РМЖ 1-2 стадий у женщин единичны и фрагментарны, а данные о роли генетических вариантов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена MMP-9 в развитии РМЖ 1-2 стадий 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 1-2 стадий у женщин 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 1-2 стадий у женщин на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-

rs2250889-rs17577 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  $95^{\circ}\text{C}$  и медленное снижение температуры до  $50^{\circ}\text{C}$ ; выбирают один фрагмент с абберрантным 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 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 ( $\text{КГ} \geq 1$  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 способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития РМЖ 1-2 стадий у женщин на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена ММР-9.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития рака молочной железы 1-2 стадий у женщин русской национальности, уроженок Центрально – Черноземного региона РФ, на основе данных о полиморфных локусах rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена ММР-9, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена ММР-9;
- прогнозирование высокого риска развития рака молочной железы 1-2 стадий у женщин при выявлении гаплотипа TCGGCG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 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 TCGGCG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 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 MgCl<sub>2</sub>, 10мМ трис-НСl (рН=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°С, 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°С 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 -20°С.



Анализ полиморфных маркеров rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 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)).

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 – 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, фиг. 6).

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.).

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 ММР-9 (● - АА, ■ - GG, ▲ - AG, ■ - отриц. контр.).

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 ММР-9 (● - АА, ■ - GG, ▲ - GA, ■ - отриц. контр.).

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 ММР-9 (● - СС, ■ - GG, ▲ - CG, ■ - отриц. контр.).

Фиг. 6. 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 rs17577 ММР-9 (● - АА, ■ - GG, ▲ - GA, ■ - отриц. контр.).

Определение частот гаплотипов и анализ ассоциаций гаплотипов с развитием РМЖ 1-2 стадий 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 уровень принимали  $p_{perm} < 0,05$ .

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития РМЖ 1-2 стадий у женщин подтверждает анализ результатов наблюдений

1000 пациенток, из них 254 больные с раком молочной железы 1-2 стадий 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 (Чурносоев М.И., Сорокина И.Н., Балановская Е.В. Генетика 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 профилактических 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 РМЖ 1-2 стадий у женщин гаплотипа TCGGCG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена MMR-9. Гаплотип TCGGCG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена MMR-9 является фактором риска развития РМЖ 1-2 стадий у женщин ( $OR=4,17$ ).

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-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена MMR-9.

У пациентки П. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип CTAGCG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена MMR-9, что позволило отнести пациентку в группу женщин с низким риском развития РМЖ. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы 1-2 стадий у пациентки П. не подтвердился.

У пациентки О. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип TCGGCG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена MMR-9, что позволило отнести пациента в группу пациенток с повышенным риском развития РМЖ. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз рака молочной железы 1-2 стадий у пациентки О.

У пациентки М. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип TTGAGA полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена MMR-9, что позволило отнести пациентку в группу больных с пониженным риском развития РМЖ. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз рака молочной железы 1-2 стадий у пациентки.

У пациентки Ж. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров

был выявлен гаплотип TCGGCG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 гена ММР-9, что позволило отнести пациентку в группу индивидуумов с повышенным риском развития РМЖ. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы 1-2 стадий у пациентки Ж. подтвердился.

5 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 1-2 стадий у женщин.

10 (57) Формула изобретения

Способ прогнозирования повышенного риска развития рака молочной железы 1-2  
стадии у женщин русской национальности на основе полиморфизма гена матричной  
металлопротеиназы 9 (ММР-9), включающий выделение ДНК из периферической  
венозной крови, анализ полиморфизмов, отличающийся тем, что при выявлении  
15 гаплотипа TCGGCG полиморфных локусов rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268-  
rs2250889-rs17577 гена ММР-9 прогнозируют высокий риск развития рака молочной  
железы 1-2 стадий у женщин.

20

25

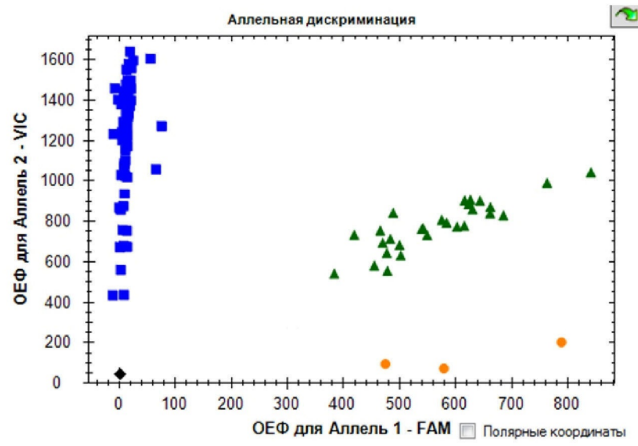
30

35

40

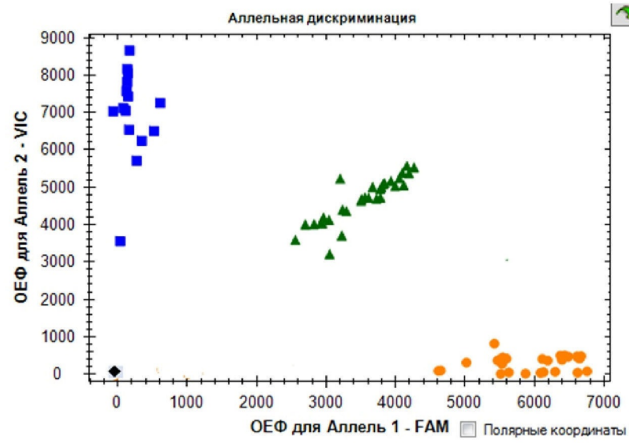
45

1

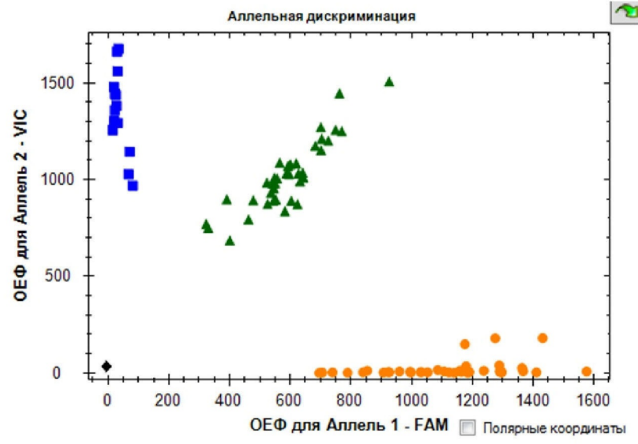


Фигура 1

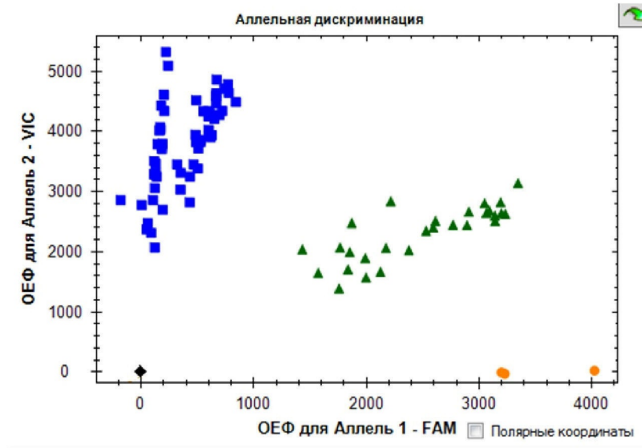
2



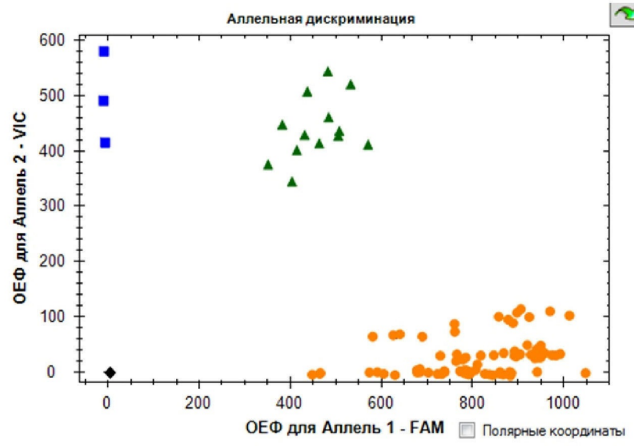
Фигура 2



Фигура 3

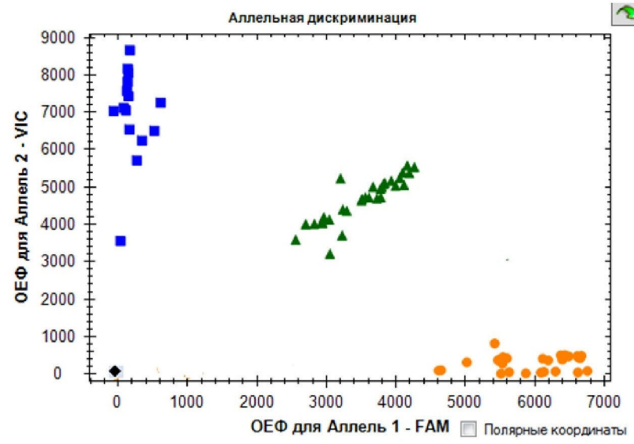


Фигура 4



Фигура 5





Фигура 6