

Міністерство охорони здоров'я України
Одеський національний медичний університет

На правах рукопису.

РОМАК РАЇСА ПЕТРІВНА

УДК 618.1-006:577.21

УДОСКОНАЛЕННЯ ДІАГНОСТИКИ ТА ПРОГНОЗУВАННЯ
ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ШЛЯХОМ
ОЦІНКИ СТАНУ МЕТИЛУВАННЯ ГЕНІВ *DKK4* ТА *GSR*

спеціальність 03.00.15 - генетика

Дисертація
на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Науковий керівник
академік НАМН України
Запорожан Валерій Миколайович.

Одеса – 2014

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	3
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1_СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	11
РОЗДІЛ 2_МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ:	33
2.1 Дизайн дослідження.	33
2.2 Клінічне дослідження.....	34
2.3 Лабораторні дослідження.	36
2.4 Інтраскопічні дослідження.	37
2.5 Патоморфологічне дослідження	42
2.6 Молекулярно-генетичні дослідження.....	44
2.7 Методи статистичної обробки.....	52
РОЗДІЛ 3_ЗАГАЛЬНА КЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА	57
РОЗДІЛ 4_ГЕННІ МЕРЕЖІ КООРДИНОВАНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ <i>DKK4</i> ТА <i>GSR</i> ПРИ ПУХЛИНАХ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ.....	71
РОЗДІЛ 5_ЧАСТОТА ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ <i>GSR</i> ТА <i>DKK4</i>	82
РОЗДІЛ 6_ЕПІГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ <i>DKK4</i> ТА <i>GSR</i> ПРИ ПУХЛИНАХ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ.....	90
РОЗДІЛ 7_ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	99
ВИСНОВКИ.....	118
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	120

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- АМГФ – α 2-мікроглобулін фертильності
- АОЗ – антиоксидантний захист
- ВШ – відношення шансів
- ГР - глутатіонредуктаза
- ДІ – довірчий інтервал
- ДДМЗ – доброякісна дисплазія молочної залози
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
- ДНМЗ – доброякісні новоутворення молочної залози
- ЗВР – зниження відносного ризику
- ГПМ – гіперпластичними процесами матки
- ДПМЗ – доброякісні пухлини молочної залози
- ІФА – імуноферментний аналіз
- ІЦХ – імуноцитохімія
- КД – коефіцієнт дисплазії
- КМЗ – кіста молочної залози
- ЛГ – лютеїнізуючий гормон
- МГ – мамографія
- МЗ – молочна залоза
- МРТ – магнітно-резонансна томографія
- ПАМГ – плацентарний α 1-мікроглобулін
- РМЗ – рак молочної залози
- Т3 – трийодтиронін
- Т4 – тироксин

ТТГ – тиреотропний гормон

УЗД – ультразвукове дослідження

ФКМ – фіброзно-кистозна мастопатія

ФСГ – фолікулостимулювальний гормон

ПРЛ –пролактин

ВСТУП

Актуальність теми. Проблема вдосконалення ранньої діагностики та прогнозування раку молочної залози (РМЗ) залишається однією з найбільш актуальних для сучасної онкологічної практики (Пащенко С. М., 2005; Савран В. В., 2005; Запорожан В. М. та ін., 2010; Domchek S. M. et al., 2010; Swain S. M. et al., 2010; Nalejska E. et al., 2014). Зважаючи на тісну кореляцію між загальною поширеністю новоутворень молочної залози та смертністю від РМЗ, ця проблема становить не лише суто фаховий інтерес, але також є медико-соціальним і соціально-економічним значущим явищем (de Кок М. et al., 2010).

Рак молочної залози в Україні, як і в більшості країн світу, є одним з найпоширеніших пухлинних процесів у жінок і посідає перше місце у структурі смертності від злоякісних новоутворень (25 % від усіх випадків раку у жінок). Кількість жінок, які захворіли на РМЗ в Україні, зросла в абсолютних цифрах з 14 171 у 1996 р. до 17 407 у 2011 р., а на 100 000 жіночого населення відповідно з 54,1 до 70,9. Кожні 35 хв виявляється новий випадок РМЗ і щогодини від даного захворювання вмирає одна жінка. Кожна жінка, яка захворіла на РМЗ, у середньому втрачає 17–18 років життя, що становить 53 % від усіх втрат жіночої популяції в Україні (Горовенко Н. Г., 2010; Воробйова Л. І., 2012; Ковальов О. О. та ін., 2013; Фіщук Л. Е., Горовенко Н. Г., 2013).

За статистичними даними Українського мамологічного центру при Інституті онкології НАМН України, Одеська область посідає перше місце за рівнем захворюваності й смертності від РМЗ серед жінок. Так, по Одеській області стандартизований показник смертності від РМЗ сягнув 90,3 випадку на

100 тис. жіночого населення (Національний канцер-реєстр, 2011).

Доброякісні новоутворення молочної залози, як правило, не становлять загрози малігнізації (Сінявіна Л. В., 2006). Втім, на етапі первинного контакту хворої із закладами охорони здоров'я або навіть під час надання кваліфікованої та спеціалізованої медичної допомоги фахівці нерідко стикаються з суттєвими труднощами у диференційній діагностиці доброякісних і злоякісних новоутворень молочної залози. За даними Bhargava R. et al. (2002), найчастіше труднощі при верифікації діагнозу доброякісних пухлин молочної залози виникають щодо таких нозологічних форм, як склерозивний аденоз, хвороба Мінца, склерозивні папілярні пухлини. З другого боку, дефекти діагностики на ранніх термінах захворювання та відсутність високоефективних методів прогнозування РМЗ призводять до суттєвих медико-соціальних втрат.

Сьогодні єдиним реальним шляхом успішного зниження смертності від РМЗ є поліпшення якості ранньої діагностики (Смоланка І. І. та ін., 2009; Давидов М. І., Аксель Є. М., 2011; Leenders M. W. et al., 2012). Цитологічне дослідження, вирізняючись простотою одержання матеріалу й специфікою картин різних патологічних процесів, широко використовується в діагностиці захворювань молочної залози і є повноцінним методом морфологічної верифікації діагнозу (Chen J. J. et al., 2013; Leenders M. W. et al., 2012). Однак даний метод має певні обмеження, які можуть залежати від способу одержання матеріалу, локалізації патологічного осередку, особливостей його гістологічної будови, а також кваліфікації лікаря-цитолога (O'Dowd A., 2012). Крім того, він не повною мірою придатний для визначення індивідуального прогнозу на ранніх термінах захворювання і не враховує стану епігенетичної регуляції функціонування генів, відповідальних за проліферативні процеси в епітелії молочної залози. Це стосується і сучасних моделей розрахунку індивідуального

ризикі виникнення РМЗ (Tian Y. et al., 2013).

Останнім часом все більшої популярності у світі набувають методи вивчення епігенетичних факторів схильності до онкологічних захворювань (Запорожан В. М. та ін., 2010; Горовенко Н. Г., 2010; Гнатейко О. З., 2007, 2009; Van L. et al., 2011; Wang A. et al., 2008). Не є виключенням й РМЗ. Так, у дослідженнях вітчизняних та іноземних фахівців переконливо доведено, що активація передачі сигналів у Wnt-клітинному шляху відіграє важливу роль в онкогенезі молочної залози за рахунок епігенетичної активації генів-антагоністів Wnt, у тому числі сімейства Dickkopf (*DKK*). Таким чином, метилування гена *DKK4* має важливе значення у розвитку РМЗ. Зважаючи на патогенетичну роль процесів детоксикації ксенобіотиків та перекисного стресу в онкогенезі молочної залози, значний інтерес становить епігенетична регуляція активності гена глутатіонредуктази (*GSR*). Проте до останнього часу подібних досліджень ані в Україні, ані за кордоном не проводилося.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом НДР «Сучасний стан діагностики та лікування захворювань репродуктивної системи та вдосконалення діагностично-лікувальних заходів із залученням сучасних технологій» (№ державної реєстрації 0107U011178) кафедри акушерства та гінекології № 1 Одеського національного медичного університету.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи є вдосконалення діагностики та прогнозування проліферативних захворювань молочної залози шляхом оцінки стану метилування генів *DKK4* та *GSR*.

Для розв'язання поставленої мети були визначені такі наукові **завдання**:

1. Провести ретроспективний аналіз факторів ризику проліферативних захворювань молочної залози.
2. Визначити генотип за поліморфними варіантами генів *DKK4* та *GSR*,

а також *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* і *FGFR2*, які найбільш пов'язані з ними, у пацієнток з проліферативними захворюваннями та раком молочної залози.

3. Дослідити рівень метилування генів *DKK4* та *GSR* у пацієнток з проліферативними захворюваннями молочної залози.

4. Визначити рівень метилування генів *DKK4* та *GSR* у пацієнток з раком молочної залози.

5. Розробити і впровадити алгоритм ранньої діагностики та прогнозування проліферативних захворювань на підставі генетичних та епігенетичних факторів ризику.

Об'єкт дослідження — рак молочної залози, доброякісні пухлини молочної залози.

Предмет дослідження — функціональні поліморфізми rs3763511 гена *DKK4* та rs8190924 гена *GSR* і метилування генів *DKK4* та *GSR* у зв'язку з ризиком розвитку раку молочної залози.

Методи дослідження — загальноклінічні, клініко-лабораторні (біохімічні, гормональні, імуноферментні, гістологічні, патоморфологічні, імуногістохімічні, молекулярно-генетичні), клініко-інструментальні (мамографія, ультразвукове дослідження (УЗД)), медико-статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше визначені епігенетичні маркери ризику РМЗ, а саме активність метилування генів *DKK4* та *GSR*. Вперше встановлено поширеність поліморфізмів rs3763511 гена *DKK4* та rs8190924 гена *GSR* серед жінок з доброякісними пухлинами молочної залози (ДПМЗ) і серед здорових жінок. Показано, що частота визначення поліморфізму ТТ (rs4973768) у гені *SLC4A7* у хворих на РМЗ зростає. Відношення шансів ризику розвитку РМЗ для цього гена становило 1,89 (ДІ 95 % 1,01–3,397; $p \leq 0,047$), відносний ризик — 1,7 ($p \leq 0,049$). Вперше доведено наявність клініко-генетичної асоціації аномального метилування генів *DKK4* та

GSR з клінічними проявами проліферативних захворювань молочної залози (ПЗМЗ).

Практичне значення одержаних результатів. Розроблений алгоритм ранньої діагностики та прогнозування РМЗ з включенням генетичних та епігенетичних тестів впроваджено у практику.

Результати дослідження використані в роботі спеціалізованих відділень Обласної клінічної лікарні (Одеса), Центру реконструктивної та відновної медицини (Університетська клініка), Міської клінічної лікарні № 9, жіночої консультації № 3 (Одеса) та у навчальному процесі кафедр акушерства та гінекології № 1 і № 2, хірургії № 1 та № 3 ОНМедУ. Форми впровадження підтверджено відповідними актами.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно виконані науковий пошук і робота з літературними джерелами, формулювання мети, завдань дослідження, планування та проведення тривалих контрольованих досліджень, здійснення загальноклінічних і функціональних методик обстеження, а також статистична обробка й інтерпретація отриманих результатів.

Апробація результатів дисертації. Результати та основні положення дисертаційної роботи доповідалися на IV науково-практичному семінарі студентів та молодих вчених, присвяченому Всесвітньому дню боротьби з раком (Київ, 2013), засіданнях філії Асоціації акушерів-гінекологів (Одеса, 2012–2014).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 10 наукових робіт, у тому числі 5 — у фахових виданнях, рекомендованих ДАК Міністерства освіти і науки України, 3 — у закордонному фаховому виданні та 1 тези. Одержано патент України на винахід. Опубліковано методичні рекомендації, затверджені МОЗ України

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Проліферативні захворювання молочної залози включають доброякісні дисплазії (ДДМЗ), а також РМЗ. За оцінками вітчизняних та іноземних фахівців, ДДМЗ виявляються у 40–92 % жінок [49, 50]. Розрізняють дифузну кістозну мастопатію, солітарні кісти молочної залози, фіброаденоз та фібросклероз молочної залози, ектазію проток молочної залози та інші патологічні стани, пов'язані з проліферацією залозистого епітелію молочної залози [51].

Етіологія ДДМЗ досі є неясною, але більшість дослідників вважають основним етіологічним фактором наявність дисгормональних порушень [14, 52–56]. Гіперпластичні процеси молочних залоз нерідко є безпосереднім наслідком ендокринної патології. Так при гіперплазії ендометрія у 74,4 % хворих розвиваються захворювання молочних залоз, а в цілому при нейроендокринних гінекологічних захворюваннях ця цифра становить 97,8 %. Переважна більшість хворих на ДДМЗ страждають на різні гінекологічні захворювання [57–61].

Епідеміологія ДДМЗ вивчена менше, ніж епідеміологія РМЗ [62–66]. Це пояснюється тим, що регулярний облік і статистичний аналіз доброякісних захворювань молочної залози відсутній, а відомості про поширеність цих захворювань можна одержати лише за результатами окремих спеціальних обстежень населення [14, 67, 68].

Проблема зв'язку ДДМЗ та ДНМЗ із РМЗ є однією з головних і, водночас найбільш суперечливих у профілактиці злоякісних новоутворень.

Незважаючи на те, що ДДМЗ не є обов'язковим передраком, клінічні спостереження свідчать, що у хворих на ДДМЗ рак даної локалізації розвивається у кілька разів частіше, ніж у здорових жінок, а при дисплазії з явищами проліферації – у 30 разів частіше [69–73].

З огляду на ймовірний патогенетичний зв'язок ДДМЗ і РМЗ, зниження захворюваності на мастопатію розглядається як реальний шлях до зменшення частоти розвитку РМЗ, однак такий підхід потребує розвитку відповідного діагностичного інструментарія [14, 69, 70, 74].

Триває пошук генів, які є відповідальними за незначні індивідуальні зміни, але значущість яких зростає в остаточній оцінці ризику розвитку раку за наявності спадкових змін. Ці гени можуть взаємодіяти з навколишнім середовищем і способом життя таким чином, що ризик розвитку раку не буде підвищений істотно у всіх членів популяції. Наприклад, у тих осіб, які піддаються впливу факторів даного зовнішнього середовища, але не мають генетичної схильності, або у носіїв генів, що не піддаються такому впливу, розвиток раку не обов'язковий [8, 9].

Фахівці з молекулярної епідеміології проводять дослідження біологічного обґрунтування асоціації «фактор-результат», використовуючи біологічні дослідження дії, внутрішньої дози, біологічно ефективної дози, раннього біологічного ефекту, зміни структури або функції, прогноз захворювання, інвазивну діагностику раку, метастазів. Таким чином, молекулярна епідеміологія може з'ясувати бракуючі дані щодо взаємодії зовнішніх факторів і виникнення або прогресу злоякісного захворювання. Вплив різних факторів навколишнього середовища детальніше описаний у відповідному розділі.

Оскільки суть молекулярної епідеміології полягає в ролі генетичної мінливості як фактора ризику і прогнозу захворювань, використання

біомаркерів у оцінці дії та ефекту є обов'язковим компонентом цієї дисципліни. Дослідження за допомогою таких біомаркерів, як ДНК, протеїнові та гемоглобінові аддукти, що вже виконані на сьогодні, визнані надзвичайно важливими. Зростає інтерес до молекулярних маркерів, таких як протеомні і метаболомні. Молекулярні маркери можуть допомогти в диференціюванні пухлин з різними підтипами гістологічної будови, прогнозувати відповідь на лікування, що проводиться, залежно від молекулярного підтипу пухлини або природженої зміни метаболізму лікарських препаратів.

Біомаркери, що використовують у дослідженнях молекулярної біології раку, можуть бути розділені на такі класи:

1. Маркери експозиції (наприклад, присутність онкогенного вірусу).
2. Маркери дози (кількість онкогенного вірусу).
3. Маркери внутрішньої дози (ДНК-аддукти – модифікації ДНК в результаті метилування тощо), які утворюються внаслідок метаболічної активації певних онкогенів, наприклад, афлатоксину).
4. Маркери біологічно ефективної дози (соматичні мутації білка p53, який може бути як самостійною причиною раку, так і частиною багатокомпонентної моделі канцерогенезу).
5. Маркери зміни структури/функції (хромосомна аберація).
6. Маркери схильності (метаболічний поліморфізм генів, що залучені до метаболізму або детоксикації канцерогенів).
7. Маркери підтипу раку (естрогенові і прогестеронові рецептори РМЗ).
8. Маркери прогнозу (метаболічний поліморфізм генів, що відповідають за лікарський метаболізм)

У дослідженнях, що ґрунтуються на аналізі біомаркерів, можлива поява похибки, яка може бути результатом відсутності зіставності груп, яких

включено в дослідження, хибного розподілу учасників або статусу дії. Похибка залежить також від валідності відтворюваності та стабільності маркерів. Причиною варіабельності біомаркерів може бути внутрішньоіндивідуальна мінливість. Це стосується маркерів, схильних до добових коливань, таких, наприклад, як рівень гормонів. Варіабельність маркера також може залежати від умов взяття матеріалу та похибок на етапі виконання лабораторних досліджень. Згідно з даними Vineis (1997), біомаркером, який схильний до змін на всіх вказаних етапах (внутрішньоорганізменій, взяття матеріалу, лабораторний аналіз) є цитологічне дослідження клітин шийки матки; кількісний аналіз ДНК аддуктів залежить від внутрішньоорганічних змін і лабораторного етапу, так само як і фенотипування метаболічного поліморфізму. Найбільш стабільними вважають такі біомаркери: генотипування метаболічного поліморфізму і вміст хлорорганічних сполук.

Розрізняють аналітичну і клінічну валідність біомаркера. Під аналітичною валідністю розуміють точність вимірюваного субстрату. Як і в інших галузях епідеміології, це передбачає оцінку таких характеристик, як чутливість і специфічність. Для постійно вимірюваних маркерів необхідні додаткові дослідження, які дозволяють встановити максимальну цінність прогнозування. Після встановлення аналітичної валідності встановлюють його клінічну валідність і специфічність для визначення клінічного і доклінічного етапів захворювання. Якщо біомаркер передбачають аналізувати як фактор ризику, його валідність спочатку встановлюють за допомогою стандартних епідеміологічних схем. Для використання як інструменту клінічної діагностики – оцінюють його клінічну цінність, тобто сукупність позитивних і негативних результатів, отриманих при його використанні.

Враховуючи всі аспекти, що впливають на остаточний результат, дуже важливим в молекулярній епідеміології є етап підготовки дослідження, строге ранжирування груп, валідація біомаркерів, визначення необхідного об'єму матеріалу для взяття, стандартизація зберігання біологічних зразків, методів статистичної оцінки й інтерпретації результатів. При чіткому дотриманні цих умов можливо максимально уникнути похибки в дослідженні.

Традиційне формулювання діагнозу раку ґрунтується на анатомічній локалізації та гістопатологічних ознаках. Протягом тривалого часу розглядалося припущення про те, що оскільки ці класифікації нехтують різномірністю серед пухлин схожих гістопатологічних типів, це, можливо, означає, що існують два або більше різних видів раку, який ми зараз сприймаємо за єдине захворювання [12]. Деякі дослідники оцінили, наскільки фактори ризику РМЗ, наприклад, відмінні за рівнем естрогену і станом рецепторів прогестерону пухлин [37,38]. У результаті цих досліджень було встановлено, що відмінності існують, хоч і потребують подальшого вивчення цього феномена. Наприклад, відносний ризик, пов'язаний з комбінованою гормональною терапією (естроген – гестаген) становить 1,67 % для пухлин з позитивними рецепторами естрогену і прогестерону порівняно з 1,21%, для пухлин з негативними рецепторами.

Розвиток методики визначення експресії генів за допомогою мікрочіпів, що містять тисячі генів, дозволив перетворити розуміння пухлин, які раніше уявлялися, як єдиний патологічний процес, у багатопараметрову патологію, що базується на зміні експресії генів. Для онкогематологічної патології, наприклад, дифузної В-клітинної лімфоми, експресії генів мають істотне прогностичне значення [50]. Подальша робота, що ґрунтується на масштабних дослідженнях, дозволила скоротити кількість генів, які входять

у дослідження. Наприклад, шість генів (*LMO2*, *BCL6*, *FNI*, *CCND2*, *SCYA3*, *BCL2*) було вибрано з великої кількості для визначення виживання при дифузній В-клітинній лімфомі в результаті аналізу експресії генів, визначуваної за допомогою мікрочіпів [39].

Перехід від методики мікрочіпів до визначення специфічної RNAs або протеїнів, які можуть бути виявлені при використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі або імуногістохімічним аналізом, дозволить вирішити питання про ефективність лікування, виходячи з молекулярного аналізу гістотипу пухлини, використовуючи методи, більш знайомі клінічним лабораторіям. Перспективою для молекулярної епідеміології є знання про підтипи пухлини, що дозволить сформувати дизайн дослідження і здійснити одночасний аналіз як факторів ризику, так і пухлинної класифікації з прогнозом результатів лікування.

РМЗ досі посідає перше місце у структурі захворюваності й смертності від злоякісних новоутворень – ця нозоформа зустрічається у кожному четвертому випадку злоякісних новоутворень у жінок. За останні 15 років поширеність РМЗ в Україні збільшилася майже на 25 %. Значним є внесок РМЗ й у структуру показників DALY та QALY [10–12].

За статистичними даними канцерреєстру Національного інституту раку України, Одеська область посідає одне з перших місць за рівнем захворюваності на РМЗ серед жінок [8, 13]. Так, по Одеській області стандартизований показник захворюваності на РМЗ в 2011 р. становив 76,3 випадків на 100 тис. жіночого населення.

Внаслідок численних епідеміологічних досліджень виявлено низку факторів ризику розвитку РМЗ. Серед цих факторів: ранній вік менархе (у США середній вік – 13 років, у Китаї –17 років), пізній вік менопаузи; пізні перші пологи (після 30 років); прийом пероральних контрацептивів, в

анамнезі операції на молочних залозах з приводу ДНМЗ; іонізуюче випромінювання [65].

Сьогодні не викликає сумніву, що сімейна історія РМЗ є одним з головних факторів ризику розвитку захворювання [50]. Даний факт свідчить про генетичну детермінанту туморогенезу молочної залози. Від 5 до 10 % випадків злоякісних новоутворень молочної залози представлені спадковими формами даної патології.

Нині у практику впроваджено безліч різних моно- і поліклональних антитіл, з допомогою яких виявляють експресію тих або інших білків, пов'язаних зі структурними компонентами клітини, продуктами клітинного синтезу (гормонів, ферментів, імуноглобулінів), рецепторами тощо. Втім, існуючі методи не можуть дати стовідсоткової гарантії ідентифікації патологічного процесу, схильного до малігнізації, сама по собі наявність патологічно обтяжених алелів генів або змінена картина генної експресії не є верифікуючим діагностичним тестом [139–148]. У зв'язку з цим особливого значення набуває вивчення клінічного перебігу, ефективності лікування, гормонального статусу та інших факторів прогнозу при ДДМЗ і ДНМЗ.

Багаторічний досвід використання чутливих і високоспецифічних біохімічних тестів у медичній практиці показав, що впровадження онкомаркерів у практику значно підвищує ефективність роботи онкологів [14, 28, 29, 34, 47, 65, 66, 76]. Однак досі не вдалося розробити жодного пухлиноспецифічного серологічного діагностикума, здатного детектувати тільки злоякісну пухлину даного гістологічного типу й виявляти її локалізацію на більш ранніх етапах розвитку. На думку деяких фахівців, до деякої міри підвищити ефективність діагностики можна, використовуючи сполучення різних онкомаркерів у процесі тестування.

Вважається, що пухлинні маркери в практичній онкології повинні відповідати кільком вимогам: бути селективно пов'язаними з пухлинним ростом; концентрація їх у сироватці крові або сечі повинна корелювати з розміром пухлини; виявлятися до клінічного прояву рецидивів. Досі не існує пухлинних маркерів, що повністю відповідають перерахованим вимогам. Діагностична значущість багатьох пухлинних маркерів, що характеризуються специфічністю й чутливістю, різна. Тільки деякі з великої кількості виявлених маркерів становлять практичний інтерес.

В онкологічній практиці маркери пухлинного росту поєднують у такі класи: імунологічні (асоційовані з пухлиною антигени або антитіла до них), гормони, у т. ч. ектопічні, ферменти (фосфатази, лактатдегідрогенази тощо), продукти обміну (креатин, гідроксипролін, поліаміни, вільна ДНК), білки плазми (феритин, церулоплазмін, мікроглобулін), білкові продукти деградації пухлин [76].

До найбільш перспективних варто зарахувати пухлиноспецифічні антигени у зв'язку з можливістю одержання моноклональних антитіл з метою специфічної діагностики й лікування [14, 149, 150]. У численних дослідженнях виявлено низку антигенів, асоційованих з РМЗ людини, на поверхневій мембрані та в цитоплазмі пухлинних клітин. Для оцінки ступеня диференціювання пухлинних клітин молочної залози, що необхідно при визначенні тактики лікування й установленні прогнозу, існують серії моноклональних антитіл, що виявляють диференційні антигени епітеліальних клітин молочної залози.

Слід зазначити, що динаміка рівня маркера становить більший інтерес, ніж одноразове вимірювання його рівня. Однак запропоновані для потреб діагностики злоякісних новоутворень підходи й пухлинні маркери на ранніх стадіях захворювання не можуть використовуватися для диференційованої

діагностики з ДНМЗ. Одними з найбільш перспективних для застосування у клінічній мамології є епігенетичні маркери.

Епігенетичні зміни не порушують послідовності нуклеотидів у ДНК і не передаються у спадок, але за рахунок хімічної модифікації певних хромосомних локусів і пов'язаних з ними генів критично змінюють їх доступність для транскрипційного апарату клітини. Таке епігенетичне «включення / вимикання» генів, зокрема, лежить в основі диференціювання - набуття необхідного фенотипу – всіх типів соматичних клітин. І навпаки, зміна характерного «епігенетичного маркування» клітини того чи іншого типу призводить до де-диференціювання або зміни фенотипу (транс-диференціювання) в інший клітинний тип, наприклад, з епітелію в мезенхіму. Враховуючи такі масштаби ефектів епігенетичної регуляції, неважко зрозуміти, що порушення цього процесу можуть призводити до активації канцерогенезу [176–180].

Метилування ДНК, як один з найважливіших механізмів епігенетичної регуляції, було відкрите на рубежі вісімдесятих років минулого сторіччя. Суть цього процесу полягає в конверсії цитозинових нуклеотидних залишків в 5-метилцитозин. Довгий час вважалося, що єдиним функціональним наслідком метилування є транскрипційна репресія генів, оскільки «острівці» метилування найчастіше виявляються в промоторних послідовностях генів, конформаційно перешкоджають взаємодії цієї ділянки ДНК з білковими транскрипційними факторами, необхідними для експресії даного гена. Проте потім з'ясувалося, що в деяких випадках цей процес може опосередковувати і активацію експресії генів. Проте, так чи інакше, правильний патерн метилування критично необхідний для нормального клітинного диференціювання і розвитку організму.

У ході ж неопластичного переродження картина епігенетичної модифікації, як правило, змінюється таким чином, що загальний рівень метилування геному істотно знижується, тимчасом як регуляторні ділянки істотно меншої частини генів (найчастіше, генів-онкосупресорів), навпаки, гіперметилуються і пригнічуються. Відповідно, якщо зміна нормального метилування в якому-небудь з генів відіграє важливу роль у розвитку певної форми раку, то встановлення такого феномена сприятиме не тільки кращому розумінню патогенезу цього захворювання, але й може виявитися свого роду епігенетичним маркером даного захворювання.

Виявлення метильованих маркерів пухлин у ДНК циркулюючого пулу клітин крові є перспективним способом діагностики та моніторингу злоякісних захворювань у зв'язку з тим, що епігенетичні мутації в генах пухлинної супресії характерні практично для всіх онкотрансформованих клітин, а аберантно-метильовані ДНК можуть бути ефективно виявлені в присутності великого надлишку неметильованої ДНК. Однак більш доцільним є дослідження стану метилування у біоптатах тканини молочної залози.

Одним з найбільш специфічних епігенетичних маркерів РМЗ є гіперметилування ділянки гена *DOK7*. Зважаючи на те, що тільки в 30 % РМЗ є спадковим, у абсолютно більшій частині випадків причиною цього захворювання стають спорадичні мутації та епігенетичні зміни. Серед останніх найчастіше відзначається гіперметилування і, як наслідок, «вимикання» генів *BRCA1* і *BRCA2*, відомих онкосупресорів, що беруть участь в гомологічній рекомбінації при репарації ушкоджень ДНК. Відкриття цих епігенетичних маркерів дозволило, свого часу встановити, що їх носії набагато краще відповідають на лікування такими хімотерапевтичними агентами, як PARP-інгібітори та цисплатин, ніж інші пацієнтки з діагнозом

PM3. Відповідно встановлення епігенетичних маркерів, що трапляються при даному захворюванні з меншою частотою, також могло б допомогти в розробці інших персоналізованих методів лікування.

Для цієї мети автори застосували нещодавно розроблений метод порівняння патернів метилування у однойцевих близнюків, успішно використаний в аналогічних дослідженнях цукрового діабету першого типу і системного червоного вовчака.

Однойцеві близнюки генетично ідентичні, але в ході ембріогенезу та подальшого постнатального розвитку між ними виникає низка фенотипічних відмінностей, явище, відоме як «дискордантність однойцевих близнюків». Один із проявів дискордантності, здебільшого проявляється саме епігенетичними змінами, які можуть бути причиною розвитку якогось захворювання у одного з близнюків за відсутності цього захворювання в іншого. У такому випадку порівняння епігенетичних карт двох близнюків може виявити епігенетичні маркери даного захворювання. Це стосується й PM3.

У своєму дослідженні автори використовували клітини периферичної крові та порівнювали 450 тис. ділянок метилування по всьому геному 36 пар однойцевих близнюків, дискордантних за PM3. Усього було виявлено 403 ділянки геному з різним метилуванням. Як і очікувалося, переважна більшість з них була пов'язана з гіпометилуванням геному, характерним для ракових захворювань. З решти більшу увагу було приділено гіперметильованим ділянкам регуляторних послідовностей генів, що показали найбільші відмінності в метилуванні. Більшість цих генів виявилися вже відомими учасниками патогенезу PM3 та інших ракових захворювань. Однак канцерогенні функції одного з них, *DOK7* (а точніше, однієї з його ізоформ, транскрибованого з альтернативного промотору), який показав

якраз найбільш значущі відмінності в метилуванні, виявилися практично невідомими.

Подальша перевірка можливості використання *DOK7* як епігенетичного маркера РМЗ була проведена на післяопераційних зразках РМЗ і культуральних лініях клітин РМЗ. Аналіз показав, що *DOK7* як маркер має унікальні прогностичні характеристики. А саме: гіперметилування одного з його промоторів у клітинах периферичної крові можна виявити за кілька років до визначення діагнозу РМЗ.

Подальші дослідження у цій галузі можуть бути пов'язані із з'ясуванням точних функцій *DOK7*, а саме тієї його ізоформи, яка синтезується з гіперметильованого при РМЗ промотора в нормі і при канцерогенезі. У 20 % випадків у хворих на РМЗ є відповідний сімейний анамнез [176]. У жінок з «вираженою» сімейною схильністю (у родички першого ступеня був РМЗ у віці до 50 років) ризик розвитку цього захворювання становив 93 %. У жінок зі «слабкою» сімейною схильністю ризик розвитку РМЗ становить 43 % а у жінок без сімейної схильності 18 %.

Кількісний аналіз концентрації метилованої форми гена *RARBeta2* в циркулюючої ДНК плазми і ДНК, зв'язаних з поверхнею клітин крові, отриманих від здорових жінок і хворих на РМЗ, показав значуще підвищення концентрації епігенетичного ДНК–маркера в крові онкологічних хворих. Водночас, не було виявлено залежності концентрації метильованої форми гена *RARBeta2* у складі ДНК плазми і ДНК, зв'язаної з поверхнею клітин крові, від віку пацієнтів, стадії захворювання або розвитку метастатичного процесу. Чутливість аналітичної системи, заснованої на використанні ДНК, зв'язаних з поверхнею клітин крові, за даними ROC-аналізу, на 22 % вища, ніж у разі використання циркулюючої ДНК плазми, і становить 74 %.

Частота виявлення епігенетичних маркерів у крові хворих на РМЗ в сумарному пулі циркулюючої ДНК крові хворих на РМЗ вища (96 %) порівняно з білковими маркерами РЕА та СА-15.3 (9 %). На думку авторів, відсутність кореляції між епігенетичними і білковими онкомаркерами свідчить про незалежну регуляцію метилування гена *RARbeta2* та експресії білкових маркерів і демонструє, що ці маркери можуть бути використані як незалежні предиктори.

Спадкові форми РМЗ характеризуються швидкою малігнізацією, відносно раннім проявом, білатеральністю і мультицентричністю. Встановлено, що наявність захворювання в сімейному анамнезі збільшує ризик його виникнення у середньому втричі. Імовірність виникнення РМЗ вища при нагромадженні в сім'ї випадків захворювання (по батьківській і материнській лінії), особливо серед родичів першого ступеня споріднення. Ризик підвищується і у разі появи захворювання у родичів у молодому віці (до 40 років) і при ураженні обох молочних залоз [77]. Успадкування РМЗ відбувається за автосомно-домінантним типом, часто проявляється у молодому віці, з білатеральним ураженням молочних залоз. Ідентифіковано гени з високою пенетрантністю, які відповідальні за виникнення сімейних форм РМЗ – *BRCA1* і *BRCA2* [177]. Велику увагу дослідники приділяють й іншим факторам ризику, в основі яких також лежить генетична детермінанта. Близнюковий метод чітко демонструє, що мамографічна щільність є генетичною компонентою [172]. Такі висновки були підтверджені при сімейному аналізі, де у жінок першого ступеня споріднення з високою мамографічною щільністю збільшується ризик розвитку РМЗ [178]. Виявлено асоціацію ризику розвитку РМЗ зі щільністю молочної залози у носіїв мутацій генів *BRCA1* та *BRCA2* [177].

Ще у 60-х роках минулого століття було встановлено, що захворювання часто успадковується за материнською лінією (автосомно-домінантний тип). Нерідко у таких сім'ях виявляють мутантні гени *BRCA1* (113705, 17q21, R(113705, 17q21R)) і *BRCA2*. За наявності гена *BRCA1* рак молочної залози розвивається у 85 % випадків [40]. Однак в останні роки ставлення до доцільності скринінгу жіночого населення на носійство цього мутантного гена є більш скептичним – за даними американських дослідників, *BRCA1* зумовлює не більше 1,5 % випадків РМЗ у загальній популяції й не більше 8 % випадків так званого сімейного раку.

Гени *BRCA1* і *BRCA2* є генами-супресорами пухлинного росту і належать до групи генів загального контролю. Обидва гени відіграють важливу роль у процесах ембріонального розвитку. Мутації одного з цих генів (*BRCA1*) спостерігаються у 5–10 % усіх випадків РМЗ. Водночас гермінативні мутації *BRCA1* і *BRCA2* не пояснюють весь спектр спадкових форм раку органів жіночої репродуктивної системи. На думку багатьох дослідників, у більшості випадків РМЗ не пов'язаний з мутацією зазначених генів, а зумовлений порушеннями репродуктивної поведінки в онтогенезі та змінами традиційного способу життя в сучасних умовах. Рак молочної залози і яєчників також розвивається при мутаціях гена Е-кадгерину (192090, 16q22.1, *COR*, *UVO*, *RR*), білка міжклітинних взаємодій. Ця ж мутація відповідальна за розвиток раку ендометрія. Сьогодні із ризиком виникнення РМЗ пов'язують більше 500 генів [38, 39].

Pejou C. et al. (2000) вказують на те, що цінними маркером прогнозу може бути рівень експресії генів, відповідальних за клітинну проліферацію. На думку авторів, цей показник є досить сталим і може навіть використовуватися для класифікації пухлин. Втім, такий підхід вбачається хибним й неприйнятним для ДНМЗ [182].

Таїц І. П. (2010) дослідила частоту алельного поліморфізму гена *GP-IIIa*, що контролює синтез β -3 субодиниці інтегринових рецепторів, у жінок з ДДМЗ і ДНМЗ. Нею встановлено, що носійство алеля PL-AH гена виключає ймовірність виникнення доброякісних захворювань молочної залози. Пацієнтки, гомозиготні за алелем PL-AI гена *GP-IIIa*, належать до групи ризику з розвитку ДДМЗ і ДНМЗ, при цьому частота різних генотипів за даним геном у пацієнток з різним гістологічним типом патології молочної залози не розрізнялася. Основним патогенетичним фактором у розвитку патології автор вважає зміни імунореактивності у жінок з генотипом PL-AIAI гена *GP-III*?. Зокрема, автор визначила тісний зв'язок доброякісної патології молочної залози з рівнем ембріотропних автоантитіл [183].

Рідкісні високопенетрантні термінальні мутації генів *BRCA1* та *BRCA2* відповідають не більш ніж за 25 % усіх сімейних випадків захворювання на РМЗ. Натомість, той генетичний ризик що залишився (75 %), можна пояснити комбінацією більш поширених, низькопенетрантних варіантів [68, 89].

При вивченні генів схильності до РМЗ використовуються два основних напрями молекулярно-генетичних досліджень. Перший підхід розроблений на основі аналізу зчеплення певних генетичних локусів із захворюванням у сім'ях з множинними випадками РМЗ, де пацієнти не є носіями мутацій генів *BRCA1/2*. Наприклад, при вивченні 14 фінських сімей було встановлено зчеплення з регіоном 2q32. При збільшенні вибірки хворих (149 сімей) дані результати були спростовані [112]. Не знайшло подальшого підтвердження і повідомлення про зчеплення РМЗ з локусами 8p і 13q12-13 [99].

Інший підхід до вивчення проблеми, ґрунтується на ідентифікації генів схильності при аналізі асоціацій. Матеріалом для цього аналізу можуть служити незалежні групи хворих і здорових людей. Такі дослідження

спрямовані на вивчення частот алельних варіантів генів у хворих і здорових індивідів. Аналіз асоціацій має певні переваги. Зокрема, він може здійснюватися на популяційних даних і має високу роздільну здатність. Аналіз асоціацій в першу чергу сконцентрований на вивченні генів-кандидатів, які обрані на основі їх залученості в канцерогенез, наприклад генів, що беруть участь у метаболізмі естрогенів, генів системи репарації двониткових розривів ДНК або генів, продукти яких залучені в процес апоптозу.

Найчастішим об'єктом даного вивчення є функціонально значущі поліморфні варіанти генів (однонуклеотидні заміни – SNP), рідше розглядають усі поліморфізми досліджуваного гена (SNP tagging) [45, 68, 177].

В одній з останніх робіт з вивчення асоціацій було проаналізовано 16 поліморфних маркерів ДНК [122], п'ять з яких показали асоціацію. Рідкісні алелі генів CASP8 (каспази 8) D302H, IGFBP3 (білка, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту) – 202c>a і SOD2 (супероксид-дисмутази) VI6A були асоційовані з низьким ризиком розвитку РМЗ, тимчасом як алельні варіанти генів PGR (рецепторів до прогестерону) V660L і TGFBI (трансформуючого фактора росту β) LI OP асоційовані з високим ризиком розвитку захворювання.

Гени, що кодують як ферменти окиснення цитохрому P450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP1B1*), так і ферменти кон'югації (COMT (катехол-О метилтрансферази), *SULT1A1* (сульфонтрансферази 1A1), *SULT1E1* (сульфонтрансферази 1E1), *UGT1A1* (урідін дїфосфоглюкуронозилтрансферази 1A 1)) естрогенів та їх метаболітів, є поліморфними, кодуючи алозимами з різною каталітичною активністю або впливаючи на рівень їх транскрипції. Названі гени потенційно здатні

забезпечувати індивідуальні відмінності у метаболізмі естрогенів і, отже, відмінності в ризику виникнення і характер перебігу опосередкованих естрогенами захворювань.

Раніше проведені молекулярні дослідження поліморфних локусів в *CYP1A1* переконливо довели наявність генетично зумовленої чутливості тканини легень до канцерогенної дії ароматичних поліциклічних вуглеводнів [97]. Однак *CYP1A1* так само активує процес гідроксилювання естрадіолу в деяких тканинах, у тому числі епітеліальної тканини. Доведено взаємозв'язок поліморфізмів *CYP1A1* і раннього початку куріння (до 16 років) з високим ризиком виникнення та РМЗ у американців європейського походження [172].

Інший представник сімейства цитохрому P450 – *CYP17* бере участь у біосинтезі попередників тестостерону. Доведено, що T27C поліморфізм гена *CYP17*, збільшуючи рівень активності ферментів, які каталізують біосинтез тестостерону, може підвищити рівень естрогенів, отже, створити умови для розвитку РМЗ [99]. Вважається, що алель A2 *CYP17* виступає в ролі модифікатора ризику розвитку РМЗ, а не як незалежний фактор ризику [134].

Ген ароматази *CYP19* кодує цитохром P450 – фермент, що каталізує перехід андрогенів у естрогени. Активність ферменту виявлена в різних тканинах, у тому числі в тканині молочної залози. Сьогодні добре вивчено 11 поліморфних варіантів гена *CYP19*. Втім, виявлено асоціацію РМЗ тільки з одним із поліморфізмів (заміна G > A у 80 кодоні третього екзону) , таким чином, у носіїв генотипу (TTTA)⁷/(TTTA)⁷ підвищується ризик розвитку РМЗ. Даний факт можна пояснити високим рівнем активності ферменту [134].

Ген сульфотрансферази *SULT1A1* – поліморфний ген з трьома аллозімами (*SULT1A1*1*, *SULT1A1*2* і *SULT1A1*3*). Епідеміологічні дослідження виявили взаємозв'язок між високою активністю *SULT1A1*1*

алеля з розвитком РМЗ в ранньому віці [102], при цьому не виявлено асоціації даного варіанта з розміром пухлини, стадією захворювання і наявністю естрогенових рецепторів у тканині пухлини [102, 141].

У низці робіт було показано, що ген уридін діфосфоглюкорозилтрансферази *UGT1A1* також залучений у процес канцерогенезу молочної залози. При вивченні поліморфізму гена *UGT1A1* у 200 здорових жінок і 200 хворих на РМЗ була виявлена асоціація між алелями низької активності (*JJGT1A1*28* і *UGT1A1*34*) і високим ризиком розвитку РМЗ у жінок африканського походження в преклімактеричному віці [143]. Виявлено зв'язок *UGT1A1*28* з високим ризиком виникнення РМЗ у жінок китайського походження віком до 40 років [132].

Катехол-О-метилтрансфераза (COMT) – один з декількох ензимів фази II, залучених до інактивації синтезу естрогенів, інгібує катехолестрогени. Один з поліморфізмів гена *COMT* призводить до заміни валіну на метіонін у позиції 158 амінокислотної послідовності білка, створюючи, таким чином, три генотипи – *V/V*, *V/M*, *M/M*. Даний поліморфізм дуже поширений у різних популяціях світу [155]. Для гомозигот за мутантним алелем характерна найменша активність ферменту, що сприяє нагромадженню проміжних метаболітів естрогену, тим самим підвищуючи ризик виникнення РМЗ. У деяких роботах було показано, що малоактивний алель *COMT* різко підвищує ризик виникнення РМЗ.

Місенс-мутація в гені *MnSOD* (марганець супероксиддисмутази) призводить до заміни валіну на аланін у 9-й позиції амінокислотної послідовності. Ця мутація в гені виявляється і у здорових жінок, і у хворих на РМЗ, однак у хворих вона трапляється частіше. Відзначено, що мутантний алель має вдвічі вищий ризик розвитку РМЗ серед жінок у постменопаузальному періоді [134, 138]. У жінок репродуктивного періоду -

гомозигот за аланіном, ризик розвитку РМЗ збільшений майже в чотири рази [134].

Ще одним представником сімейства цитохрому P450 є *CYP3A4*, який спочатку називали ніфедипіноксидазою, у зв'язку з її здатністю засвоювати ніфедипін. Ген *CYP3A4* експресується в тканині молочної залози, але до 30 % від загального вмісту виявляється в тканинах печінки, і бере участь в окисненні обох тестостеронів. Високий рівень експресії *CYP3A4* безпосередньо пов'язаний з ризиком розвитку РМЗ [141].

Імовірність виникнення в одній клітині декількох генетичних змін різко підвищується при порушеннях систем, що контролюють цілісність геному. Тому мутації, що ведуть до нестабільності, також є невід'ємним етапом канцерогенезу. Більш того, деякі вроджені аномалії систем генетичного контролю є факторами, що наперед визначають неминуче виникнення новоутворень: вони збільшують ймовірність появи в кожній клітині організму різних онкогенних мутацій, і у індивідуума в певний момент в якійсь із клітин проліферуючого клону під дією відбору нагромаджується необхідна сукупність змін, що ведуть до пухлиноутворення [45, 124].

В останні роки вимальовується загальна картина, яка показує, що переважна більшість відомих протоонкогенів і пухлинних супресорів є компонентами кількох загальних сигнальних шляхів, що контролюють клітинний цикл, цілісність геному, апоптоз, морфогенетичні реакції та диференціювання клітин. Зміни саме в цих сигнальних шляхах, насамкінець, призводять до розвитку злоякісних новоутворень [117].

Серед факторів ризику РМЗ одне з провідних місць належить мутації генів *BRCA1/2*, *CHEK2* (ген кінази клітинного циклу) і *ATM* (мутантний ген атаксії-телангіектазії), які залучені в процес репарації радіаційно-індукованих ушкоджень ДНК. Таким чином, наявність мутацій цих генів

може призвести до помилок репарації ДНК і, відповідно, до виникнення пухлини [117].

Гени *BRCA1* і *BRCA2* досі вважають одними з основних генів, залучених у розвиток РМЗ. Біохімічні, генетичні та цитологічні дослідження вказують на величезну роль *BRCA1* у регуляції транскрипції, репарації ДНК, проліферації і апоптозу [89]. Багато протеїнів, такі як *p53*, *pRB*, *BRCA2* взаємодіють з *BRCA1/2* [89, 123]. У відповідь на ушкодження ДНК *BRCA1* фосфорилується АТМ і локалізується в ядрі, де стає частиною комплексу ДНК-репарації. Для клітини, у якій відсутні *BRCA1* і *BRCA2*, характерні ушкодження хромосом, включаючи поломки, анеуплоїдію, ампліфікацію центросом. Відомо, що *BRCA1* підвищує активність *p53* та інших факторів транскрипції, зв'язуючись з *RAD51*, бере участь у впізнаванні і або репарації ушкоджень ДНК. Транскрипційний фактор *BRCA2* має активність гістонової ацетил-трансферази, зв'язуючись з *RAD51*, він бере участь у репарації ДНК. Гени були ідентифіковані за допомогою методів аналізу зчеплення і позиційного клонування ще в 1990-х роках [56]. Мутації в генах *BRCA1* і *BRCA2* рідкісні і вони є маркерами високого ризику розвитку РМЗ і раку яєчників і меншою мірою – інших видів раку [56, 135]. Вже ідентифіковано понад 1000 різних мутацій у цих двох генах. Сьогодні повністю доведена необхідність генетичного тестування мутацій в цих генах для сімей підвищеного ризику [66, 87]. Ризик розвитку генетично зумовленого РМЗ у жінок-носіїв мутацій генів *BRCA1/2* становить 80 і 60 % відповідно.

Ризик розвитку РМЗ значно збільшується в результаті виникнення мутацій у гені *CHEK2* на тлі вже наявних мутацій генів *BRCA1* і *BRCA2* [89].

У клітинному циклі постульовано існування так званих звіряльних точок, проходження яких можливе лише у разі нормального завершення попередніх етапів і за відсутності поломок у циклі. Кіназа *CHEK2* (Cell –

cycle checkpoint kinase 2) – центральний медіатор, який бере участь у відповіді на ушкодження ДНК. Іонізуюча радіація активує протеїн CHEK2 через АТМ-опосередковане фосфорилування, і активована кіназа CHEK2 фосфорилує в свою чергу кілька онкопротеїнів, які беруть участь в арешті клітинного циклу і ДНК репарації.

Мутацію 1100delC в гені *CHEK2* розглядають як низькопенетрантний алель, у носіїв даної мутації в гетерозиготному стані підвищується ризик розвитку РМЗ приблизно вдвічі. Вплив іонізуючої радіації може сприяти розвитку РМЗ у *CHEK2* * 1100delC гетерозигот. У деяких роботах повідомляється про асоціацію даної мутації з поганим прогнозом перебігу захворювання [98]. Дані про внесок інших поліморфних варіантів цього гена у розвиток РМЗ дуже суперечливі. У низці робіт показано, що мутації гена *CHEK2* не роблять великого внеску у розвиток РМЗ [101]. Однак останні результати свідчать про те, що мутації 1157T і IVS21 G > A асоційовані з підвищеним ризиком розвитку даної патології [145].

Транскрипційний фактор p53, що регулює клітинний цикл і апоптоз, контролює цілісність геному. Він активується у відповідь на різні несприятливі дії, у тому числі ті, що призводять до генетичних порушень - розриви ДНК тощо. Термінальні мутації у гені *TP53* призводять до виникнення синдрому Лі- Фраумені [124]. Носії мутацій гена *TP53* мають високий ризик розвитку РМЗ у молодому віці. Одна частка випадків РМЗ у популяції, пояснювана мутаціями даного гена, є дуже малою внаслідок низької частоти мутацій гена *TP53*.

Вважається, що поліморфізм 215 G > C (4-й екзон) гена *TP53* (супресор пухлини) відіграє значну роль у розвитку злоякісних новоутворень різних локалізацій. Заміна нуклеотиду призводить до зміни амінокислоти (аргінін на пролін) в 72-му положенні білка, внаслідок чого дві форми

протеїну мають різні характеристики. Варіант R72 є більш потужним і швидким індуктором апоптозу, порівняно з варіантом 72P [124]. Одним з механізмів, що лежать в основі більшої ефективності в індукуванні апоптозу, може бути викликане переважання варіанта R72 в мітохондріях.

Алель R72 розглядають як кандидат низькопенетрантного алеля схильності до РМЗ [124]. Однак у японській популяції підвищений ризик розвитку РМЗ мають гомозиготні носії алеля 72P [124, 156]. В одній з останніх робіт при вивченні поліморфізму R72P у фінській популяції було встановлено, що для пацієнтів з алелем 72P у гомозиготному стані характерна часткова карцинома, тимчасом як гомозиготи за алелем R72 мали високу частоту розвитку протокової карциноми. Пацієнти з генотипом 72P/72P мали більш несприятливий прогноз захворювання, ніж пацієнти з іншими генотипами. Доведена кореляція між експресією мутантного гена 7P53 і поганим клінічним прогнозом. Визначення p53-статусу може бути прогностично значущим при призначенні ад'ювантного лікування (променевої та хіміотерапії) [99].

При аналізі деяких поліморфізмів мітохондріальної ДНК також виявлена асоціація з підвищеним ризиком виникнення РМЗ. Наприклад, заміна G> A в позиції 10398 гена *ND3* у афроамериканок в пре- та постменопаузальному періоді збільшує ризик виникнення РМЗ, тимчасом як у жінок європейського походження цей алель не пов'язаний з ризиком виникнення даної патології [89].

Таким чином, удосконалення діагностики та прогнозування проліферативних захворювань молочної залози є актуальною проблемою сучасної клінічної медицини. Пошук генетичних маркерів РМЗ потребує подальших досліджень генів-кандидатів, до яких, зокрема, можна зарахувати гени *DKK4* та *GSR*.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Дизайн дослідження

Дослідження проведено на базі Обласної клінічної лікарні (Одеса) у 2010–2012 рр.

Дослідження виконували у два етапи. На першому етапі ретроспективно оцінювали причини розвитку пухлин молочної залози у жінок шляхом аналізу архівних даних. Глибина ретроспективного пошуку – 5 років.

На другому етапі сформовані клінічні групи для подальшого проспективного дослідження. Контрольну групу утворили 30 практично здорових жінок репродуктивного віку, обстежених відповідно до програм диспансеризації, I клінічну групу 50 жінок того ж віку з верифікованою фібраденомою молочної залози з, II групу 50 жінок з верифікованою аденокарциномою молочної залози. Термін катамнестичного спостереження – 2 роки

Обстеження жінок, які взяли участь у дослідженні, проводили згідно з наказами МОЗ України від 03.11.2008 р. № 624 та від 30.07.2010 р. № 645.

Жінкам проводили клінічні, лабораторні, променеві, патоморфологічні, генетичні, клініко-генеалогічні дослідження.

2.2 Клінічне дослідження

Клінічне обстеження молочних залоз, окрім огляду та пальпації, включало ретельний збір анамнезу з урахуванням факторів ризику розвитку РМЗ:

- вік більше 35 років;
- сімейний анамнез: при наявності онкопатології у родичів;
- вік менархе до 12 років;
- перші пологи після 30 років;
- менопауза після 55 років;
- атипія у результатах попередніх біопсійних матеріалів;
- зловживання алкоголем (вживання більш 100 мл міцних напоїв або 200 мл вина у день);
- вживання екзогенних гормонів: при безперервному вживанні комбінованих оральних контрацептивів та інших засобів замісної гормональної терапії більше 10 років.

При клінічному обстеженні звертали увагу на дані анамнезу, враховуючи при цьому всі перелічені фактори ризику, супровідні захворювання, в першу чергу гінекологічного та ендокринологічного профілю. Клінічне обстеження дає можливість оцінити стан шкіри, ареол і сосків (при цьому звертали увагу на ділянки сплюснення, втягнення, набряку шкіри, втягнення і ерозію сосків), визначити наявність і характер виділень із сосків. При огляді та пальпаторному дослідженні молочної залози вивчали ступінь розвитку, форму, розміри, стан шкірних покривів, соска, ареолярної зони, наявність оволосіння ареоли, деформації соска, шкірних рубцевих змін, втягнення, вибухань, пігментації.

Правильно проведена пальпація в різних позиціях дозволяла виявити пухлиноподібні утворення, їх розміри, консистенцію, рухливість, контури, зв'язок з навколишніми тканинами, шкірою і соском. При цьому обов'язково були обстежені зони регіонарного лімфовідтоку – пахвові, над- і підключичні ділянки.

При клінічному обстеженні молочної залози визначальним є принцип онкозастереженості. Клінічними ознаками малігнізації визнавали такі:

- пухлина, яка виявляється при пальпації;
- втягування соска або шкіри соска;
- асиметрія соска;
- ерозія соска;
- біль у молочної залози;
- аксилярна лімфаденопатія;
- набряк верхньої кінцівки;
- набряк шкіри молочної залози — «лимонна шкірка».

При обстеженні молочних залоз та веденні жінки при виявленні такі патології застосовували правило «семи позицій»:

- 1) положення — обстеження жінки проводилося спочатку у положенні сидячи, далі — стоячи, після цього — лежачи з піднятими руками;
- 2) розміру — звертали увагу на асиметрію розмірів залоз;
- 3) пальпації — проводилася «за годинниковою стрілкою» кінцівками пальців;
- 4) тиску — відмічали щільність молочної залози, за умови наявності утворення — його щільність і зміщення;
- 5) методика обстеження — повинна відповідати прийнятому алгоритму;
- 6) зворотного зв'язку — передбачає узгодженість і наступність дії спеціалістів різного фаху;

7) диспансерне спостереження.

При виявленні патології під час проведення скринінгу здійснювали подальше обстеження стану молочної залози, яке проходило з використанням «потрійного тесту», що складався з такого:

- клінічного обстеження молочних залоз;
- білатеральної мамографії після 40 років;
- при наявності об'ємних утворень — тонкоголкової аспіраційної біопсії під контролем ультразвукового дослідження (УЗД) із подальшим цитологічним дослідженням.

2.3 Лабораторні дослідження

Лабораторні дослідження проводили у клінічній лабораторії Обласної клінічної лікарні (Одеса). Венозну кров брали натще в одноразові вакуумні пробірки. Показники загального аналізу крові отримували внаслідок дослідження цільної венозної крові за допомогою автоматичного аналізатору Cobas Micros (Франція). Показники системи згортання крові отримували при дослідженні плазми крові за допомогою напівавтоматичного аналізатора TS – 400 (США). Біохімічні показники та гормони крові визначали при дослідженні сироватки крові за допомогою автоматичних аналізаторів відповідно Respons 920 (Німеччина) та Chem Well (США).

Оцінку функціонального стану гіпоталамо-гіпофізарної системи за результатами визначення рівня гіпофізарних і стероїдних гормонів (фолікулоstimулювальний гормон (ФСГ), лютеїнізуючий гормон (ЛГ), пролактин (ПРЛ), тиреотропний гормон (ТТГ), тироксин (Т4), тестостерон

визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА) з допомогою відповідних тест-систем на автоматичному аналізаторі.

2.4 Інтраскопічні дослідження

У жінок до 40 років з метою зниження променевого навантаження на організм жінки при пальпаторному виявленні об'ємного новоутворення в молочній залозі для діагностики доцільно використовувати замість мамографії УЗД молочних залоз.

Показання до проведення УЗД:

- скринінг молочних залоз у молодих жінок (до 40 років);
- моніторинг стану молочних залоз у жінок, які приймають гормональні препарати (гестагени, КОК, ЗГТ);
- інтерпретація мамографічних даних щодо визначення структури об'ємних утворень;
- динамічне спостереження за розмірами об'ємних новоутворень у молодих жінок;
- контрольне обстеження після пункційної біопсії та хірургічних втручань на молочній залозі.

Обстеження краще проводити у першій фазі менструального циклу. Застосовують УЗД є як самостійний метод виявлення доброякісних і злоякісних утворень, так і як додатковий, у сукупності з методом рентгенівської мамографії. У деяких випадках ультразвук перевершує діагностичні можливості мамографії (при дослідженні щільних молочних залоз у молодих жінок); має низку переваг у диференціації рідинних і солідних утворень; у жінок, які мають ДДМЗ. Крім того, ультразвукові

сканери використовуються для динамічного спостереження за вже виявленими доброякісними новоутвореннями молочної залози, щоб визначити, чи не відбулося будь-яких змін. Під час вагітності та в період годування грудьми ультразвук є провідним методом дослідження молочних залоз. Використання високочастотного датчика забезпечує достатню роздільну здатність для визначення утворень навіть малого розміру. У нашому дослідженні УЗД молочної залози проводили за допомогою апарата Aloka Prosound α 6 (Японія).

Проте необхідно враховувати, що при УЗД недостатньою є візуалізація ранніх доклінічних форм, невеликих за розміром осередків РМЗ.

«Золотим стандартом» обстеження молочних залоз є білатеральна мамографія, що зумовлено: радіорезистентністю тканини зрілої молочної залози, низькою дозою опромінення сучасних мамографічних апаратів, високою ефективністю діагностики безсимптомних злоякісних пухлин (85-90 %).

Інформативність і діагностична цінність мамографії визначається мамографічною щільністю – це ступінь рентгенологічної щільності тканини молочної залози. Висока мамографічна щільність відмічається при переважанні фіброзної тканини, низька — при жировій інволюції молочної залози, проміжна — при тому або іншому ступені візуалізації протокових структур.

Оцінка мамографічної щільності при інтерпретації мамограм проводилася рентгенологом за класифікацією Wolfe J. N.(1987), Byrne C., Schairer C. (1995) [200, 201], відповідно до якої визначаються чотири типи мамограм:

N1 — паренхіма представлена цілком або майже цілком жировою тканиною, можуть бути поодинокі фіброзні сполучнотканинні тяжі.

P1 — візуалізуються протокові структури, які займають не більше 25 % об'єму молочної залози.

P2 — протокові структури займають більше 25% об'єму молочної залози.

DY — надзвичайно щільна (непрозора) паренхіма («дисплазія»), що зазвичай вказує на гіперплазію сполучної тканини.

Встановлення мамографічної щільності має важливе діагностично-прогностичне значення: ризик розвитку РМЗ у жінок із підвищеною мамографічною щільністю утричі вищий, ніж у жінок із нормальною мамографічною щільністю. Мамографію проводили на апараті Hologic M IV (США).

Прийом екзогенних естрогенів і гестагенів підвищує щільність тканини молочної залози на мамограмі, тому діагностичні можливості мамографії знижуються при виявленні ранніх стадій РМЗ. Це потребує більш уважного підходу до оцінки мамограм у разі обстеження пацієнток, які приймають гормональні препарати.

Магнітно-резонансна томографія (МРТ) з контрастним посиленням є найбільш чутливим методом візуалізації патології молочних залоз. Цей метод проводиться у жінок між 6-м і 17-м днем менструального циклу. При МРТ можлива візуалізація обох молочних залоз одночасно, що зумовлює перевагу методу у виявленні прихованих злоякісних утворень у протилежній залозі у пацієнток з РМЗ.

Магнітно-резонансна томографія дозволяє чітко відрізнити жирові структури від злоякісних новоутворень (що досить важко зробити при УЗД). Імпульсні послідовності, що використовуються в МРТ, дозволяють «придушити» МР-сигнал від жирової тканини. При МРТ чітко диференціюються кістозні утворення, що мають характерний МР-сигнал,

дослідження з контрастуванням дозволяє диференціювати запальні захворювання молочних залоз від пухлин, виконати передопераційну оцінку абсцесів і ходів нориць у тканині залози.

Під час МРТ можна проводити аналіз контрастування і виведення контрастної речовини тканиною молочної залози, що є основою для можливості відрізнити злоякісні та доброякісні новоутворення.

Показаннями до МРТ молочних залоз з контрастним посиленням є:

1. Передопераційна оцінка розповсюдження пухлини і виявлення змін в іншій молочній залозі.

2. Оцінка рубцювання після органозберігаючого лікування або відновних операцій на молочній залозі (особливо за наявності супровідних фіброзних змін залози). Цей метод дозволяє чітко диференціювати фіброзно-змінену і рубцеву тканину молочної залози, у разі рецидиву — чітко виділити з фіброзного конгломерату пухлинну тканину.

3. У разі виявлення метастатичного ураження лімфатичних вузлів або віддалених метастазів неясного походження МРТ повинна бути рекомендована як метод пошуку первинного ураження (навіть при рентгенонегативних результатах), особливо при обстеженні пацієнток групи високого ризику (з мамографічно щільною тканиною залоз).

У пацієнток із силіконовими імплантами МРТ з контрастним посиленням дає інформацію, яку неможливо отримати іншими методами. Структура силіконового імпланта під час проведення МРТ чітко виділяється в тканині молочної залози і не є значною перешкодою для діагностики навіть невеликих патологічних змін на відміну від інших методів медичної візуалізації. Ані рентгенівська мамографія, ані комп'ютерна томографія, ані УЗД не володіють такими можливостями, для цих методів силіконові імпланти є істотною діагностичною перешкодою.

Проведення МРТ можна рекомендувати хворим з діагностичними проблемами, зумовленими грубим рубцюванням тканини залози. Крім того, вкрай необхідно в комплексі діагностичних заходів використовувати МРТ молочних залоз у пацієнок групи високого ризику (реконструктивна хірургія при видаленні пухлин II — III стадії, мультифокальних пухлин, стан після рецидиву пухлини).

Для інтерпретації результатів обстеження молочних залоз за допомогою мамографії, УЗД та МРТ використовуються міжнародні категорії BIRADS:

Категорія BIRADS 0: неможливо дійти до однозначного висновку за результатами візуалізації, необхідне дообстеження. Ця категорія правомірна при скринінгових обстеженнях.

Категорія BIRADS 1: нормальні результати мамографії, немає новоутворень, порушень архітекtonіки або підозрілих кальцинатів.

Категорія BIRADS 2: доброякісні зміни.

Категорія BIRADS 3: найбільш імовірно доброякісне новоутворення (до 98 % за те, що є доброякісний процес, контрольна візуалізація через 3 — 6 міс.

Категорія BIRADS 4: новоутворення, підозріле на злоякісний процес, необхідна морфологічна верифікація.

Категорія BIRADS 5: усі виявлені ознаки вказують на наявність РМЗ.

Категорія BIRADS 6: під цю категорію потрапляють пацієнтки з уже верифікованим діагнозом злоякісного процесу молочної залози.

Ультразвукове дослідження органів малого таза проводили всім жінкам з метою уточнення розмірів матки і яєчників для виключення органічних змін у зазначених органах. Дослідження виконували на апараті “Aloka 2000” (Японія).

2.5 Патоморфологічне дослідження

Біоптати пухлин відбирали шляхом аспіраційної тонкоголкової пункційної біопсії та трепанобіопсії. Клітинний та тканинний матеріал вузлових новоутворень досліджувався лікарем — патоморфологом за допомогою патоморфологічних методів у патологоанатомічному відділенні Центру реконструктивної та відновної медицини (Університетська клініка) ОНМедУ.

Тонкоголкова пункційна аспіраційна біопсія ДНМЗ проводилася одноразовим шприцем об'ємом 20 мл. Пунктат поміщали на предметне скло, проводили фіксацію 96 % етиловим спиртом, забарвлювали мазки за методикою Папаніколау.

Для взяття гістологічного матеріалу використовували одноразові стерильні голки для трепанбіопсії діаметром G14 і G16, які поміщали в спеціальний напівавтоматичний пристрій. Після проведення внутрішньошкірної проби на чутливість до препарату для місцевої анестезії (частіше використовується 1 % розчин лідокаїну) виконується місцева анестезія шкіри та ділянки молочної залози з пухлиною. Голка проходить крізь шкіру і підшкірно-жирову клітковину в паренхіму молочної залози аж до пухлини, яку пунктуємо. У цій точці при натисканні кнопки напівавтоматичного біопсійного пристрою він вистрілює, і голка висувається вперед. Після кожного вистрілювання голка витягується, відкривається камера і оцінюється якість отриманого зразка тканини. У більшості випадків проводяться дві або три біопсії для забезпечення отримання адекватних

зразків тканини. Частина отриманої тканини негайно замочується в буферному розчині формальдегіду і направляється до патоморфологічної лабораторії для гістологічного та імуногістохімічного аналізу; інша частина тканини поміщається в стерильну пробірку і негайно відправляється для дослідження до генетичної лабораторії. У здорових жінок біопсію тканини молочної залози не виконували.

Фрагменти біопсійного матеріалу завтовшки до 3 мм фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну рН 7,0 протягом 24 год при температурі 37 °С отім в вакуумній камері мікрохвильового гістопроесора Histos 5 (Milestone S.r.l., Італія), згідно з протоколом для типів тканин, проводили дегідратацію патентованим розчином JFC (Milestone S.r.l., Італія), парафінізацію шматочків тканини у поліфункціональному вакуумному мікрохвильовому гістопроесорі Histos 5 (Milestone S.r.l., Італія). Протокол дослідження зафіксовано, воно відповідає стандартам якості ISO та GLP. Заливка проводилася в касетні блоки (ПластиВакс). Зрізи завтовшки 5-6 мкм виконувалися на роторному мікротомі Leica (Німеччина) одноразовими ножами. Препарати забарвлювалися за стандартною методикою гематоксилін-еозином (готовими розчинами гематоксиліну Гарріса (GBG) та еозину (БіоОптика, Італія)). Зрізи покривалися БіоМаунтом (БіоОптика, Італія) та покривним склом.

Вивчали цитологічні та гістологічні препарати на мікроскопі Leica DM750 з фото - відеовиходом та камерою 5М пікселів. Результати оцінювали згідно із загальноновизнаними цитологічними та гістологічними критеріями.

2.6 Молекулярно-генетичні дослідження

Додатково до рутинних методів дослідження проведено вивчення активності метилування гена *GSR* із використанням тестового набору EpiTest QIAGEN (США). Виділення ДНК здійснювали з тканини, одержаної шляхом біопсії молочної залози класичним хлороформ-фенольним методом. Оцінку метилування проводили за допомогою набору EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) методом специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та подальшого піросеквенування.

Полімеразну ланцюгову реакцію починали активацією HotStarTaq ДНК-полімерази при 95 °С протягом 15 хв. У подальшому проводили ампліфикаційні цикли, що склалися з денатурації при 95 °С протягом 1 хв, відпалювання праймерів при 62 °С протягом 2 хв та елонгації при 72 °С кожному наступному циклі, протягом 2 хв. Температуру відпалу поступово знижували на 1,0 °С при кожному наступному циклі.

Після ампліфикації 20 мкл продукту ПЛР додавали до 2 мкл сефарози стрептавідину (GE Healthcare, Швеція) у 20 мкл PyroMark зВ²язувального буфера (Qiagen), ретельно перемішували. Для розділення ланцюгів ДНК та виділення біотин-міченого ланцюга ДНК застосовували вакуумну станцію (Biotage, Швеція). Піросеквенування проводили за допомогою Pyro Gold Reagent Kit (Biotage) у системі PSQ MD 96 Pyrosequencing System (Biotage) відповідно до інструкції виробника (в реакції застосовували 10 пмоль секвенуючого праймера). Кількісна оцінка метильованої ДНК проводилася за допомогою програмного забезпечення PyroQ-CpG v.1.0.9 (Biotage, Швеція).

Загальний перебіг реакції піросеквенування виглядає таким чином. Ампліфікація сегмента ДНК проводиться за допомогою ПЛР, при цьому один з праймерів — біотинільований. Після денатурації біотинільований одноланцюговий ПЛР-амплікон ізолюється та гібридизується з sequencing-праймером.

На наступному етапі гібридизований праймер та одноланцюговий ПЛР-амплікон інкубуються з такими ензимами: ДНК-полімераза, АТФ-сульфураза, люцифераза, апіраза, а також із субстратами аденозин-5'-фосфосульфатом (АФС) та люциферином.

До реакції додається один з деоксирибонуклеотид-три-фосфат (дНТФ) — дАТФ, дТТФ, дГТФ або дЦТФ. ДНК-полімераза каталізує додавання певного дНТФ до sequencing-праймера. Коли є комплементарність до нуклеотиду в ланцюгу ПЛР-амплікона, відбувається інкорпорація. Кожна вдала інкорпорація супроводжується вивільненням пірофосфату (ПФі) у кількості, що еквімолярна кількості інкорпорованих нуклеотидів.

АТФ-сульфураза конвертує ПФі в АТФ у присутності АФС. Цей АТФ реагує з люциферином, внаслідок чого люциферин конвертується в оксилуциферин, що супроводжується генерацією видимого світла, кількість якого пропорційна кількості АТФ. Це світло, що продукується внаслідок люциферин-каталізуючої реакції, фіксується спеціальними CCD-сенсорами, які передають сигнал до комп'ютера, програмне забезпечення якого конвертує сигнали та виводить дані у вигляді піків, з яких формується пірограма. Висота кожного піка пропорційна кількості інкорпорованих нуклеотидів.

Завдяки апіразі відбувається деградація неінкорпорованих нуклеотидів та АТФ. Коли деградація завершується, додається інший нуклеотид.

Додавання дНТП відбувається послідовно. Слід зазначити, що деоксіденозин альфа-тіотрифосфат використовується для заміни природного деоксіденозин-трифосфату дАТФ, який використовується ДНК-полімеразою, але не взаємодіє з люциферазою. Коли процес продовжується, комплементарний ланцюг ДНК елонгується та формує послідовність нуклеотидів і у вигляді сигналів (піків) відображається як пірограма.

Додатково оцінювали наявність однонуклеотидних поліморфізмів rs3763511 та rs8190924 у зазначених генах. Дослідження проводили за допомогою наборів TaqMan [123]. У кожному зразку 20 нг ДНК були використані у реакції з 5,6 мл реактиву 2X Universal Master Mix та 200 нМ праймеру виробництва Applied Biosystems (США). Генотипи були визначені за допомогою методу ПЛР із використанням обладнання Applied Biosystems (США).

К. Мюліса із співробітниками у (1985) розробили метод клонування послідовностей ДНК у пробірці, який дістав назву ПЛР.

До аналізованого зразка ДНК додають в надлишку 2 синтетичних олігонуклеотиди — праймери розміром близько 20 нуклеотидів. Кожен з них комплементарний одному з 3'-залишків фрагмента ДНК. Потім ДНК нагрівають для розділення ланцюгів подвійної спіралі, а при охолодженні відбувається гібридизація праймерів з комплементарними ділянками фрагментів ДНК. У результаті в розчині знаходяться одониткові ДНК з короткими двохланцюговими ділянками — затравками (праймерами). При додаванні нуклеотидів і ДНК-полімерази синтезуються комплементарні ланцюги і утворюються ідентичні фрагменти ДНК (перший цикл). Реакція зупиняється і ДНК знову денатурується прогріванням.

У процесі охолодження праймери, що знаходяться в надлишку, знову ефективно гібридизуються, але вже не тільки з ланцюгами вихідної ДНК, але

і зівнову синтезованими. Внесення в систему ДНК-полімерази ініціює другий цикл полімеразної реакції. Багаторазове повторення описаної процедури дозволяє провести 30 і більше циклів ферментативного подовження праймерів. При цьому кількість сегментів ДНК, обмежених з обох кінців використовуваними праймерами, з кожним циклом ПЛР збільшується експоненціально (наближається до залежності 2^n , де n — кількість циклів). Вихід усіх інших продуктів реакції збільшується за лінійною залежністю. Таким чином, у процесі розглянутої реакції ефективно ампліфікує тільки та послідовність ДНК, яка обмежена праймерами.

Спочатку для ПЛР використовували фрагмент ДНК-полімерази *E. coli*. Однак недоліком даного підходу було те, що після кожного циклу реакції необхідно було вносити в реакційну суміш нову порцію ферменту. Крім того, в оптимальних температурних умовах такої полімеразної реакції (37 °С) з'являлися вторинні ділянки зв'язування праймерів і спостерігалася ампліфікація незапланованих сегментів геному, тобто специфічність ампліфікації була повною. Істотного поліпшення методу ПЛР було досягнуто після заміни фрагмента Кленова на ДНК-полімеразу термофільної бактерії *Thermus aquaticus* (Taq-полімераза). Температурний оптимум реакції, що спрямовується Taq-полімеразою, знаходиться в районі 70 °С. Іншою важливою властивістю є те, що дана полімераза не інактивується після тривалої інкубації при 95 °С.

Використовуючи Taq-полімеразу, вдалося роз'язати відразу дві проблеми. По-перше, термостабільна полімераза не інактивується на етапі денатурації ДНК, і тому немає необхідності після кожного циклу реакції додавати нову порцію ферменту. Таке спрощення процедури дозволило автоматизувати проведення ПЛР, тому що тепер було потрібно лише перенесення зразка з певним інтервалом часу в різні температурні умови: 90-

95 °C (температура денатурації) і 60-70° C (температура ренатурації ДНК і ферментативної реакції). По-друге, високий температурний оптимум реакції, що каталізується Taq-полімеразою, дозволяє підбирати жорсткі температурні умови відпалу, що забезпечують гібридизацію праймерів тільки в заданому районі досліджуваного геному, що істотно підвищує специфічність і чутливість методу.

Використовуючи метод ПЛР, можна в пробірці селективно збагачувати препарат ДНК фрагментом з певною послідовністю в мільйон і більше разів. Це дозволяє надійно виявляти однокопійні гени та їх варіанти в таких великих і складних геномах, яким є геном людини. Чутливість методу настільки висока, що ампліфікувати в ПЛР і виявити цільову послідовність можна навіть у тому разі, якщо вона трапляється один раз у зразку з 100 000 клітин. Одержуваний сегмент ДНК надійно виявляється у вигляді дискретної смуги після електрофоретичного розділення молекул ДНК і забарвлення їх етидіумбромідом. Якщо до праймеру залучити фермент, то ферментна мітка нагромаджуватиметься накопичуватися при ампліфікуванні. Продукт ампліфікації перевіряється за принципом ІФА, тобто додається субстрат і відзначається зміна забарвлення. Як мітку можна використовувати стрептавідин. Його можна додавати як до праймеру, так і до нуклеотидів. В останньому випадку нуклеотиди, мічені стрептавідином, додаються до звичайних, що йдуть на синтез комплементарного ланцюга ДНК. Цим досягається ще більше посилення сигналу.

Розмножений *in vitro* фрагмент отримують у кількостях, достатніх для його прямого секвенування. Оскільки при цьому не потрібний проміжний етап клонування фрагмента ДНК в молекулярних векторах, ПЛР іноді називають безклітинним молекулярним клонуванням (безклітинне молекулярне клонування). Автоматизована процедура Taq-ПЛР, що

складається з 30 і більше циклів, займає 3-4 год, що істотно швидше і простіше, ніж процедура клонування певного фрагмента ДНК у складі векторних молекул.

Полімеразну ланцюгову реакцію використовують для аналізу індивідуальних варіацій послідовності нуклеотидів певних локусів, для підвищення ефективності клонування цільових послідовностей досліджуваних геномів та їх прямого секвенування, для детекції в організмі патогенних мікроорганізмів тощо.

Використовуючи ^{32}P -мічені синтетичні олігонуклеотиди, можна виявляти поодинокі заміни нуклеотидів в обраних локусах геномної ДНК людини (або інших організмів). Для цього в звичайному варіанті методу досліджувану ДНК гідролізують рестриктазами, фракціонуючи електрофорезом, переносять розділені фрагменти за Саузерном на нітроцелюльозний фільтр, який гібридизує з даними міченими олігонуклеотидами в умовах, при яких навіть точкова заміна нуклеотидів у аналізованій послідовності призводить до руйнування комплексу ДНК — олігонуклеотид.

Використання ПЛР для ампліфікації аналізованого локусу дозволяє істотно спростити розглянутий підхід, підвищити його чутливість і специфічність. При цьому для аналізу алельних варіантів генів достатньо всього 1 нг геномної ДНК людини, а гібридизацію можна проводити з негідролізованими рестриктазами ДНК, іммобілізованої на нітроцелюльозному фільтрі у вигляді невеликої плями.

Аналіз метилування гена *GSR* був проведений напівкількісним методом COBRA. Виділяли ДНК зі зразків тканини згідно з протоколом QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Виділену зі зразків тканини ДНК піддавали бісульфітній обробці згідно з протоколом EpiTect Bisulfite kits (Qiagen).

Дизайн праймерів проводили за допомогою програми Methyl Primer Express v1.0 (Applied Biosystems). Для позитивного та негативного контролю використовували неметильовану та повністю метильовану ДНК (Qiagen). Ампліфікацію обробленої та необробленої бісульфітом ДНК проводили методом TouchDown PCR. Після ампліфікації здійснено обробку продуктів ПЛР ферментом рестрикції BstUI (New England BIOLABS) у концентрації 1 мкг/мл протягом 1 год при 60 °С. Після обробки рестриктазою продукти ПЛР були проаналізовані за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі.

Вміст метильованої ДНК у пробі визначали за формулою:

$$K = \frac{M}{M + A} \cdot 100 \%,$$

де M — вміст метильованої ДНК; A — вміст неметильованої ДНК.

За допомогою PSQ Assay Design software здійснювали дизайн праймерів для аналізу поліморфізму. Праймери синтезовані фірмою Metabion International AG (Німеччина). З метою уніфікації ампліфікації специфічних ділянок ДНК різних генів її проводили методом Touch-Down ПЛР з HotStartTag DNA Polymerase з використанням набору HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen) та 10 пкмоль специфічних праймерів для аналізованих SNP досліджуваних генів: 95 °С 15 хв; 7 циклів — 95 °С 35 с, 62 °С 35 с зі зниженням температури на 1,0 °С на цикл, 72 °С 45 с; 35 циклів — 95 °С 30 с; 55 °С 30 с, 72 °С 45 с; 72 °С 10 хв на термоциклері MJR.

Аналіз SNP генів *DKK4*, *GSR*, *TOX3*, *SLC4A7*, *GHSR*, *MAP3K1* й *FGFR2* був проведений методом піросеквенування з використанням набору PyroMark-Gold Q96 Reagents фірми Qiagen та 0,3 мМ специфічних секвенуючих праймерів до досліджуваних SNP згідно з методикою піросеквенування (Qiagen).

Для дослідження гена *DKK4* використано такі праймери:

F: 5-biotin-АТАGАТТТGААGGGАТТТGТТGААGТТТ-3 (328 п. н.).

R: 5-СААААССААСТСААССССААСАААААС-30.

S: 5-СТАААСТААСААСТСААСАС-3.

Для дослідження гена *GSR* використано такі праймери:

F: ТТТGТСGGGCTTGGАAGTCAGCA (126 п.н.).

R: СТСAGGTCCTTGGTATTCGGGA.

Для генів *TOX3*, *SLC4A7*, *GHSR*, *MAP3K1* й *FGFR2* проведено дизайн секвенування відібраних поліморфізмів:

Rs3803662 (*TOX3*)

F: ТТААТGCCTCTАТАGCTGTC 

R: TCCTTAATG CCTCTATAGCTGTC~~CT~~TAG CGAAGAAT

Rs 2981528 (*FGFR2*)

F: GCCACTTA ATGAACCTGT 

R: GCCACTTA ATGAACCTGT ~~TTG~~GGAGAG

Rs889312 (*MAP3K1*)

F:  CCCTGCTG GAGAAAGG

R: TCTCTGAGAT GCCCCTGCTG GAGAAAGG~~MA~~ TGTGCAAATT

Rs4973768 (*SLC4A7*)

F: AGCAGTTAAT TAC~~TA~~AAACA TGAGTTACCT TTGCTC

R:  TGT ACTCAATGGA AACGAG

У подальшому оцінювали поширеність поліморфізмів rs3763511 гена *DKK4* та rs8190924 гена *GSR* серед жінок усіх клінічних груп. Правильність розподілу частот генотипів визначали відповідністю рівноваги Харді–Вайнберга ($p_i^2 + 2 p_i p_j + p_j^2 = 1$).

Слід зазначити, що повною мірою закон Харді — Вайнберга може бути застосований лише до «ідеальної популяції», яка характеризується такими ознаками:

- нескінченно великі розміри;
- необмежена панміксія;
- відсутність мутацій;
- відсутність імміграції особин із сусідніх популяцій;
- відсутність природного добору.

У природних популяціях жодна з цих умов не дотримується, тому і закон Харді — Вайнберга має умовний характер. Тим не менше він реально відображає тенденції у характері розподілу частот тих чи інших алелів і генотипів [11].

Відповідно до Гельсінської декларації всі пацієнти були поінформовані про проведення клінічного дослідження і дали згоду на визначення поліморфізмів досліджуваних генів.

2.7 Методи статистичної обробки

Статистична обробка проводилася методами дисперсійного та кореляційного аналізу [206, 207]. Перевірці гіпотез про положення та розсіяння передувало проведення перевірки нормальності розподілу кількісних ознак з використанням критерію Колмогорова — Смирнова та перевірки рівності генеральних дисперсій за допомогою критерію Фішера [206].

Критерій Колмогорова — Смирнова дозволяє оцінити вірогідність нульової гіпотези про те, що вибіркова сукупність репрезентує генеральну сукупність, що має нормальний розподіл і розраховується за формулою:

$$D = \max_{1 \leq i \leq N} \left| F(Y_i) - \frac{i}{N} \right|, \quad (2.1)$$

де F – теоретичний розподіл;

N – розмір вибірки.

При значенні D менше критичного приймалася нульова гіпотеза, при перевищенні критеріального значення – альтернативна гіпотеза про інший характер розподілу.

Гіпотеза про рівність дисперсій двох нормальних генеральних сукупностей приймалася, якщо відношення більшої дисперсії до меншої було меншим від критичного значення розподілу Фішера:

$$F_{crit} = \frac{S_1^2}{S_2^2}, \quad (2.2)$$

$$F_{crit} < F_{\alpha, v_1, v_2},$$

де α – рівень значущості;

v_1 та v_2 – степені вільності для дисперсій вибірок, що порівнюються;

S_1 та S_2 – значення дисперсій вибірок, що порівнюються.

Після підтвердження нормальності розподілу ознак і рівності дисперсій для порівняння груп та перевірки гіпотези про рівність центрів розподілу у вибірках, що представляли кількісні дані, одержані для різних референтних груп (контролю та досліду), використовували непарний критерій Ст'юдента, який визначали за формулою:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}, \quad (2.3)$$

де S_1 та S_2 – значення дисперсій вибірок, що порівнюються;

X_1 та X_2 – оцінки середніх значень;

N_1 та N_2 – розміри вибірок (референтних груп).

Нульова гіпотеза ($H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$ проти $H_1: \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$) приймалася, якщо за абсолютною величиною критеріальне значення було більше за максимум t-розподілу, взятого з v -степенями вільності, тобто при $|t| > t_{v, \alpha/2}$.

Альтернативна гіпотеза ($H_0: \bar{X}_1 \leq \bar{X}_2$ проти $H_1: \bar{X}_1 > \bar{X}_2$) приймалася, якщо за абсолютною величиною критеріальне значення було більше за максимум t-розподілу, взятого з v -степенями вільності при $|t| > t_{v, \alpha}$.

У разі непідтвердження припущення про нормальність розподілу кількісних ознак, а також при порівнянні референтних груп за ознаками шкали найменувань або рангів, використовувався непараметричний критерій χ^2 з корекцією на безперервність за Йетсом.

$$\chi^2 = \sum \frac{(|O - E| - \frac{1}{2})^2}{E}, \quad (2.4)$$

де O – частота явища, що спостерігається;

E – частота очікуваного явища.

Розраховане значення критерію χ^2 порівнювалося з процентною точкою теоретичного розподілу χ^2 при числі степенів вільності, що дорівнює $(n-1) \times (m-1)$, де n та m – відповідна кількість рядків і стовпчиків таблиці спряженості та рівні значущості α , заданого на рівні 95 % вірогідності (тобто $\alpha = 0,05$).

Кореляційний аналіз проводився для кількісних величин, розподілених за законом нормального розподілу за методом найменших квадратів Пірсона (r), а для рангових величин – за методом рангової кореляції Спірмена (r_s) [150]. При оцінці взаємозв'язку між перемінними шкали найменувань розраховували коефіцієнт асоціації Пірсона (r_A) за формулою:

$$r_A = \frac{ad - bc}{\sqrt{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}}, \quad (2.5)$$

де a , b , c і d – чисельність груп перемінних, розподілених за клітинами чотирипольної таблиці.

Для вимірювання кореляції між дихотомічними ознаками (x та y) у двох спряжених серіях випробувань використовували коефіцієнт кореляції знаків R_{xy} :

$$R_{xy} = \frac{p(xy) - p(x)p(y)}{\sqrt{p(x)p(y)(1-p(x))(1-p(y))}}, \quad (2.6)$$

де $p(xy)$ – частка збігів однакових символів;

$p(x)$ та $p(y)$ – відносна частота зустрічальності того самого символу у кожній групі.

Перевірку статистичних гіпотез проводили на рівні значущості $p < 0,05$ [286–289]. Частоти мутацій генів і теоретично очікуваний розподіл генотипів розраховували з використанням таблиць спряженості з подальшим обчисленням критерію Пірсона χ^2 .

Статистичну значущість різниці між частотами вибірок оцінювали за допомогою точного критерію Фішера (Fisher exact test).

Визначення відповідності до розподілу Харді–Вайнберга частот генотипів у популяції проводили шляхом розрахунку критерію χ^2 за формулою:

$$\chi^2 = \frac{(N_1 N_3 - \frac{1}{4} N_2^2)^2 \times N}{n_1^2 n_2^2}, \quad (2.7)$$

де N_1 , N_2 , N_3 – чисельність генотипів XX , Xx , xx ;

N – загальний обсяг вибірки;

n_1 і n_2 – кількість алелів досліджуваних генів у вибірці.

Для розрахунку показників гетерозиготності використовували он-лайн OEGE калькулятор.

Визначення вірогідності відмінностей популяційних частот проводили за допомогою точного критерію Фішера з поправкою Йетса для парних порівнянь, міжгрупові відмінності визначали за допомогою дисперсійного аналізу за Фрідманом [173].

Ризик виникнення патологічного стану розраховували за допомогою відношень шансів (ВШ) за формулою:

$$OR = \frac{ad}{bc}, \quad (2.8)$$

Де a – кількість індивідуумів з даним маркером у досліджуваній групі;

b – кількість індивідуумів без маркера в досліджуваній групі;

c – кількість індивідуумів з даним маркером у контрольній групі;

d – кількість індивідуумів без маркера в контрольній групі.

95 % довірчий інтервал шансів розраховували за формулою:

$$\ln(OR) \pm 1,96 \times \sqrt{\text{var}(\ln(OR))},$$

де $\text{var}(\ln(OR))$ – стандартне відхилення

У разі необхідності розраховували довірчий інтервал ВШ шляхом потенціювання:

$$95 \% CI = (e^x \ e^y), \quad (2.9)$$

де x і y – значення мінімуму й максимуму для 95 % довірчого інтервалу.

Для дослідження взаємозалежності різних клінічних характеристик використовували кореляційний аналіз за Спірменом. Для формування таблиць спряженості використовували програмне забезпечення MS Excell 2010, для основних розрахунків – програму Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США).

РОЗДІЛ 3

ЗАГАЛЬНА КЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Як показав аналіз одержаних клінічних даних перебіг захворювання у обстежених хворих був стереотипним. Пацієнтки мали скарги на наявність ущільнення в молочній залозі, біль, що посилювався у міжменструальний період, набряканням молочної залози. В окремих випадках відмічалася екскреція рідини з соска. Пальпаторно у пацієнок з локальним фіброаденоматозом молочні залози були щільними, з окремими дифузно розташованими вузликами, не різко відмежованими від суміжних тканин.

Аденози, тобто доброякісні проліферативні процеси, локалізувалися переважно у часточковому (ацинарному) компоненті молочної залози. Ця найбільш проста форма епітеліальної проліферації характеризується незначними структурними змінами протокових і часточкових структур, обмежених шаром епітеліальних та міоепітеліальних клітин при збереженні базальної мембрани.

У 5 (10,0 %) випадках фіброаденоми неможливо було пропальпувати, їх було виявлено під час мамографічного дослідження. Для фіброаденом периканалікулярної будови більш характерні правильна округла форма, рівні чіткі контури, однорідна структура, зона «просвітлення», що свідчить про експансивний ріст. Частим явищем були кальцинати, що свідчить про тривалість патологічного процесу.

Периканалікулярна фіброаденома при гістологічному дослідженні виглядала як чітко відокремлена від суміжних тканин структура з однорідним рисунком будови. Переважала щільноволокниста фіброзна сполучна тканина, яка концентрично розташовувалася навколо стиснених

проток. По периферії пухлини сполучна тканина формувала фіброзну капсулу, яка й зумовлювала чіткі та рівні краї пухлини, що спостерігалися при рентгенологічному дослідженні. При наявності інволютивних і дистрофічних процесів у стромі відбувалося звапнення, що цілком збігається з даними візуалізації (рис. 3.1).

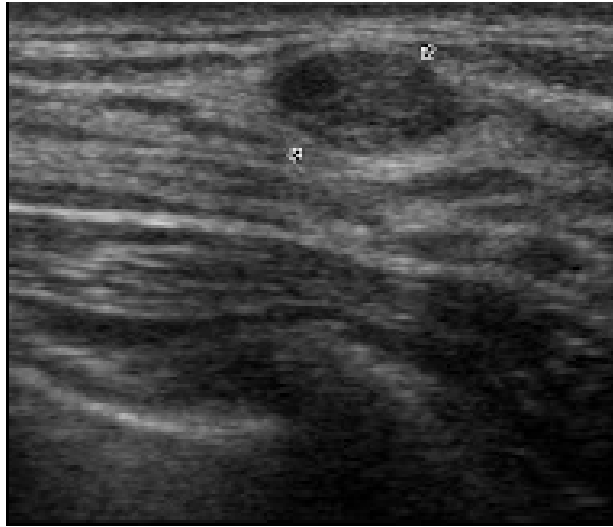


Рис. 3.1 Периканалікулярна фіброаденома

Для фіброаденом інтраканалікулярної та змішаної будови є характерною часточкова структура, горбкуваті нечіткі контури, частіше без обідка просвітлення, неоднорідна структура вузла, здебільшого без вапняних включень. Морфологічно інтраканалікулярна фіброаденома характеризується значним подовженням і кістозним розширенням проток, у просвіт яких виступають масивні сосочки з пухкої набряклої або міксоматозної сполучної тканини, розташовані на широкій основі.

При оцінці клініко-анамнестичних особливостей пацієнток з ДНМЗ встановлено, що середній вік обстежених становив $28,2 \pm 0,7$ року. Професійні шкідливості в анамнезі визначалися лише у 11 (22,0 %) жінок, в основному зайнятих на хімічному виробництві та у нафтопереробній промисловості, а також працюючих на посадах, де трудова діяльність пов'язана із тривалим

психоемоційним напруженням. На обтяжений спадковий анамнез щодо патології молочної залози вказували 49 (87,5 %) пацієнток, випадки РМЗ у родичок першого ступеня (сибсів або по висхідній лінії), за нашими даними, відмічалися у 17 (34,0 %) пацієнток.

Середній вік обстежених становив $45,7 \pm 1,8$ року у групі хворих на РМЗ й ($35,3 \pm 1,5$) року у групі з фіброзно-кістозною мастопатією (ФКМ). Таким чином, середній вік хворих на РМЗ був значно більшим ($p < 0,05$), що відповідає даним інших дослідників.

Аналіз становлення менструальної функції у досліджуваних групах виявив деякі особливості (табл. 3.1). Раннє встановлення регулярного менструального циклу відзначала кожна п'ята жінка з локалізованими формами ДДМЗ.

Таблиця 3.1

Особливості менструальної функції

Порушення менструальної функції	I група (n=50)		II група (n=50)		III група (n=30)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Раннє менархе	11	22,0	15	30,0	6	20,0
Пізнє менархе	8	16,0	13	26,0	4	13,3
Гіперменорея	15	30,0	18	36,0	2	6,7
Поліменорея	6	12,0	7	14,0	3	10,0
Опсоменорея	4	8,0	3	6,0	-	-
Пройоменорея	3	6,0	2	4,0	-	-
Дисменорея	18	36,0	17	34,0	4	13,3
Альгодисменорея	13	26,0	11	22,0	1	3,3

У II клінічній групі таких жінок було 30,0 %, а у контрольній групі – лише 20,0 %. Водночас на регулярність менструального циклу від моменту встановлення вказували більшість жінок контрольної групи (83,3 %), що достовірно раніше порівняно з пацієнтками з різними формами ДДМЗ ($p < 0,05$).

Тривале (більше року) встановлення циклу було властивим кожній третій (36,0 %) пацієнтці I групи у кожній другій (48,0 %) пацієнтці II групи ($p < 0,05$). У жінок контрольної групи подібного факту не спостерігалось.

При локалізованих формах ДДМЗ і РМЗ пацієнтки вдвічі частіше відзначали відсутність регулярного менструального циклу (84,2 %). Наявність рясних менструацій вказувала кожна третя пацієнтка з локалізованими формами ДДМЗ. Слід зазначити, що рясні менструальні виділення у пацієнток з ДДМЗ нерідко поєднувалися з різними гінекологічними захворюваннями (аденоміозом, міомою матки тощо).

При визначенні частоти різних форм ДДМЗ у пацієнток встановлено, що найчастіше у них реєструвалася фіброаденома (40 випадків, або 80,0 %), значно рідше локальний фіброаденоматоз (8,0 %), аденоматоз (6,0 %), солітарні кісти молочної залози та інші форми траплялися набагато рідше.

Слід зазначити, що грудне вигодовування практикували більшість жінок досліджуваних груп. Дещо рідше на наявність лактації в анамнезі вказували пацієнтки з локалізованими формами мастопатії, проте статистично значущим виявилось порівняння лише з жінками контрольної групи ($p < 0,05$). Разом із тим, короткочасний характер лактації (до трьох місяців) відзначали чверть пацієнток з різними формами мастопатії і практично кожна восьма пацієнтка з РМЗ. Піврічна тривалість лактації достовірно частіше фігурувала в анамнезі кожної другої пацієнтки з дифузною мастопатією і тільки у кожній третій – з РМЗ ($p < 0,05$).

У I та II клінічних групах у кожної третьої пацієнтки була виявлена тривала (більше року) лактація. При цьому статистично значущих відмінностей з пацієнтками із локалізованими формами ДДМЗ виявлено не було.

Обтяжений гінекологічний та спадковий анамнез визначено у 80,0 % пацієток з ФКМ і 72,0 % з РМЗ. У більшості (60,0 %) пацієток з ФКМ були супровідні гінекологічні захворювання, у тому числі синдром полікістозних яєчників, ендометріоз та міоми матки. Натомість, у групі пацієток з РМЗ супровідна гінекологічна патологія була визначена у 46,0 % випадків.

Захворювання гепато-біліарного тракту (холецистит, жовчнокам'яна хвороба, гепатит), а також інших органів травлення (гастрит, виразкова хвороба, хронічний панкреатит) виявилася достовірно високою як у жінок з локалізованими формами ДДМЗ, так і у хворих на РМЗ, при цьому чільне місце за частотою посідали хвороби печінки і жовчовивідних шляхів (табл. 3.2).

У I групі патологію гепато-біліарного тракту відзначала значна кількість пацієток (16,0 %), тимчасом як у II групі – лише 6,0 % хворих. Аналогічна ситуація простежувалася і щодо хвороб органів травлення: пацієтки з локалізованими формами ДДМЗ, на відміну від жінок з РМЗ, відзначали їх наявність вдвічі частіше (60,0 і 30,0 % відповідно) ($p < 0,05$).

Частота варикозної хвороби нижніх кінцівок у пацієток I та II клінічних груп у середньому становила 6,0 та 2,0 % відповідно.

Хвороби щитоподібної залози достовірно переважали у жінок з ДДМЗ ($p < 0,05$) порівняно з пацієнтками інших досліджуваних груп. Якщо при ДДМЗ тиреоїдна ендокринопатія виявлялася у 6,0 % хворих, то при РМЗ – у 4,0 %. Загалом ендокринопатії траплялися переважно при локалізованих варіантах ДДМЗ.

Таблиця 3.2

Супутня патологія у обстежених жінок

Нозоформа	І група (n=50)		ІІ група (n=50)	
	Абс.	%	Абс.	%
Хронічний гастрит	2	4,0	1	2,0
Хронічний холецистит	1	2,0	-	-
Хронічний панкреатит	-	-	1	2,0
Виразкова хвороба шлунка, дванадцятипалої кишки	1	2,0	1	2,0
Жовчнокам'яна хвороба	1	2,0	-	-
Хронічний гепатит	-	-	2	4,0
Хронічний пієлонефрит	1	2,0	2	4,0
Сечокам'яна хвороба	2	4,0	1	2,0
Варикозна хвороба	3	6,0	1	2,0
Патологія щитоподібної залози	3	6,0	2	4,0
Цукровий діабет	1	2,0	-	-
Вегето-судинна дистонія	4	8,0	5	10,0

Цікаво відзначити, що пацієнтки з ДДМЗ значно частіше вказували на перенесені запальні захворювання геніталій, аніж пацієнтки інших груп (60,0 % проти 42,0 % у ІІ групі). Частота функціональних кіст і доброякісних

пухлин яєчників достовірно не відрізнялася у I та II групах, сягаючи відповідно 20,0 та 22,0 %.

Частота безплідності при локалізованих формах ДДМЗ виявилася найбільшою. На інфертильність вказувала кожна четверта пацієнтка I групи (26,0 %), а серед пацієток II групи було лише 10,0 % безплідних жінок. При цьому найчастіше реєструвалася вторинна безплідність.

Серед ендокринних синдромів у досліджуваного контингенту був виявлений також передменструальний синдром (ПМС) з мастодинією, який найчастіше часто (88,0 %) реєструвався у пацієток I групи. При цьому достовірне переважання симптомів ПМС (нагрубання, відчуття тяжкості, болі в молочних залозах) було виявлено у більшості пацієток з локалізованими формами ДДМЗ, тимчасом як серед пацієток з дифузною мастопатією подібні скарги відмічалися місце лише у половини хворих ($p < 0,05$). У пацієток II групи ПМС відзначався у 28,0 % випадків.

У порівнянні з пацієтками із захворюваннями молочних залоз тільки 16,7 % жінок контрольної групи відзначали наявність ПМС ($p < 0,0$).

Досить часто у хворих I та II клінічних груп визначалася гіперплазія ендометрія (ГПЕ). Загалом частота ГПЕ у пацієток I групи становила 38,0%, а у пацієток II групи – 22,0 %. При цьому частота даної патології у хворих з локалізованими формами ДДМЗ поступалася такій у жінок з дифузною мастопатією.

При детальному аналізі структури патології ендометрія було встановлено, що частота поліпів ендометрія у жінок з локалізованими формами ДДМЗ становила 30,0 %. При цьому тенденція до рецидивного перебігу патології ендометрія більшою мірою була властива жінкам з дифузною мастопатією.

Частота оперативних втручань на органах малого таза (надпихвова ампутація матки, екстирпація матки, консервативна міомектомія, аднексектомія, резекція яєчників) виявилася найбільшою у пацієток II групи.

У пацієток з РМЗ найчастіше виявлялися пухлини у стадії T2 (33 випадків, тобто 66,0 %), рідше T1 (26,0 %), в поодиноких випадках – більш за давнені стадії. У трьох випадках (6,0 %) визначено метастазування в регіональні лімфатичні вузли (N1-2). Віддалених метастазів не було у жодної пацієтки. Мамографічні дані відповідали переважно рівню BIRADS 5 (58,0 %) та BIRADS 6 (42,0 %)

При вивченні мамологічної гінекологічної та онкологічної захворюваності найближчих родичок пацієток (мати, сестра, рідні тітки) з гіперпластичними процесами матки (ГПМ) була виявлена вкрай висока частота сумарного сімейного нагромадження у жінок з локалізованими формами ДДМЗ (96,0 %) у порівнянні з жінками інших груп. При дифузній мастопатії дві третини обстежених вказували на обтяжений спадковий анамнез (70,0 %) ($p < 0,05$), при ізольованих гіперпластичних процесах матки – кожна друга (54,0 %), а серед жінок контрольної групи – лише кожна четверта (24,0 %) ($p < 0,05$).

При цьому представниці контрольної групи практично вдвічі рідше за пацієток I та II групи вказували на наявність спадкової обтяженості (80,0 і 40,0 % відповідно) ($p < 0,05$).

Частота ДДМЗ виявилася достовірно більшою в анамнезі найближчих родичок практично кожної другої пацієтки з локалізованими формами ДДМЗ (80,0 %) у порівнянні з жінками інших клінічних груп ($p < 0,05$).

Пацієнтки з фіброаденомою і представниці контрольної групи вказували на наявність спадкової обтяженості щодо ДДМЗ достовірно рідше, ніж жінки інших груп (у середньому 8,0 %) ($p < 0,05$).

Рак молочної залози зустрічався в анамнезі родичок пацієток з локалізованими формами ДДМЗ удвічі частіше, ніж при дифузній мастопатії проте статистично значущих відмінностей виявлено не було.

При зборі та обробці матеріалу особлива увага приділялася виявленню випадків захворювання на РМЗ у сім'ях жінок, зарахованих до різних клінічних груп. Серед хворих I групи було відзначено наявність випадків РМЗ у найближчих родичок у 90,0 % випадків, які розподілилися таким чином: у представників I ступеня споріднення – у 32 хворих, II ступеня споріднення – у 16 пацієток, III ступеня споріднення – у 29 випадках захворювання (рис. 3.2).

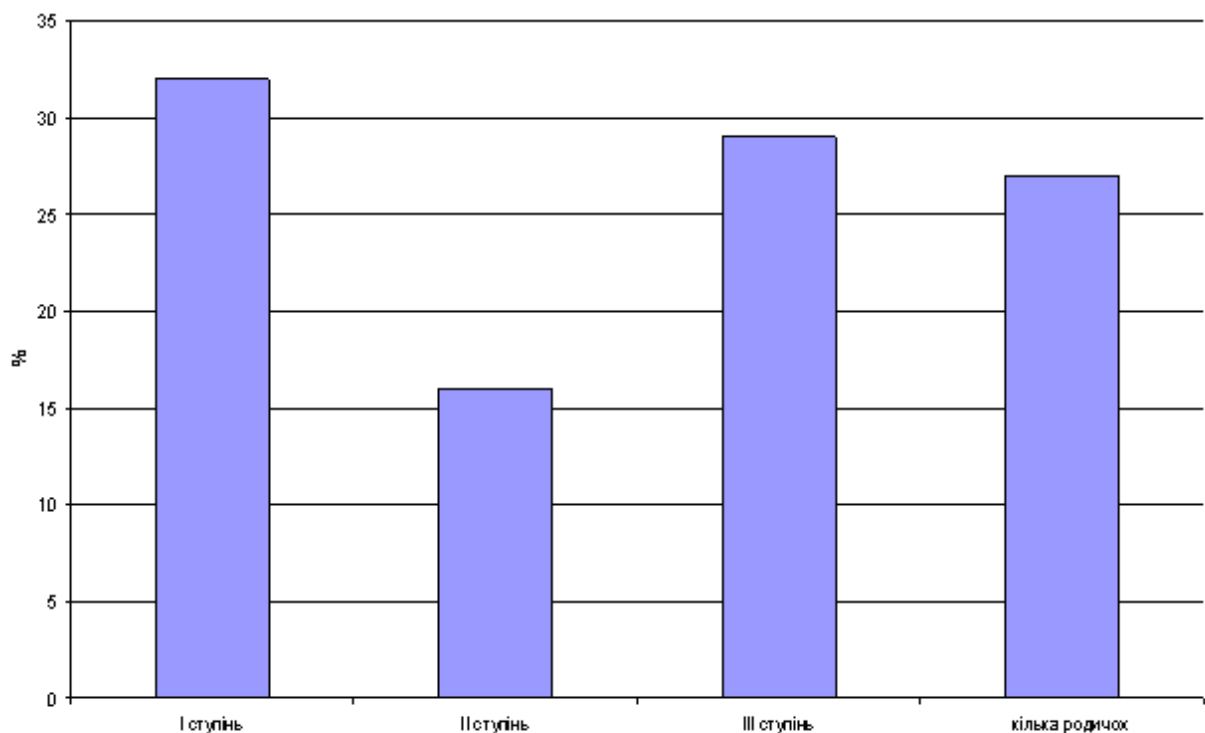


Рис. 3.2 Частота спадкової форми раку молочної залози у обстежених жінок I групи

Таким чином, у частини пацієток із ДЗМЗ було кілька родичок з РМЗ, що висуває на перший план гіпотезу про генетичну обтяженість.

Внаслідок численних наукових досліджень відмічено підвищення ризику виникнення і РМЗ при ранньому віці менархе, пізній менопаузі, а також те, що ризик розвитку даної патології пов'язаний з порушенням гормональної функції яєчників, надниркових залоз, щитоподібної залози, гіпофіза, гіпоталамічної системи [176].

При розподілі досліджуваної групи хворих за віком виникнення і розвитку РМЗ пік маніфестації захворювання відзначається у віці від 41 до 60 років, що становить 58,7 % з усієї вибірки хворих. У віковій групі до 55 років РМЗ встановлений у 60 % випадків.

Серед морфологічних варіантів РМЗ велику частину становили інфільтративний протоковий рак і рак з переважанням внутрішньопрокового компонента (56,0 %), а також інфільтративний часточковий рак (30,0 %), які, за даними літератури, мають тенденцію до мультицентричного та двостороннього ураження молочних залоз [40]. Особливі гістологічні варіанти (папілярний та медулярний) РМЗ спостерігалися лише в поодиноких випадках.

При розподілі груп за ступенем клітинного атипізму пухлинної тканини (ступеня злоякісності) нами встановлено, що у хворих переважали пухлини з помірним (36,0 %) і низьким (62,0 %) диференціюванням клітин.

За стадіями захворювання, встановленими при первинному зверненні, у структурі виявлених випадків РМЗ найчастіше траплялися пухлини у стадії Т2 (33 випадки тобто 66,0 %). Дещо рідше пухлини відповідали стадії Т1 (26,0 %), у поодиноких випадках – більш давнені стадії. У трьох випадках (6,0 %) визначено метастазування в регіональні лімфатичні вузли (N1-2). Випадків віддаленого метастазування не було у жодної пацієнтки.

Нами були виявлені особливості репродуктивного анамнезу у жінок з пухлинами молочних залоз як різного роду порушення становлення менструальної функції (50,0 %), кількість медичних абортів більше трьох (32 %), синдром втрати плода (17,0 %), порушення лактаційної функції, включаючи епізоди нереалізованої лактації – (8,0 %), аборти до народження першої дитини відмічалися в анамнезі 22 (22,0 %) жінок.

У переважній більшості випадків – у 89 (89,0 %) пацієнток I та II групи – були супровідні захворювання репродуктивної сфери, у тому числі міома матки в 11 (11,0 %) випадках; гіперплазія ендометрія – у 6 (6,05 %); порушення менструального циклу – у 86 (86,0 %), у тому числі недостатність лютеїнової фази – у 29 (29,0 %); кіста яєчника у 5 (5,0 %); гіперандрогенні стани – у 4 (4,0 %); безплідність різного генезу у 8 (8,0 %); запальні захворювання органів малого таза – у 50 (50,0 %); у 9 (9,0 %) випадках була виявлена гіперпролактинемія. Передменструальний синдром спостерігався у 23 (23,0 %) пацієнток. Поєднання кількох гінекологічних захворювань зареєстроване у кожній четвертій пацієнтки.

Після проведення усього комплексу обстежень і консультацій суміжних фахівців при оцінці особливостей гормонального профілю обстежених пацієнток встановлено, що для хворих на РМЗ і ДДМЗ були притаманні різноманітні ендокринні порушення, у тому числі відносна гіперестрогенія та недостатність лютеїнової фази менструально-оваріального циклу.

Проведений аналіз факторів ризику виникнення ДДМЗ показав, що провідними з них є такі (рис. 3.3).

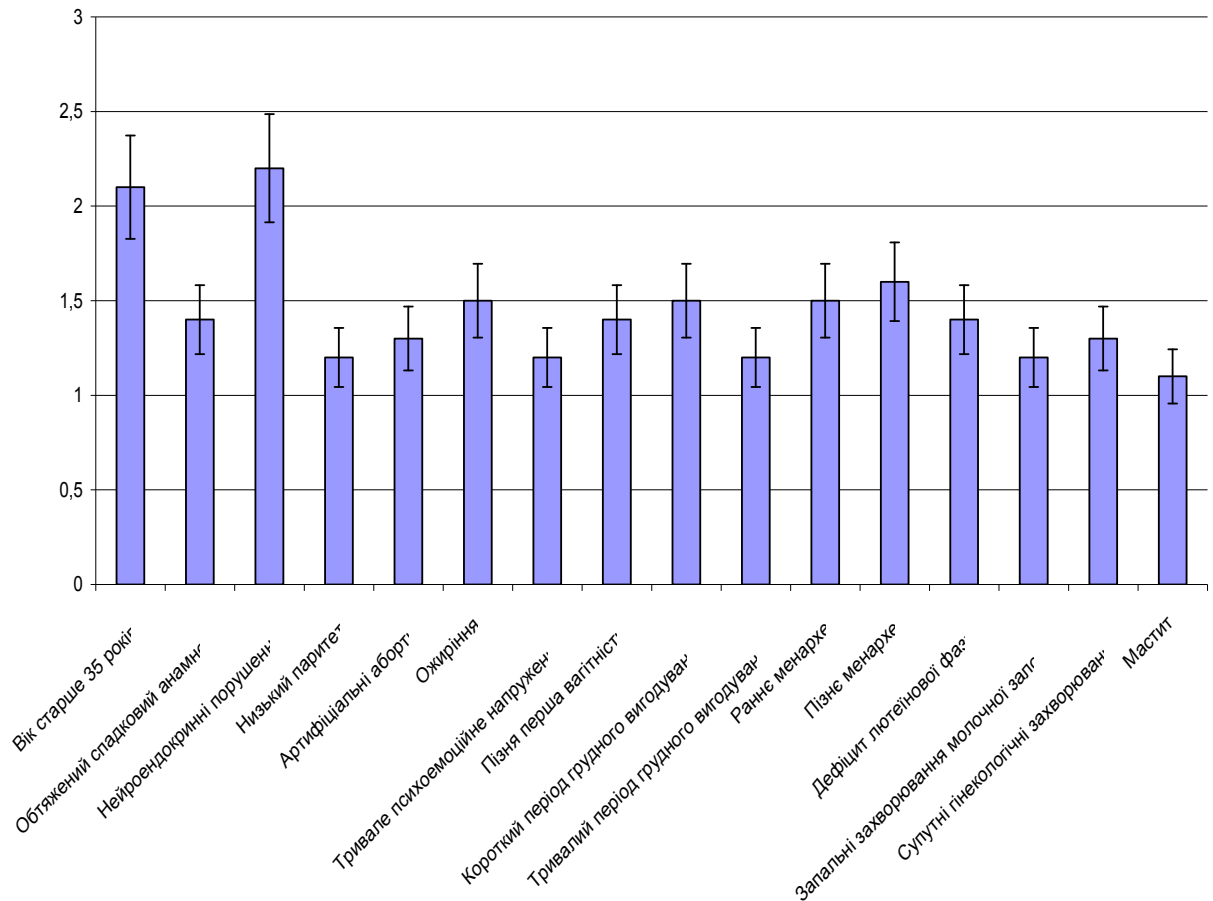


Рис. 3.3 Фактори ризику виникнення патології молочної залози.

Основними факторами ризику виникнення пухлин молочної залози є наявність гінекологічних захворювань (ВШ=1,5; ДІ 95 % 1,2–1,7) та ендокринних порушень (ВШ=2,2; (ДІ 95 % 1,7–2,4), пізнє менархе (ВШ=1,7; ДІ 95 % 1,5–1,9), вік після 35 років (ВШ=2,2; (ДІ 95 % 1,7–2,4).

Відповідно до наведених даних, поряд із гіперпластичними захворюваннями матки, ризик розвитку локалізованих форм ДДМЗ визначають ендокринно-метаболічні порушення (спадкова схильність, тривале становлення менструального циклу (більше року), тривалі та рясні менструації, альгоменорея, мимовільне переривання вагітності в ранні терміни, патологічні параметри лактації (гіпо- і алактія поряд з тривалим (більше року) періодом годування, серозні мастити), захворювання

щитоподібної залози і гепато-біліарного тракту, ожиріння). Крім того, для розвитку дифузних форм ДДМЗ значущими є неодноразові внутрішньоматкові втручання, численні аборти і пов'язані з ними запальні захворювання геніталій.

Патофізіологічним обґрунтуванням впливу визначених факторів ризику є такі: спадковий фактор, тобто наявність доброякісних і злоякісних новоутворень у родичів по материнській лінії, що зумовлює схильність до виникнення порушень у клітинному циклі, у дизрегуляторних проявах на етапі процесів проліферації; наявність нейроендокринних порушень у вигляді патологічних змін нейрогуморальної складової репродуктивного циклу, що у свою чергу, веде до активації проліферативних процесів у гормонально залежних органах, у тому числі в тканинах молочної залози.

Наведені у розділі матеріали були опубліковані у таких фахових виданнях:

1. Ромак Р. П., До питання диференційної діагностики пухлин молочної залози: епігенетична регуляція проліферації як маркер пухлинного процесу. Р. П. Ромак, О. І. Ромак //Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2013. – № 3, – С. 31-34.
2. Р. П. Ромак ., В. М. Запорожан ., В. Г. Дубініна ., В. В. Бубнов. Швидкий і надійний тест для типування поліморфізмів у генах TOX3, SLC4A7, MAP3K1 та EGFR2 пов'язаних с ризиком розвитку раку молочної залози методом піросеквенування//Одеський медичний журнал. – 2013. – Т. 200, № 3. – С. 70-78.
3. Romak R.P., Association of Single Nucleotide Polimorphisms in Wnt Signaling Pathway Genes with Breast Tumours/ R. P. Romak ., V. N.

- Zaporozhan // European Applied Sciences. – 2013. – N 7. – P. 68 – 71.
4. Ромак Р.П., Епігенетична регуляція проліферації при доброякісних дисплазіях молочної залози. Р. П. Ромак., В. М. Запорожан //Український медичний альманах–2013, Т. 16, № 3 – С.59 – 61.
 5. Romak R.P., Epigenetic regulation of the proliferation in breast tumours/ R. P. Romak ., V. N. Zaporozhan //Journal of Health Sciences. – 2013. – vol 3 (10). P. 233 – 238.
 6. Пат. 82003 Україна, МПК (2006.01) : А61В10/02.Спосіб прогнозування ризику спонтанного раку молочної залози / Ромак Р.П., Запорожан В. М., Дубініна В. Г., Бубнов В. В., Ромак О. І .; заявник та патентовласник Одес. нац.. мед. ун-т. – № u2013 04526; заявл. 11.04.2013; опубл.10.07.2013. Бюл.№ 13.
 7. Нікітенко Р. П. Молекулярна епідеміологія раку молочної залози Р.П. Нікітенко //15-й., міжнародний медичний конгрес молодих вчених ,м.Тернопіль / – 2011 р.2 – 7-29 квітня. – С.81.
 8. Ромак Р.П., Епігенетична регуляція експресії гена DKK4 у жінок з пухлинами молочної залози. Р. П. Ромак., В. М. Запорожан //Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, № 4. – С.233 – 238.

РОЗДІЛ 4

ГЕННІ МЕРЕЖІ КООРДИНОВАНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *DKK4* ТА *GSR* ПРИ ПУХЛИНАХ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Генна мережа – група координовано функціонуючих генів, які забезпечують формування певної фенотипічної ознаки організму (молекулярної, біохімічної, фізіологічної, морфологічної, поведінкової тощо). Обов'язковими компонентами генної мережі є гени, закодовані ними РНК і білки, метаболіти, шляхи передачі сигналів, метаболічні шляхи, регуляторні контури з позитивними і негативними зворотними зв'язками. Генна мережа диференціації клітин складається з окремих елементарних функціональних одиниць – модулів генів, керованих позитивним зворотним зв'язком. При цьому кожний ген відповідає за свій окремий етап певного напрямку диференціації клітини за принципом «один етап диференціації – один модуль генів». Еволюційною передумовою виникнення генної мережі є вбудовування сайтів транскрипційних факторів у регуляторні ділянки генів завдяки механізмам рекомбінації.

Зважаючи на значну чисельність генів-кандидатів при побудові генних мереж, був проведений аналіз особливостей взаємодії різних функціональних асоціацій на рівні різних сигнальних шляхів, коекспресії, колокалізації та інших варіантів за допомогою програмного забезпечення GeneMANIA, яке дозволяє одержати додаткові дані щодо відомих на сьогодні потенційних генетичних детермінант тих чи інших патологічних станів. Залучення записів сучасних баз даних дозволяє досить повно охарактеризувати ймовірні

фенотипічні зміни та показати, з якими саме генами найбільш тісно сполучені функціональні зміни експресії того чи іншого гена.

За допомогою даного програмного забезпечення є можливим визначати внесок кожного гена у загальний ефект генетичної мережі. На відміну від альтернативних продуктів, зокрема STRING, bioPIXIE, Funcassociate та FunCoup, програмне забезпечення GeneMANIA є більш гнучким і має зручний інтерфейс. Алгоритми, що використовуються при обчисленні зважених коефіцієнтів для різних генів, ґрунтуються на засадах лінійної регресії та багатофакторного аналізу.

Як видно з рис. 4.1, значна кількість генів взаємно посилюють активність один одного, тобто знаходяться у відношеннях коекспресії. Як видно з наведеної у схемі інформації, основна частина генів, що взаємодіють за механізмом коекспресії, пов'язана із геном глутатіонредуктази.

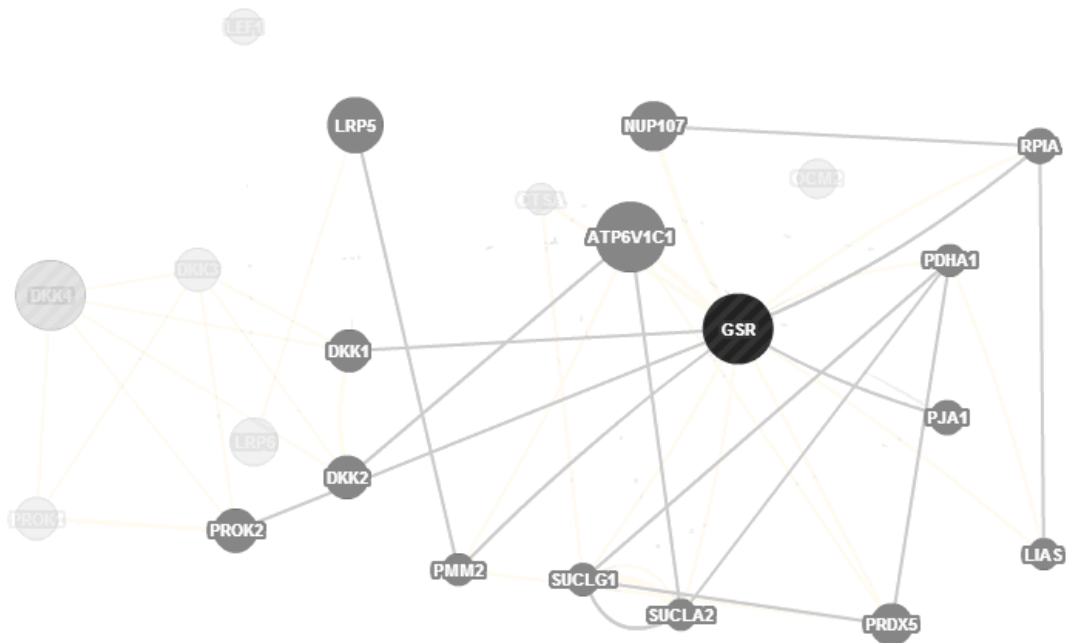


Рис. 4.1 Коекспресія генів у аналізованій мережі (результати розрахунків в GeneMania, опис мережі наведено у тексті)

Як видно з представленого вище рис. 4.1, найбільш важливими «вузлами» в аналізованій мережі є гени *RPIA*, *PDHA1*, *SUCLG1* та *SUCLA2*, які беруть участь у регуляції вуглеводного обміну (пентозо-фосфатний шунт), тканинного дихання. З ними тісно взаємодіють гени *DKK2*, *PROK2*, *PROX5*, *PMM2*, через які, у свою чергу, пов'язані із генами *LRP5*, *NUP107*, *LIAS*, *PJA1*.

Розглядаючи спектр продуктів, що експресуються завдяки даній генетичній мережі, слід зазначити, що ефекти відповідних білків забезпечують не лише нормальне функціонування клітинного циклу, але й охоплюють широке коло метаболічних процесів.

До інших видів належать фізична взаємодія генів (рис. 4.2) та реалізація на рівні взаємодії «ген-ген» (рис. 4.3).

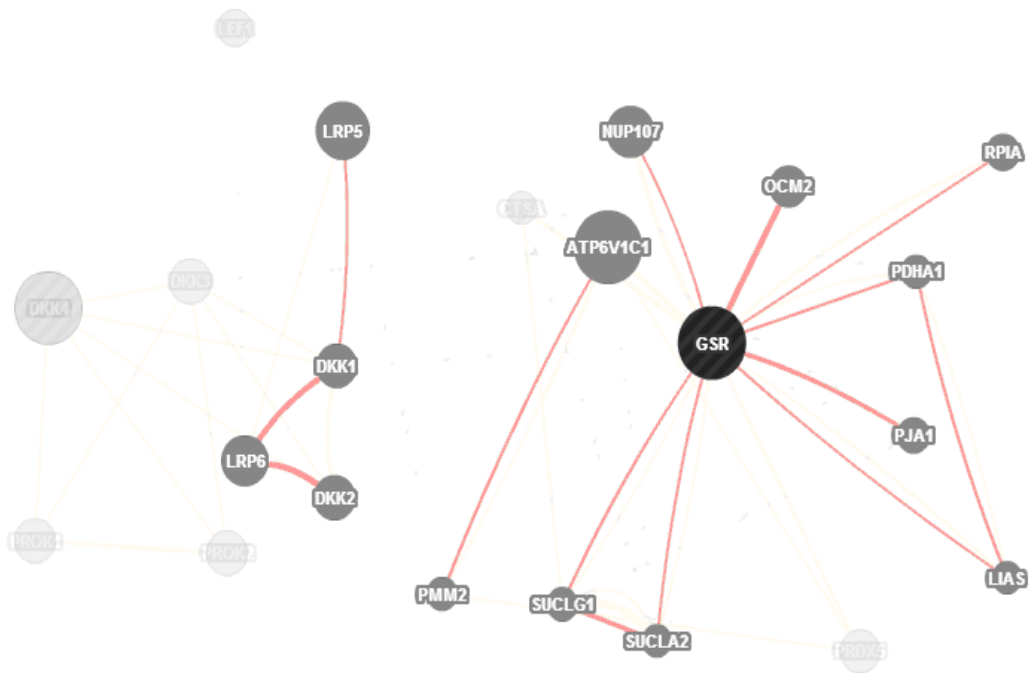


Рис. 4.2 Фізична взаємодія досліджуваних генів (результати розрахунків у GeneMania)

Як видно з наведеного рис.4.2, фізична взаємодія досліджуваних генів охоплює три основних домени генів. Значна частина безпосередньо пов'язана із геном глутатіонредуктази *GSR*, тимчасом як інші об'єднують гени, що беруть участь в енергетичному обміні клітини, регулюючи активність АТФази (ген *ATP6V1C1*) та синтез глікопротеїнів (ген *PMM2*). Нарешті, гени *LRP5* та *LRP6* визначають синтез ліпопротеїдів низької щільності, а гени групи *DKK* є важливими компонентами регуляції клітинного циклу та клітинної проліферації загалом.

Предиктивні можливості даної генетичної мережі не обмежуються лише механізмами коекспресії та фізичної взаємодії, але й визначаються співвідношеннями «ген-ген» (див.рис. 4.3).

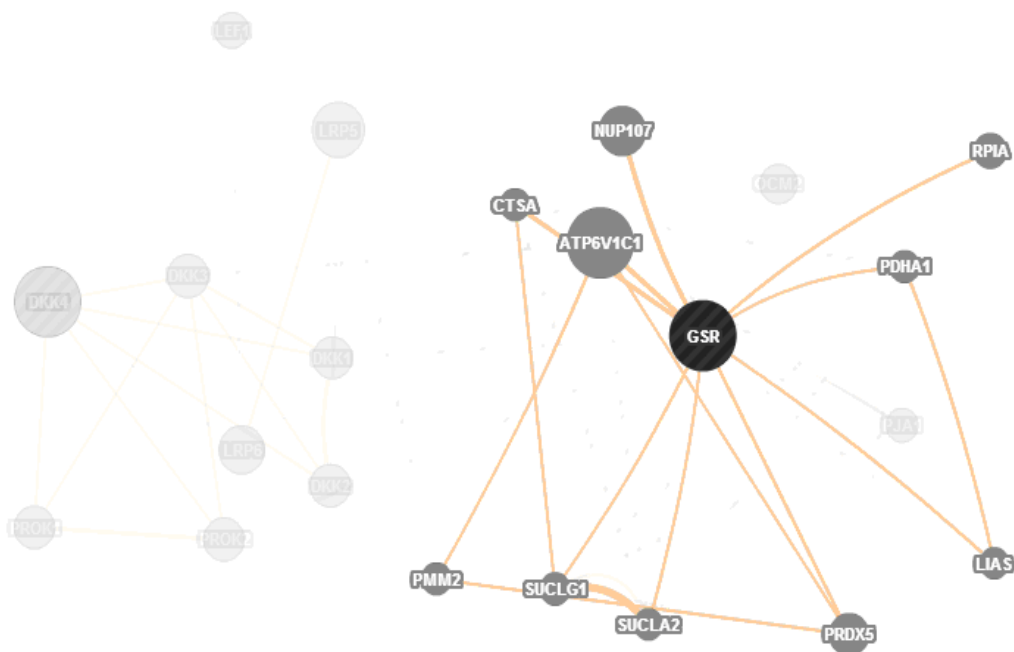


Рис. 4.3 Взаємодія «ген-ген» (результати розрахунків у GeneMania)

Значний інтерес становить функціонування сигнального шляху *wnt* та його важливої компоненти *DKK4*. З наведеного рис.4.3 видно, що до цього шляху належать власне гени родин *DKK*, *LRP* та *SUCL* (рис. 4.4).

Активація *wnt* сигнального шляху відбувається після приєднання *wnt* лігандів до своїх рецепторів Fz та LRP 5/6 (ліпопротеїн рецептор-зв'язувальний білок 5 та/або 6). Це приводить до вивільнення Р-катеніну із деградаційного комплексу і поліпшує його проникнення до ядра, де він регулює генну транскрипцію мішені через асоціацію з TcF/LEF, Legless (Lgs) та Pygopus. Антагоністи *wnt* сигнального шляху секретують SFRP (секреторний білок), WIF (wnt інгібіторний фактор) і DKK (Dickopf). Компонентами Р-катенінового деградаційного комплексу є Axin, пухлинний супресор APC (білок гена аденоматозного поліпозу товстої кишки), CSk-3 β (кіназа 3 β глікогенсинтази) та Ck-1 α (казеїнкіназа 1 α).

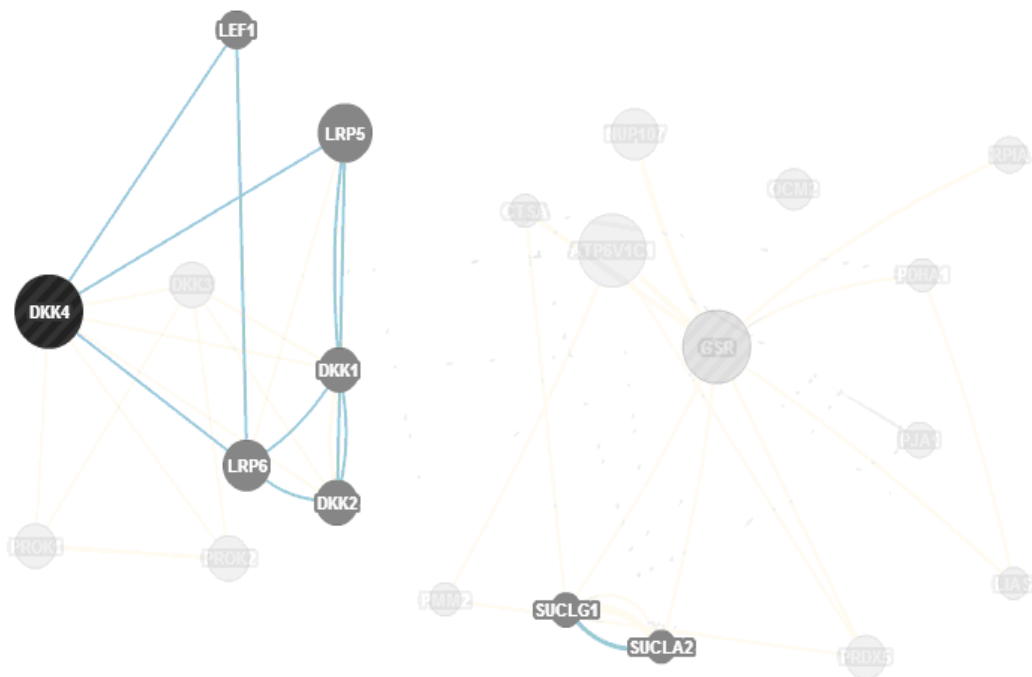


Рис. 4.4 Сигнальні шляхи у пацієнток з пухлинами молочної залози (результати розрахунків в GeneMania)

За відсутності wnt1 сигналу, білок APC підтримує деградацію онкогену Р-катеніну та перешкоджає його проникненню до ядра. Стимуляція специфічних рецепторів пригнічує функцію APC білка або його зв'язаного партнера Axin. Це призводить до стабілізації Р-катеніну і до збільшення його концентрації в ядрі. Далі, об'єднуючись із сімейством транскрипційних факторів, Р-катенін може діяти як транскрипційний співактиватор. Комплекс APC з Axin та іншими білками направляє Р-катенін для протеосомної деградації, підтримуючи асоціацію між Р-катеніном і кіназами, чії дії спричиняють убіквітинізацію Р-катеніну. Ця акція анулюється шляхом поновлення деградаційного комплексу на мембрані через активацію wnt рецепторного комплексу, що містить Fz, спорідненого з протоонкогеном Smo, та LRP 5/6.

Феномен колокалізації (рис. 4.5) відзначався лише для кількох генів (*GSHR*, *CT5A*, *PDHA1*, *PMM2*), тобто більшість генів, що увійшли до складу мережі, були локалізовані у різних хромосомах.

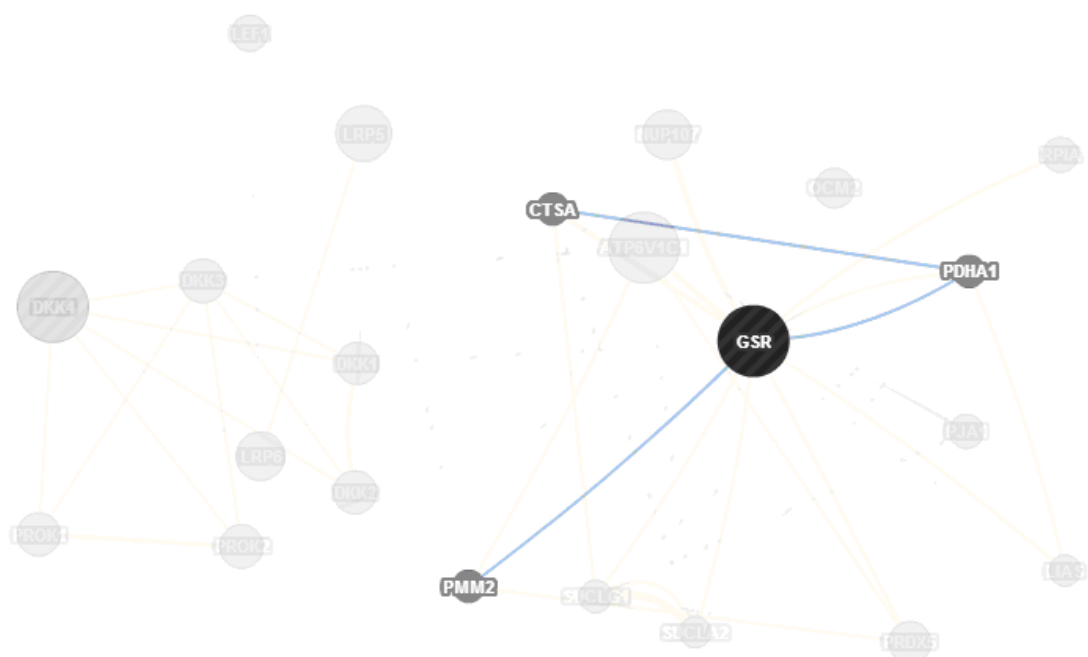


Рис. 4.5 Колокалізація генів (результати розрахунків у GeneMania)

Значно більша кількість генів була пов'язана з наявністю взаємодії білків, кодованих ними (рис. 4.6), та суто генетичними взаємодіями (рис. 4.7).

Є підстави вважати, що спадкова схильність до РМЗ зумовлена кількома генами, алельні варіанти яких призводять до невисокого ризику виникнення хвороби, але з високою частотою представлені в популяції. Такі гени можуть діяти спільно, забезпечуючи мультиплікативний ефект. Ідентифікація додаткових генів спадкової схильності до РМЗ або з'ясування ролі варіантів відомих генів є актуальним завданням, однак не менше значення має й визначення характеру взаємодії між різними генетичними детермінантами.

До колокалізованих з *GSR* генів належать *CTSA*, *PDHA1* та *PMM2*. Ген катепсину *CTSA* знаходиться у 20-й хромосомі, ген α 1-піруватдегідрогенази *PDHA1* – у 10-й хромосомі, а ген фосфоманомутази *PMM2* – у 16-й хромосомі. Феномен колокалізації полягає, насамперед, у знаходженні білкових продуктів у тих самих клітинах організму.

При аналізі наявності спільного білкового домену була визначена група генів, тісно пов'язаних із генами антагоністів wnt-шляху, зокрема *DKK1*, *DKK2*, *DKK3* та *DKK4*. Крім того, до цієї ж групи генів входять *LRP5* та *LRP6*, що кодують ліпопротеїди, а також *PROK1* та *PROK2*, що контролюють синтез прокінетицинів, білків відповідальних за проліферацію ендотелію у залозах внутрішньої секреції.

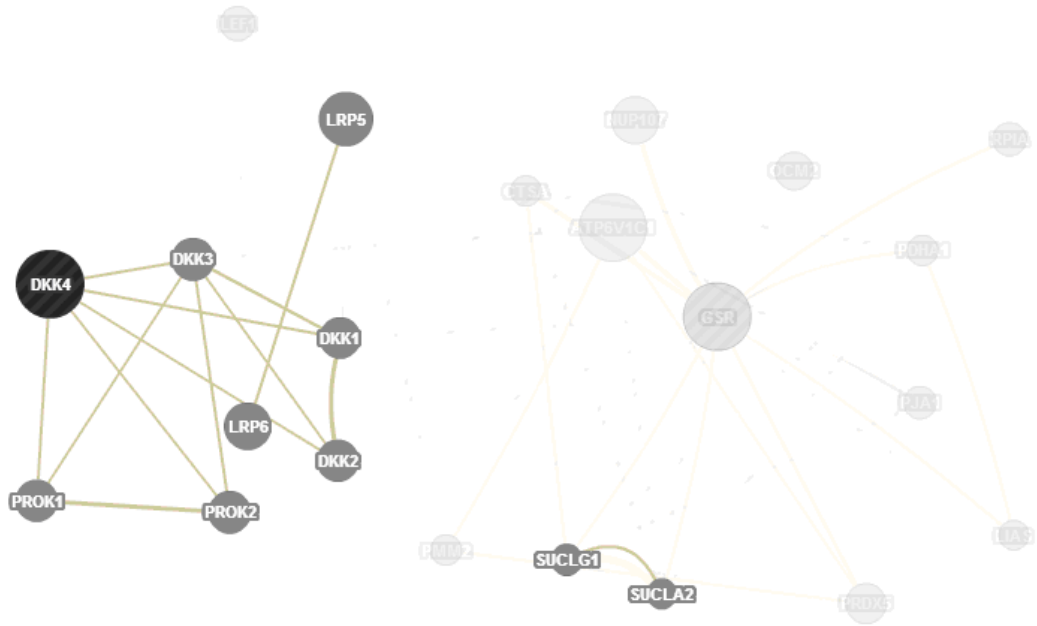


Рис. 4.6 Гени із спільним білковим доменом (результати розрахунків у GeneMania)

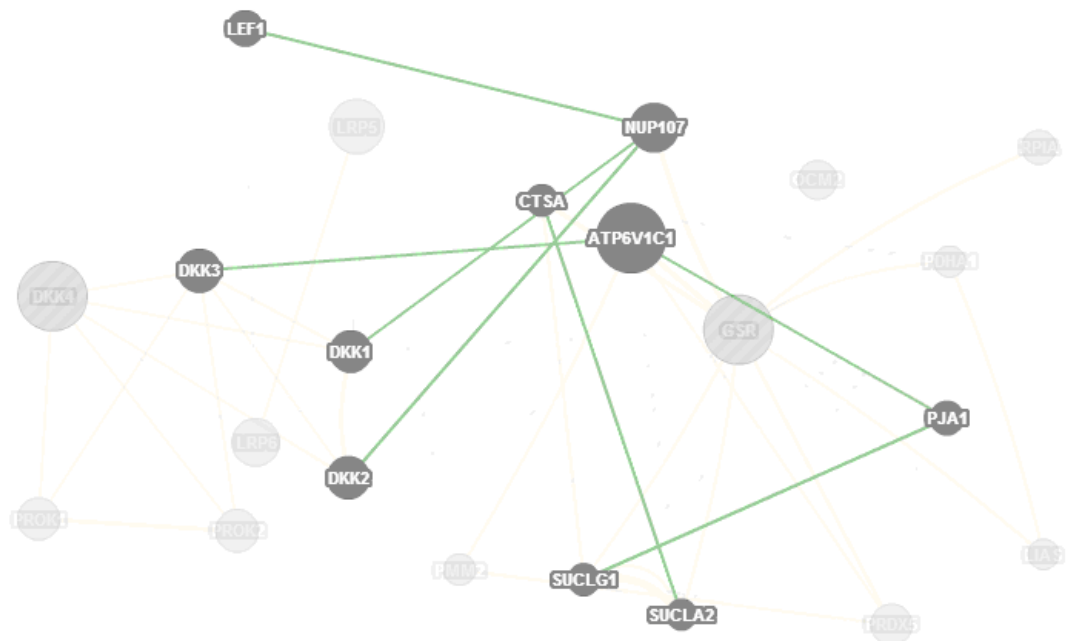


Рис. 4.7 Генетичні взаємодії (результати розрахунків у GeneMania)

Значно різноманітністю відрізняються генетичні взаємодії. У ролі «гарячих вузлів» мережі виступають *NUP107* та *ATP6V1C1*. Складання генної мережі для кожного мультифакторіального захворювання, ідентифікація в ній центральних генів і генів-модифікаторів, аналіз асоціації їх поліморфізмів з конкретним захворюванням, розробка на цій основі комплексу профілактичних заходів для конкретного пацієнта є стратегічною основою нового напрямку, що швидко розвивається, – предиктивної медицини.

Незалежно від того, який саме сценарій взаємодії між окремими генами реалізується, генною мережою є сукупність координовано експресованих генів, їх білкових продуктів і взаємозв'язків між ними. При цьому основними компонентами генної мережі є власне ядро мережі – група координовано експресованих генів, білки, які кодуються цими генами, а також негативні та позитивні зворотні зв'язки, які координують роботу генної мережі. Крім того, до складу мережі входять низькомолекулярні сполуки (метаболіти) і зовнішні сигнали, що забезпечують перемикання станів генної мережі.

Генна мережа виглядає так: вузлами генної мережі є білки і білок-білкові комплекси. Вузли відображаються лежачими уздовж вертикальних ліній і взаємодіють з клітинним інтерфейсом. Між вузлами представлені окремі молекулярні реакції, такі як білок-білок або білок-мРНК взаємодії. Ці взаємодії можуть бути індуктивними, при яких збільшення концентрації одного компонента приводить до збільшення концентрації іншого, і інгібіторними, в яких зменшення концентрації одного компонента приводить до зменшення концентрації іншого. Структура генних мереж є абстракцією системи хімічної динаміки, яка описує різноманіформність, в яких одна речовина впливає на всі інші. Генні мережі є квінтесенцією колективного знання про безліч зв'язаних біохімічних реакцій.

Відповідно до цих уявлень, гени можна розглядати як вузли в мережі з вхідними значеннями у вигляді транскрипційних факторів і вихідними значеннями у вигляді рівня експресії генів. Сам вузол може розглядатися як функція, яка може бути отримана комбінацією базових функцій від входів.

У багатьох випадках можна визначити спрямованість процесів у межах фрагмента генної мережі, виділити вхідний потік – шлях передачі сигналу з рецепторів клітини до гена і вихідний потік – процеси, що відбуваються в клітині після відповіді генів на зовнішній сигнал.

Таким чином, загальний вигляд генної мережі при пухлинних захворюваннях молочної залози є таким (рис. 4.8):

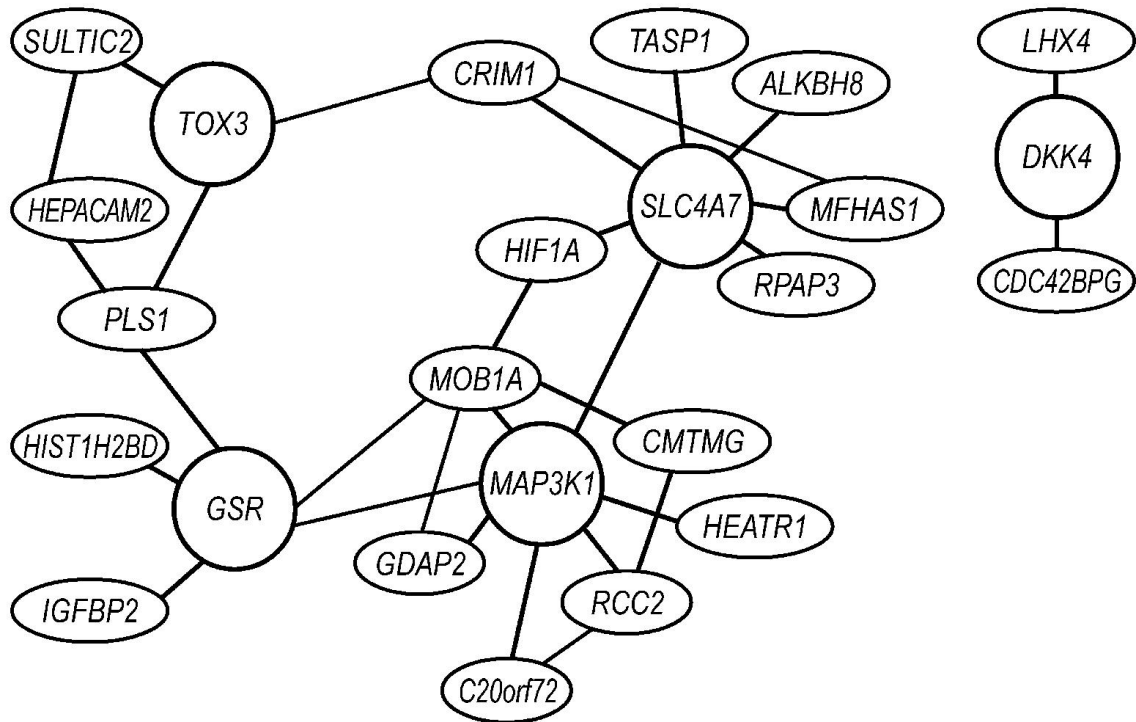


Рис. 4.8 Генна мережа при пухлинах молочної залози (результати розрахунків у GeneMania)

Характерною особливістю організації генних мереж є їх здатність до саморегуляції за рахунок замкнутих регуляторних контурів з негативними і позитивними зворотними зв'язками. Молекулярною основою існування таких регуляторних контурів є наявність сайтів-мішеней у ДНК, РНК і білках, з

якими можуть взаємодіяти різні компоненти генної мережі та зовнішні регуляторні фактори. Завдяки цим двом типам регуляторних контурів можлива підтримка певного функціонального стану генної мережі або її перехід в інший режим функціонування.

Представлені у розділі результати досліджень були опубліковані у таких фахових виданнях:

1. Zaporozhan V. M. Epigenetic regulation of the proliferation in breast tumours / V. M. Zaporozhan, R. P. Romak // Journal of Health Sciences. – 2013. – Vol. 3, N 10. – P. 233–238.
2. Zaporozhan V. N. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in Wnt Signaling Pathway Genes with Breast Tumours / V. N. Zaporozhan, R. P. Romak // Europäische Fachhochschule. – 2013. – Bd. 7. – S. 68–69.

РОЗДІЛ 5

ЧАСТОТА ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ *GSR* ТА *DKK4*

Ген *GSR* кодує амінокислотну послідовність глутатіонредуктази – ензиму, що є членом родини піридин нуклеотид-дисульфід оксидоредуктаз та являє собою гомодимерний флавопротеїн. Цей ензим є одним з провідних у ферментативних механізмах антиоксидантного захисту (АОЗ), забезпечуючи антиоксидантний захист на рівні клітини. Редукуючи окисненні форми глутатіондисульфїду до сульфгїдрильної форми глутатіону, він запобігає виникненню окисного стресу та його несприятливих наслідків. Поява мутацій у гені *GSR*, як правило, призводить на рівні фенотипу до дефіциту активності глутатіонредуктази, а в окремих випадках – до дефіциту піридоксину й асоційованої з ним гемолітичної анемії. Роль поліморфізмів гена у виникненні проліферативних процесів залишається недостатньо вивченою.

На рис. 5.1 наведено інформацію про структуру та локалізацію гена *GSR*. Він знаходиться у короткому плечі 8-ї хромосоми й має у своїй структурі близько 50 000 п. н.

Натомість ген *DKK4* кодує білок-інгібітор, що є членом так званої *discorff* родини та складається з двох ділянок, багатих на цистеїн (див.рис. 5.1). Цей білок є важливим компонентом сигнального шляху, його активність модулюється шляхом зв'язування з Wnt корецептором та кофактором kremen 2.

Сьогодні відомо, що дефіцит білка, кодованого даним геном, призводить до ідіоматичного пневмофіброзу, але лише нещодавно з'явилися відомості про ймовірну роль поліморфізмів *DKK4* у розвитку пухлин [44].

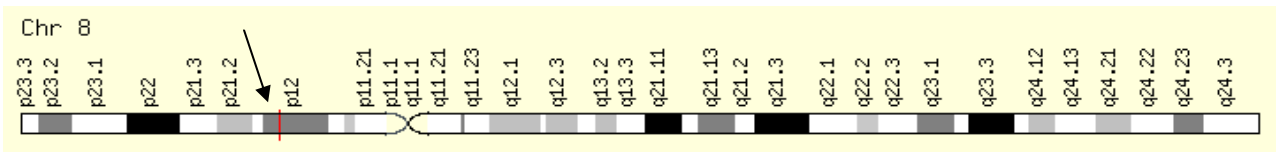


Рис. 5.1 Локалізація гена *GSR*

Початок: 30,535,578 п. н. від *pter*

Кінець: 30,585,486 п. н. від *pter*

Розмір: 49,909 п. о.

Орієнтація: негативна

Як видно на рис. 5.2 даний ген також локалізується у 8-й хромосомі, маючи розмір лише 3165 п. н.

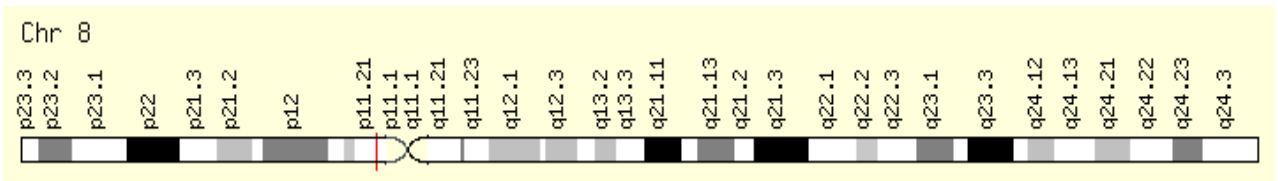


Рис. 5.2 Ген *DKK4*

Початок: 42,231,586 п. н. від *pter*

Кінець: 42,234,750 п. н. від
pter

розмір: 3,165 п. н.

Орієнтація: негативна

У ссавців гени родини Dickkopf (*DKK*) кодують групу позаклітинних сигнальних молекул, що контролюють клітинний цикл, проліферацію та тканинний гомеостаз (рис. 5.3). Значна частина вказаних ефектів реалізується шляхом мережі проліферації та диференціації, яка входить до складу канонічного Wnt/ β -катенін сигнального шляху [8–11]. Найменування Wnt походить від аббревіатур Wg (англ. wingless) і Int [10]. Ген дрозофіли wingless спочатку був ідентифікований за рецесивною мутацією, що визначає у мушки розвиток крил [10]. Гомологічний ген хребетних Int спочатку вивчали

у зв'язку з присутністю в його локусі декількох місць інтеграції геному вірусу раку молочних залоз миші [10, 11], однак в останні роки доведена його ідентичність й для інших ссавців і, зокрема, гомінід.

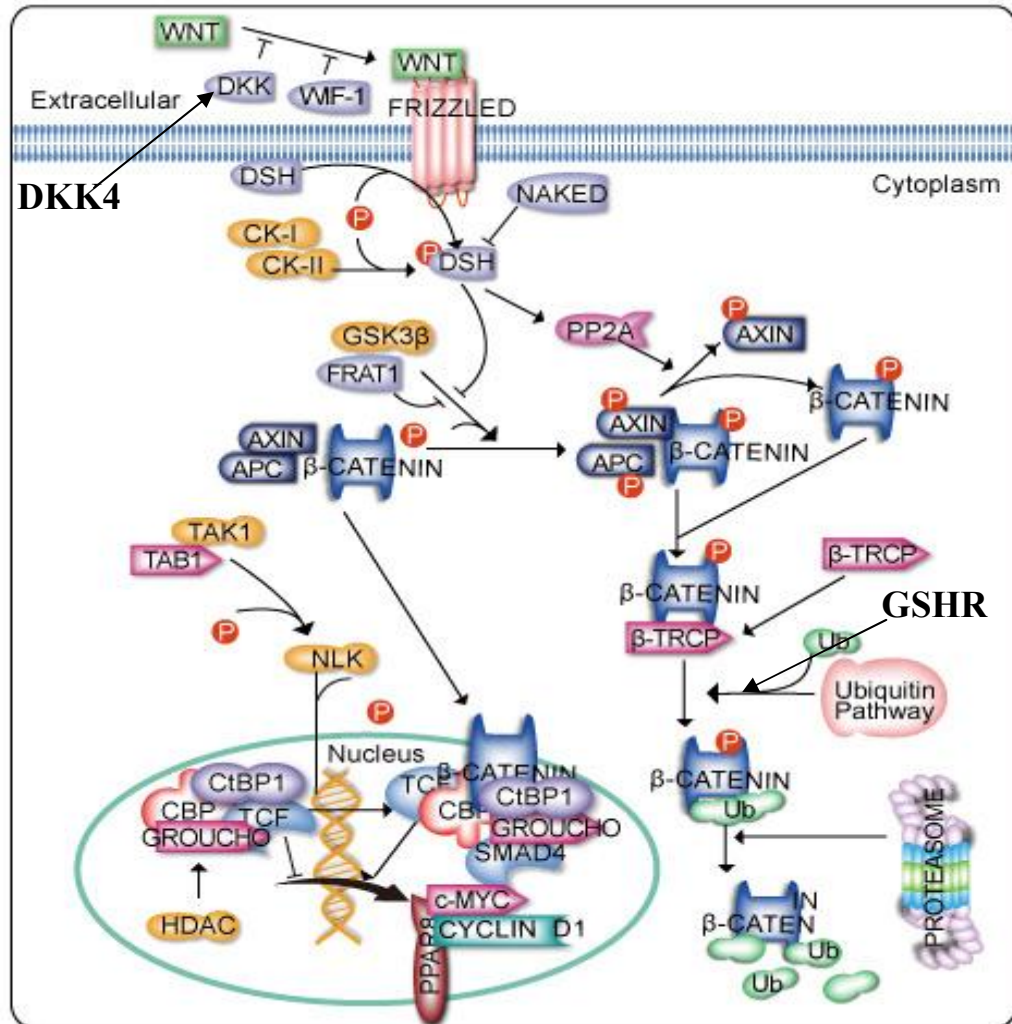


Рис. 5.3 Wnt-сигнальний шлях [7]

Канонічний шлях сигналу Wnt регулюється на багатьох рівнях, у тому числі шляхом численних антагоністичних йому механізмів управління. За відсутності сигналу β-катенін пов'язаний із «деструючим комплексом», що містить білок-супресор пухлин, зокрема білок аденоматозного поліпозу товстого кишечника (APC), цитоплазматичний «підтримуючий» білок аксин, а також протеїнкіназу GSK-3 і кazeїнкіназу (CK1). Коли β-катенін як ключовий внутрішньоклітинний елемент цього сигнального шляху

нагромаджується у цитоплазмі, він входить в ядро, де активує Т-клітинні фактори (TCF), регулюючи таким чином експресію значної кількості генів.

На підставі проведених нами аналізів поширеності поліморфізмів генів *DKK4* та *GSR* встановлено, що їх гомозиготні варіанти серед жінок Одеської області трапляються лише у 4,0–8,0 % випадків, що відповідає даним для східноєвропейської популяції [18].

Відповідно серед обстежених пацієнтів домінували гетерозиготи та гомозиготні варіанти NN, які траплялися у 1,5-2 рази частіше, ніж мутантні (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Розподіл генотипів поліморфізмів генів *GSR* та *DKK4*

Групи/генотипи			I група		II група		III група	
			Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>GSR</i>	M	AA	22	44,0	19	38,0	10	33,3
	MN	GA	18	36,0	23	46,0	11	36,7
	N	GG	10	20,0	8	16,0	9	30,0
	A		40	80,0	42	84,0	21	70,0
	G		28	56,0	31	62,0	20	66,7
<i>DKK4</i>	M	AA	14	28,0	12	24,0	7	23,3
	MN	GA	20	40,0	25	50,0	18	60,0
	N	GG	16	32,0	13	26,0	5	16,7
	A		34	68,0	37	74,0	25	83,3
	G		36	72,0	38	76,0	23	76,7

Співвідношення між спостережуваною та очікуваною гетерозиготністю у пацієнтів I групи становило 0,79, II групи – 0,86, III групи – 1,03. Таким

чином, частота поліморфізмів rs3763511 гена *DKK4* та rs8190924 гена *GSR* серед жінок з доброякісними пухлинами молочної залози та РМЗ практично не відрізняється (ВШ=1,1; ДІ 95 % 0,9–1,3).

Частота різних алелів досліджуваних поліморфізмів для мутантного алеля гена *GSR* у пацієток I групи дорівнювала 0,4, пацієток II групи – 0,84, III групи – 73,3 %, тобто не мала статистично значущих відмінностей.

Як видно з наведеної інформації, відношення шансів у жінок з ДДМЗ не перевищувало для мутантного алеля 0,51 при довірчому інтервалі 0,16–1,63 ($\chi^2=1,32$ при $\chi^2_{\text{крит}}=3,5$).

Подальший аналіз дав такі результати (рис. 5. 4)

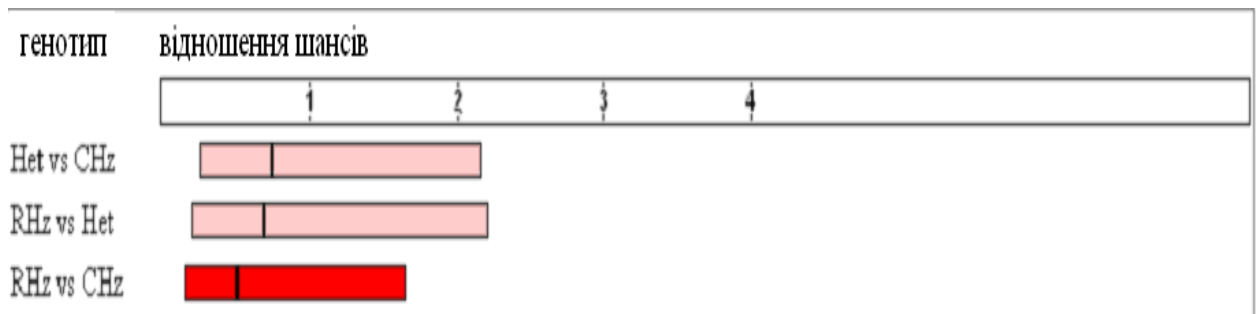


Рис. 5.4 Порівняння частоти поліморфізмів гена *GSR* у жінок з доброякісною дисплазією молочної залози і здорових жінок

Як видно з наведеного рис. 5.4, частота визначення гетерозиготних і гомозиготних «нормальних» алельних варіантів відповідала ВШ=0,74 (95 % ДІ 0,26–2,14). Відповідно частота визначення гетерозиготних і гомозиготних мутантних алельних варіантів дорівнювала ВШ=0,68 (95 % ДІ 0,21–2,19). У табл. 5.1 наведено особливості порівняння частот різних генотипів за поліморфізмами ген а*GSR* у жінок з ДДМЗ та здорових жінок.

Натомість у пацієток з РМЗ були одержані такі дані (рис. 5.5):

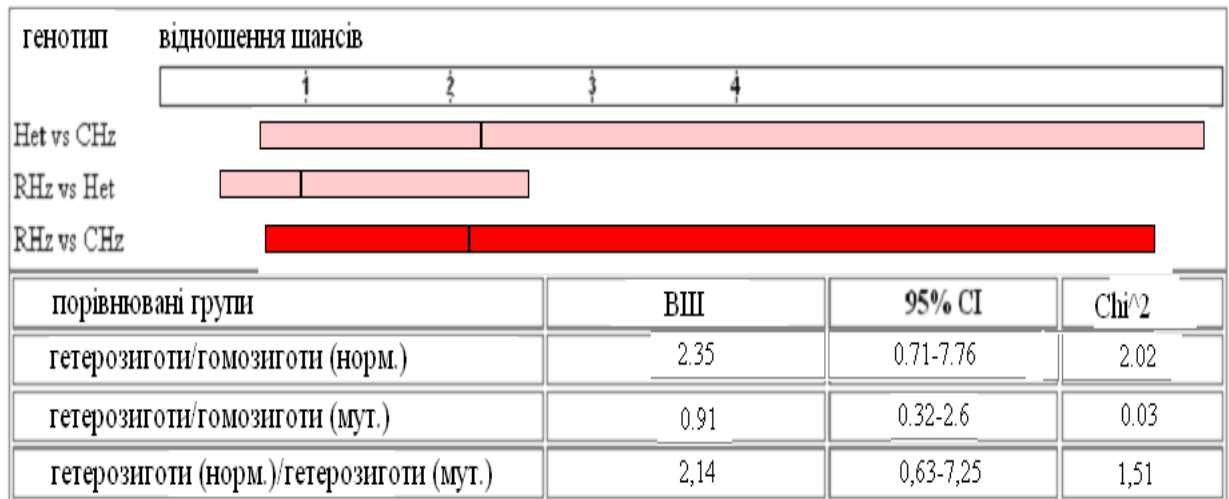


Рис. 5.5 Порівняння частоти поліморфізмів гена *GSR* у жінок з раком молочної залози і здорових жінок

Як видно з наведеної інформації, значення відношення шансів у жінок з РМЗ дорівнювало для мутантного алеля 2,14 (ВШ=2,14; ДІ 95 % 0,63–7,25; $\chi^2=1,51$). Таким чином, наявність мутантного алеля досліджуваного поліморфізму не можна вважати маркером ризику РМЗ.

Така ж ситуація реалізується й щодо зустрічальності поліморфізмів гена *DDK4* (рис. 5.6, 5.7).

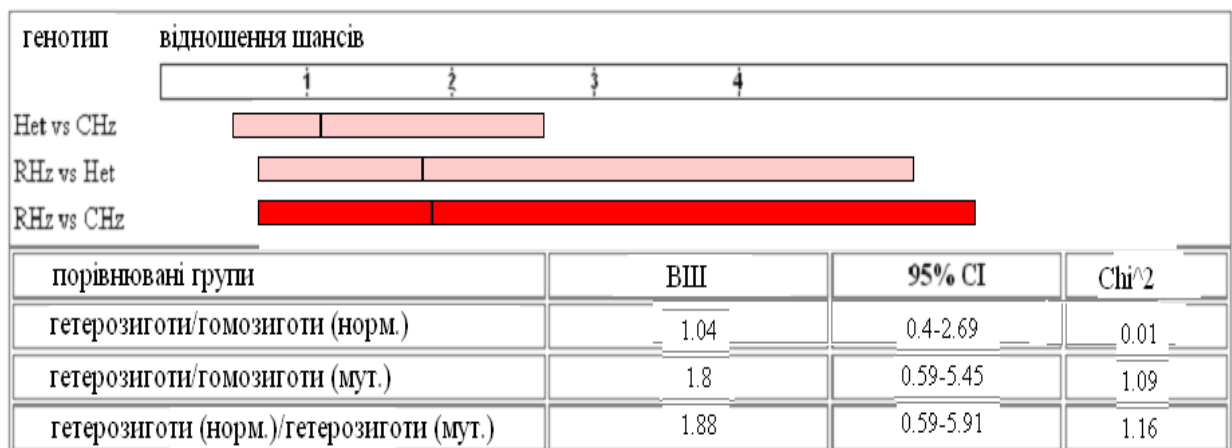


Рис. 5.6 Порівняння частоти поліморфізмів гена *DDK4* у жінок з доброякісною дисплазією молочної залози і здорових жінок

Так, для співвідношення гомозиготних генотипів за мутантним і нормальним алелями гена *DKK4* у жінок з ДДМЗ одержані такі значення: ВШ=1,88 (ДІ 95 % 0,59–5,91), а у жінок з РМЗ – відповідно ВШ=1,98 (ДІ 95 % 0,60–6,51).

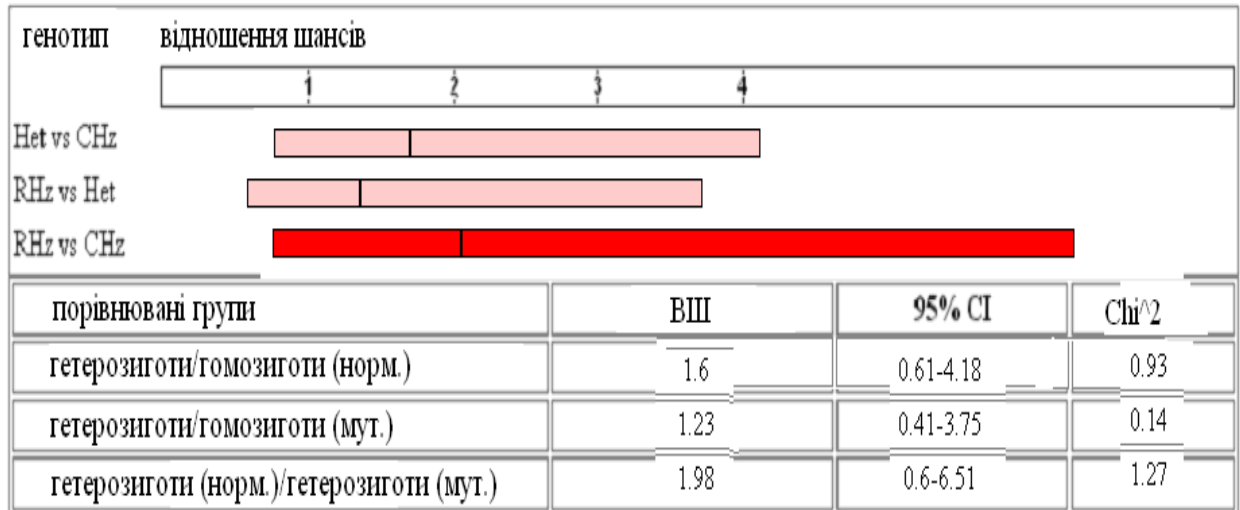


Рис. 5.7 Порівняння частоти поліморфізмів гена *DKK4* у жінок з раком молочної залози і здорових жінок

При оцінці розподілу різних генотипів у вибірковій сукупності встановлено, що у жінок з РМЗ розподіл гомозиготних і гетерозиготних генотипів не відповідав рівнянню Харді–Вайнберга ($\chi^2 = 26,89$; $p < 0,001$), тимчасом як у жінок з ДДМЗ і жінок контрольної групи розподіл генотипів був рівноважний ($\chi^2 = 0,08$ та $\chi^2 = 0,05$ відповідно).

Таким чином, при вивченні поширеності поліморфізмів досліджуваних генів ми встановили, що їх наявність як у гетерозиготному, так і гомозиготному стані практично не впливає на ризик виникнення РМЗ, тобто у пацієнтів з ДДМЗ та РМЗ мутантні алелі rs3763511 гена *DKK4* та rs8190924 *GSR* трапляються однаково часто. Однак, зважаючи на важливість епігенетичної регуляції експресії генів, на наступному етапі дослідження ми приділили основну увагу саме пошуку епігенетичних маркерів.

В іншому нашому дослідженні було показано, що частота визначення поліморфізму TT (rs4973768) у гені *SLC4A7* у хворих на РМЗ зростає. Відношення шансів ризику розвитку РМЗ для цього гена становило 1,89 (ДІ 95 % 1,01–3,397; $p < 0,047$), відносний ризик — 1,7 ($p < 0,049$). Відношення шансів для поліморфізму rs3803662 становило 1,49, для rs889312 — 1,59 і для rs2981582 — 1,29.

Представлені у розділі результати досліджень були опубліковані у таких фахових виданнях:

1. Швидкий і надійний тест для типування поліморфізмів у генах *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* і *FGFR2*, пов'язаних із ризиком розвитку раку молочної залози, методом піросеквенування / В. М. Запорожан, В. Г. Дубініна, В. В. Бубнов, Р. П. Ромак // Одеський медичний журнал. – 2013. – Т. 200, № 3. – С. 70-78.
2. Zaporozhan V.N. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in Wnt Signaling Pathway Genes with Breast Tumours / V. N. Zaporozhan, R. P. Romak // Europäische Fachhochschule. – 2013. – Bd. 7. – S. 68–69.

РОЗДІЛ 6

ЕПІГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *DKK4* ТА *GSR* ПРИ ПУХЛИНАХ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Як видно з наведеного нижче рис. 6.1, у здорових жінок інтенсивність метилування не перевищувала 7 %.

З огляду на високу продуктивність методу піросеквенування, який був використаний у даному дослідженні, можна передбачити, що саме він має бути рекомендований для потреб ранньої діагностики проліферативних захворювань молочної залози.

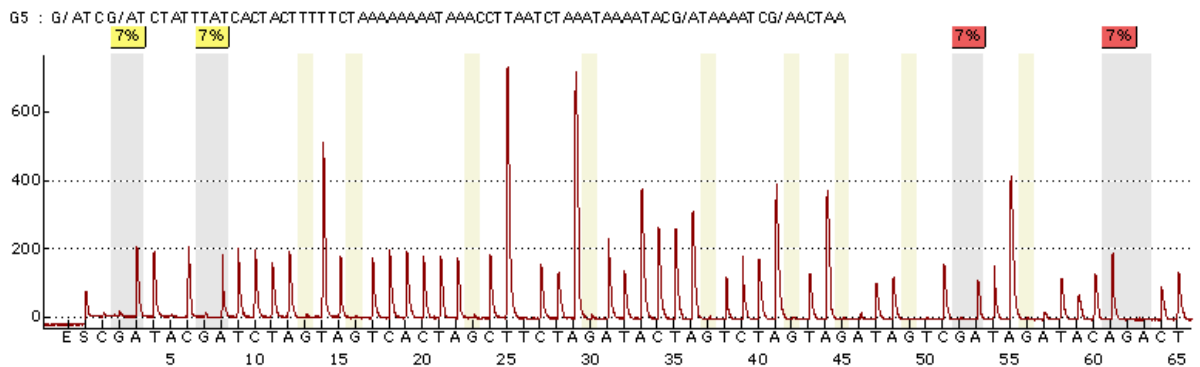


Рис. 6.1 Ступінь метилування гена *DKK4* у здорових жінок

Натомість, у хворих з фіброаденомою молочної залози результати піросеквенування показали наявність метильованих ділянок у 38,0 % випадків (рис. 6.2).

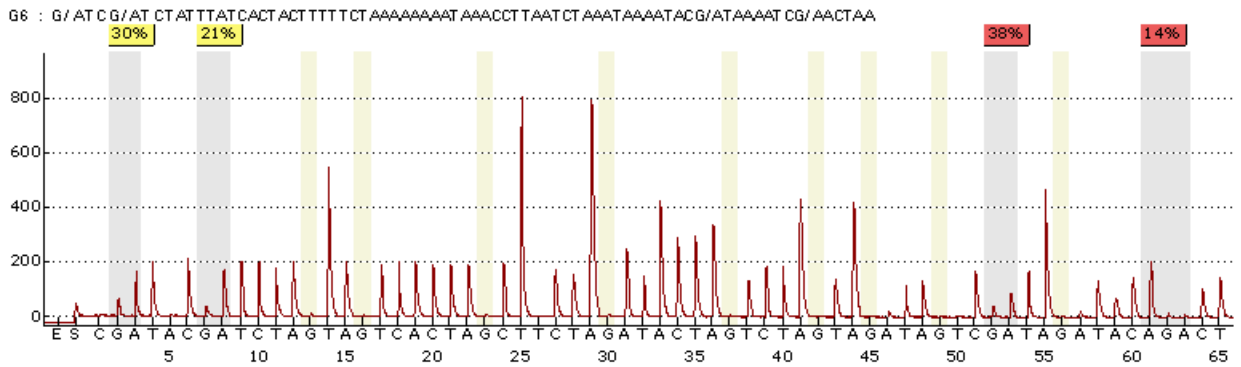


Рис. 6.2 Ступінь метилування гена *DKK4* у хворих з доброякісною дисплазією молочної залози

Нарешті, найвищі рівні метилування були притаманні хворим із верифікованим РМЗ (рис. 6.3).

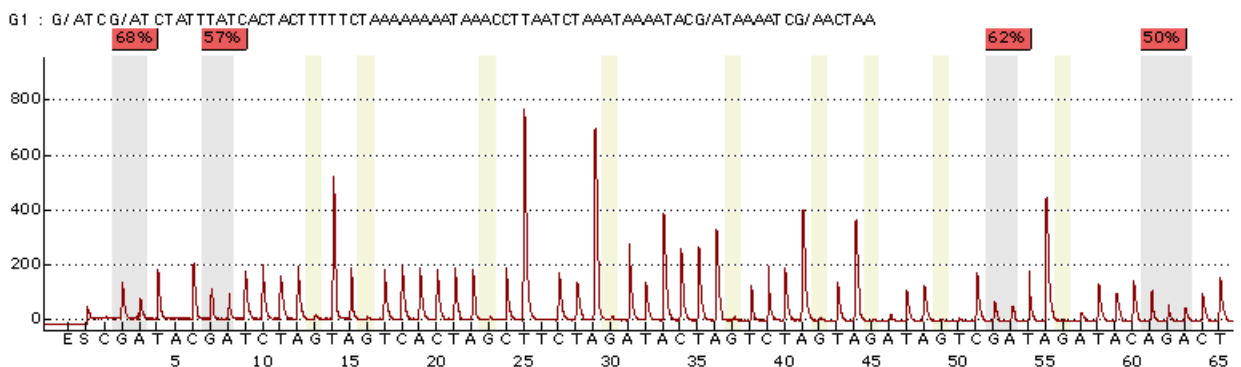


Рис. 6.3 Ступінь метилування гена *DKK4* у хворих на рак молочної залози

Як видно з наведеного рис. 6.3, інтенсивність метилування сягала близько 62,0 %, що призводило до суттєвого пригнічення активності гена.

Загалом епігенетичні порушення є найважливішими атрибутами клітини з уже ініційованим процесом малігнізації, причому на ранніх етапах розвитку злоякісної трансформації, згідно з результатами наших досліджень, порушення статусу метилування виникають задовго до розвитку клінічно вираженого раку. Таким чином, вивчення епігенетичного статусу геному при раку є необхідним елементом для більш повного розуміння механізмів

онкотрансформації та для виявлення нового покоління біомаркерів схильності та прогнозу з метою ранньої діагностики онкологічних захворювань. Дослідження епігенетичних аномалій при злоякісних новоутвореннях ускладнюється внутрішньопухлинною гетерогенністю. Вона виражається в наявності в одній пухлині кількох пухлинних клонів, кожен з яких має свій власний унікальний набір генетичних аномалій, у тому числі епігенетичних порушень. Саме тому при епігенетичних дослідженнях необхідно особливо ретельно підходити не тільки до вибору методів аналізу, але і до інтерпретації отриманих результатів.

При порівнянні активності метилування гена *GSR* (табл. 6.1) встановлено, що у групі пацієток з РМЗ середні значення цього показника на порядок перевищували відповідні значення, встановлені у хворих на ФКМ.

Таблиця 6.1

Активність метилування гена *GSR* у обстежених хворих

Група порівняння	n	M	Me	min	max	25 %	75 %	σ	m
РМЗ	29	51,6	49,1	28,4	78,8	42,9	62,0	13,6	2,5
ФКМ	30	4,9	2,0	0,0	19,7	0,0	8,2	6,6	1,2

Враховуючи наявність статистично значущих відмінностей за віком пацієток з РМЗ і ФКМ, для виключення впливу вікового фактора були розраховані зважені коефіцієнти активності метилування (див.табл. 6.1).

При їх порівнянні нами визначено, що відмінності між групами є статистично значущими ($Z=4,7$; $p=3,0 \times 10^{-6}$). Таким чином, при значеннях активності метилування гена *GSR* у пацієток з пухлинами молочної залози

менше 17,8 % ($M+1,96\sigma$) ймовірність злякисного новоутворення є дуже малою.

Для РМЗ є притаманною активність метилування гена *GSR* вище 24,9 % (табл. 6.2). При значеннях активності метилування гена в діапазоні 17,8–24,9 % рішення про характер пухлинного процесу слід приймати з використанням додаткових діагностичних критеріїв.

Враховуючи наявність статистично значущих відмінностей за віком пацієнток з РМЗ і ФКМ для виключення впливу вікового фактора були розраховані зважені коефіцієнти активності метилування.

Слід також зазначити, що у 15 (50,0 %) жінок з ДДМЗ метилування гена *GSR* було відсутнє. Цим пояснюються висока дисперсія показника у групі (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Активність метилування генів *GSR* та *DKK4* у обстежених хворих ($M\pm m$)

Група порівняння	n	<i>GSR</i>	<i>DKK4</i>
РМЗ	30	51,6±2,5	43,3±4,8
ФКМ	30	4,9±1,1	23,2±3,4

Крім того, кількість метильованої ДНК гена *DKK4* у зразках аденокарциноми була значно вищою ніж у жінок з доброякісними пухлинами молочної залози (див.рис. 6.4).

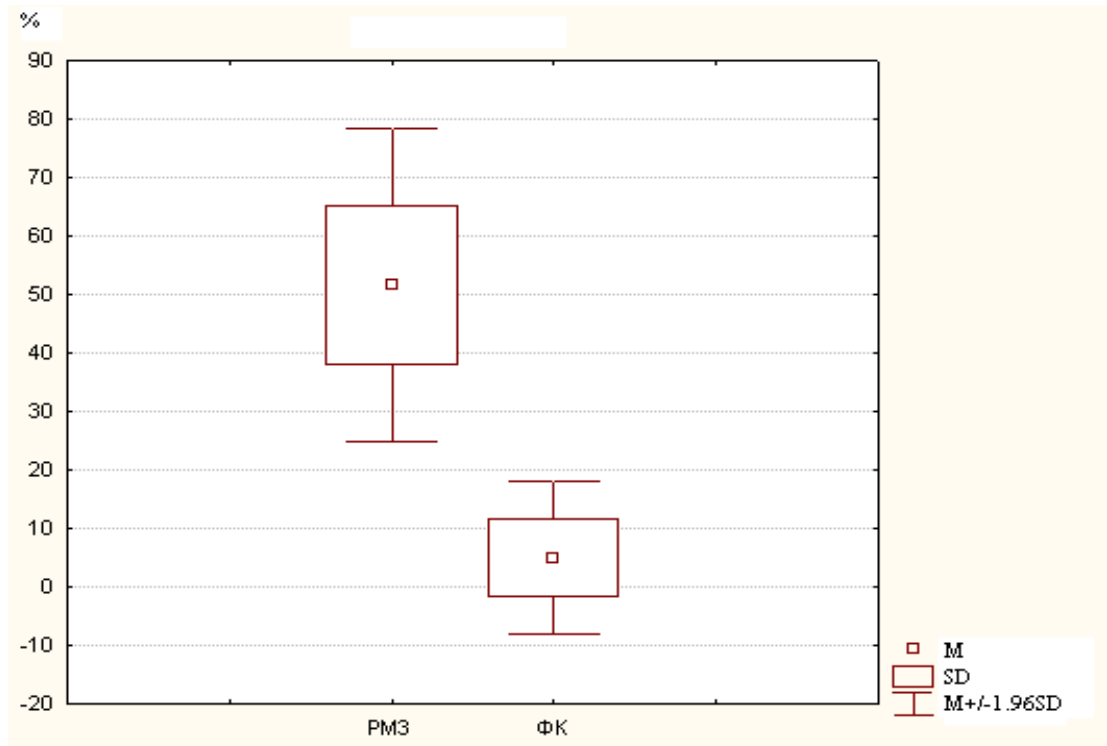


Рис. 6.4 Довірчі інтервали активності метилування гена *GSR* у групах порівняння

Під час пухлинного росту картина епігенетичної модифікації, як правило, змінюється таким чином, що загальний рівень метилування геному істотно знижується, тимчасом як регуляторні ділянки істотно меншої частини генів (найчастіше генів-онкосупресорів), навпаки, гіперметилуються і пригнічуються. Відповідно, якщо зміна нормального метилування в якому-небудь з генів відіграє важливу роль у розвитку РМЗ, то встановлення такого феномена сприятиме не лише кращому розумінню патогенезу цього захворювання, але й може виявитися свого роду епігенетичним маркером даного захворювання.

У нашому дослідженні кількість метильованої ДНК гена у зразках аденокарциноми є значно вищою ніж у жінок з доброякісними пухлинами молочної залози (рис. 6.5).

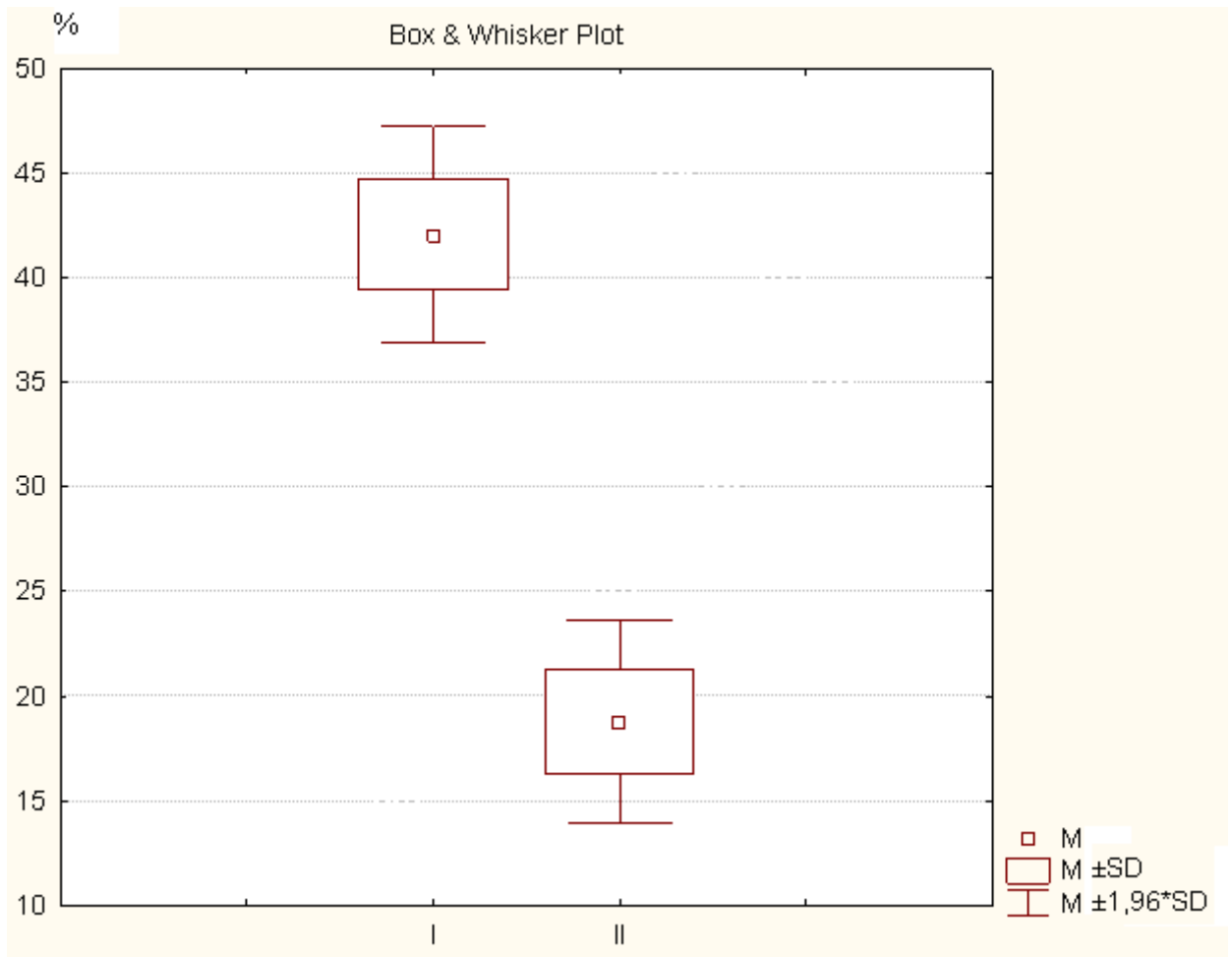


Рис. 6.5 Рівень метилування гена *DKK4*

У зв'язку з біоетичними обмеженнями відбір зразків тканини молочної залози у практично здорових жінок був унеможливлений, однак відповідно до літературних даних, активність метилування даного гена у незмінній залозистій тканині молочної залози не перевищує 2,0 % [12].

На рис. 6.6 наведені результати напівкількісного дослідження активності метилування гену *GSR* у пацієнтів з верифікованим РМЗ, ДДМЗ та у здорових жінок. Як видно з наведених даних, більш високі рівні метилування були притаманні насамперед злоякісним новоутворенням. При цьому за чутливістю та специфічністю напівкількісний метод COBRA не поступався методу піросеквенування.

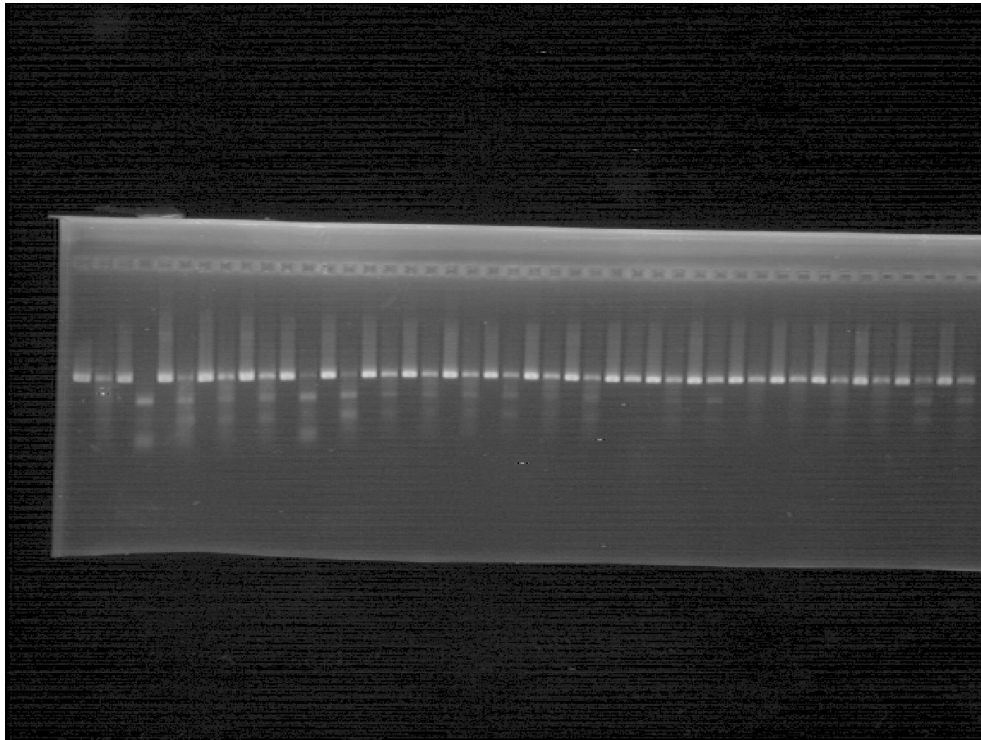


Рис. 6.6 Результати дослідження метилування гену GSR пів кількісним методом COBRA

Таким чином, активність метилування у тканинах доброякісних новоутворень перевищує нормальну активність у 5–9 разів (із урахуванням 95 % ДІ), а при інвазивному РМЗ – у 15–25 разів. Втім, ці значення є дещо меншими, ніж знайдені деякими дослідниками раніше [8, 9, 12].

При порівнянні екстремумів рівня метилування у різних зразках біологічної тканини визначена зона значень, для якої можливість однозначної відповіді про природу пухлинного процесу на підставі аналізу даного показника є низькою. Вбачається перспективним поєднувати дослідження особливостей епігенетичної регуляції генів, залучених у патогенез розвитку РМЗ, із дослідженням поширеності функціональних поліморфізмів відповідних генів-кандидатів.

Таким чином, високий рівень метилування гена *DKK4* є притаманним злоякісним пухлинам молочної залози. З другого боку, активність

метилування у тканинах доброякісних новоутворень перевищує нормальну активність у 5–9 разів (із урахуванням 95 % ДІ), а при інвазивному РМЗ – у 15–25 разів. Це свідчить про доцільність застосування кількісної оцінки метилування гена *DKK4* та інших генів у діагностиці пухлин молочної залози.

Представлені у розділі результати досліджень були опубліковані у таких фахових виданнях:

1. Ромак Р. П., До питання диференційної діагностики пухлин молочної залози: епігенетична регуляція проліферації як маркер пухлинного процесу. Р. П. Ромак, О. І. Ромак //Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2013. – № 3, – С. 31-34.

2. Р. П. Ромак ., В. М. Запорожан ., В. Г. Дубініна ., В. В. Бубнов. Швидкий і надійний тест для типування поліморфізмів у генах *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* та *EGFR2* пов'язаних с ризиком розвитку раку молочної залози методом піросеквенування//Одеський медичний журнал. – 2013. – Т. 200, № 3. – С. 70-78.

3. Romak R.P., Association of Single Nucleotide Polimorphisms in Wnt Signalig Pathway Genes with Brest Tumours/ R. P. Romak ., V. N. Zaporozhan // European Applieg Sciences. – 2013. – N 7. – P. 68 – 71.

4. Ромак Р.П., Епігенетична регуляція проліферації при доброякісних дисплазіях молочної залози.Р. П. Ромак., В. М. Запорожан //Український медичний альманах–2013, Т. 16, № 3 – С.59 – 61.

5. Romak R.P., Epigenetic regulation of the proliferation in breast tumours/ R. P. Romak ., V. N. Zaporozhan //Journal of Health Sciences. – 2013. – vol 3 (10). P. 233 – 238.

6. Нікітенко Р. П. Молекулярна епідеміологія раку молочної залози Р.П. Нікітенко //15-й., міжнародний медичний конгрес молодих вчених .,м.Тернопіль / – 2011 р.2 – 7-29 квітня. – С.81.

7. Ромак Р.П., Епігенетична регуляція експресії гена DKK4 у жінок з пухлинами молочної залози. Р. П. Ромак., В. М. Запорожан //Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, № 4. – С.233 – 238.

РОЗДІЛ 7

ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Вивчення епідеміології доброякісних захворювань дозволяє виявити загальні фактори ризику з розвитком РМЗ. При аналізі даних, присвячених порівняльному вивченню епідеміології доброякісних захворювань і РМЗ, виявляються певні протиріччя. Деякі дослідники виключають спільність в етіології цих процесів, інші відзначають тотожність факторів ризику. У більш детальних дослідженнях зазначається, що різні форми доброякісних захворювань мають різну епідеміологічну близькість до РМЗ.

Необхідно відзначити, що всі доброякісні захворювання молочної залози є в тій чи іншій мірі фактором ризику для виникнення РМЗ. Однак найбільш небезпечні внутрішньопротокова папілома, полікістоз, вузлові форми мастопатії. Найменший ризик є у фіброаденоми. Іноді РМЗ розвивається і без попередніх доброякісних змін, у всякому разі, без їх клінічних проявів. Слід зазначити, що поділ факторів ризику на різні групи досить умовний. Це, мабуть, пояснюється складними, поліетіологічними аспектами канцерогенезу.

Незважаючи на актуальність проблеми РМЗ, слід зазначити, що на його частку припадає лише 3-5 % усієї патології молочних залоз. Іншу частину складають доброякісні захворювання, які часто вносять у життя жінок значний дискомфорт.

Діагностика РМЗ і доброякісних захворювань ґрунтується на єдиних принципах. Вона повинна мати комплексний характер: обов'язковою є участь лікарів різних спеціальностей – гінеколога, онколога, рентгенолога, спеціаліста з ультразвукової діагностики, морфолога, а також при

необхідності інших фахівців. Враховуючи різке зростання патології молочних залоз, значно більшу роль у діагностичному та лікувальних процесах мають відігравати лікарі акушери-гінекологи. Це найбільш відвідувані жінками фахівці, тому їх онкологічна настороженість може врятувати не одне життя. Не слід забувати про навчання жінок прийомам самообстеження, але й не перевищувати значущість даного методу для виявлення ДНМЗ і ранніх стадій РМЗ.

Незважаючи на те, що різноманітні ДНМЗ, як правило, не становлять загрози малігнізації, на етапі первинного контакту хворої із закладами охорони здоров'я або навіть під час надання кваліфікованої та спеціалізованої медичної допомоги фахівці нерідко стикаються з суттєвими труднощами диференційної діагностики доброякісних і злоякісних новоутворень молочної залози. За даними Bhargava R., et al. (2002), найчастіше труднощі при верифікації діагнозу доброякісних пухлин молочної залози виникають щодо таких нозологічних форм, як склерозивний аденоз, хвороба Мінца, склерозивні папілярні пухлини [16]. Враховуючи те, що вузлові форми мастопатії, внутрішньопротокові папіломи та інші ДНМЗ підлягають хірургічному лікуванню, є висока імовірність того, що патоморфологічний діагноз буде максимально точним.

Результати попередніх досліджень показали, що ризик розвитку РМЗ при ДНМЗ підвищується на 56 %. Це підвищення ризику відзначалося протягом 25 років після видалення ДНМЗ. Крім того, тип виявленого доброякісного новоутворення впливає на можливість розвитку раку молочної залози в майбутньому. Зокрема, у пацієток з атиповою гіперплазією ризик розвитку РМЗ збільшувався у 4,2 разу. У пацієток з проліферативними змінами без атипії клітин ризик розвитку РМЗ становив 88 %, а при

непроліферативних змінах – не перевищував 27 %, що відповідає середньопопуляційному рівню [17-20, 91].

Сьогодні єдиним реальним шляхом успішного зниження захворюваності та смертності жіночого населення від РМЗ є поліпшення якості ранньої діагностики [21–23]. Разом з клінічним оглядом, УЗД та мамографією, в діагностиці захворювань молочної залози широко використовується цитологічне дослідження виділень з соска молочної залози чи пунктату пухлини. Виділяючись простотою одержання матеріалу й специфікою картин різних патологічних процесів, цитологічне дослідження є повноцінним методом морфологічної верифікації діагнозу. Тонкоголкова аспіраційна пункційна біопсія посідає перше місце серед методів, що дозволяють встановити правильний морфологічний діагноз до операції та при динамічному спостереженні [24]. Разом із тим цитологічне дослідження, як і інші діагностичні методи, має певні обмеження, які можуть залежати від способу одержання матеріалу, локалізації патологічного осередку, особливостей його гістологічної будови, а також кваліфікації лікаря-цитолога [23, 25, 26].

Аналіз одержаних даних показав, що перебіг ДНМЗ був стереотипним. Найбільш частими скаргами були наявність ущільнення в молочній залозі, біль, що посилювався у міжменструальний період, набрякання молочної залози. При пальпації у хворих на локальний фіброаденоматоз молочної залози визначалося ущільнення залозистої тканини, наявність окремо дифузно розташованих вузликів, які були не різко відмежованими від суміжних тканин.

Аденози, тобто доброякісні проліферативні процеси, локалізуються переважно у часточковому (ацинарному) компоненті молочної залози. При цьому відзначалися незначні структурні зміни протокових і часточкових

структур, обмежених шаром епітеліальних і міоепітеліальних клітин при збереженні базальної мембрани.

У п'яти випадках фіброаденоми було виявлено під час мамографічного дослідження.

Для фіброаденом периканалікулярної будови була характерна правильна округла форма, рівні, чіткі контури та досить однорідна структура. Периканалікулярна фіброаденома молочної залози, як правило, чітко відмежована від оточуючих тканин, малюнок будови її однорідний і представлений в основному плотноволокнистою фіброзною сполучною тканиною, яка концентрично розросталася навколо здавлених проток. На рентгенограмі це додавало велику щільність вузлу в порівнянні з іншими різновидами фіброаденом .

По периферії пухлини розвивається сполучна тканина нерідко формує фіброзну капсулу, яка на рентгенограмі обумовлює чіткість і рівність контуру. Ця форма фіброаденоми часто піддається інволютивними і дистрофічних змін з відкладенням в стромі кальцинатів, що отримує своє відображення на рентгенограмі.

Для фіброаденом змішаної будови була характерна часточкова будова, горбкуваті, нечіткі контури, найчастіше без "обідка просвітлення", неоднорідна структура вузла, частіше без звапнення.

Сонографічно картина фіброаденом молочної залози також змінювалася залежно від гістологічної будови, але не так помітно, як при рентгенографії. При периканалікулярному варіанті контури, як правило, були більш чіткі за рахунок наявності капсули. Для фіброаденом змішаної будови були характерні контури, що відображали часточкову будову.

Подальший аналіз показав, що середній вік обстежених становив (28,2 ± 0,7) року. Професійні шкідливості в анамнезі визначалися лише у 11 (19,6

%) жінок. На обтяжений спадковий анамнез щодо патології молочної залози вказували 49 (87,5 %) пацієток, випадки РМЗ у родичого першого ступеня (сибсів або по висхідній лінії), за нашими даними, відмічалися у 17 (30,4 %) пацієток.

Середній вік обстежених дорівнював ($51,5 \pm 1,8$) року у групі хворих на РМЗ й ($35,3 \pm 1,5$) року у групі пацієток з ФКМ. Найчастіше у пацієнтів з ДНМЗ реєструвалася фіброаденома (19 випадків, або 38,3 %), значно рідше локальний фіброаденоматоз (6,6 %), аденоматоз (6,6 %), солітарні кісти молочної залози тощо.

Обтяжений гінекологічний та спадковий анамнез було визначено у кожної другої пацієтки з ДДМЗ та у 72,4 % випадків – у хворих на РМЗ. У більшості (60,3 %) пацієток з ДДМЗ були супровідні гінекологічні захворювання, найбільш часто з яких визначався синдром полікістозних яєчників, ендометріоз та міома матки. У групі пацієток з РМЗ супровідна гінекологічна патологія визначалася у кожному другому випадку.

У пацієток з РМЗ найчастіше виявлялися пухлини у стадії T2 (23 випадків тобто 79,3 %), рідше T1 (10,3 %), в поодиноких випадках – більш давнені стадії. У трьох випадках визначено метастазування в регіональні лімфатичні вузли (N1-2). Віддалених метастазів не було у жодної пацієтки.

При порівнянні активності метилування гена *GSR* (табл. 1) встановлено, що у групі пацієток з РМЗ середні значення цього показника на порядок перевищували відповідні значення, встановлені у хворих на ФКМ.

При співставленні зважених коефіцієнтів активності метилування встановлено, що відмінності між групами є статистично значущими ($Z=4,7$ $p=3,0 \times 10^{-6}$). Таким чином, при значеннях активності метилування гену *GSR* у пацієток з пухлинами молочної залози менших 17,8% ($M+1,96\sigma$)

Ймовірність злякисного новоутворення є незначною. Натомість, для РМЗ є притаманною активність метилування гену *GSR* вище 24,9%. Завдяки тому, що у жінок з ФКМ у 15 (50,0%) випадків метилування гену *GSR* було відсутнє дисперсія показника у групі була високою

Подібна ситуація спостерігалася й щодо оцінки інтенсивності метилування гена *DKK4*, яка у зразках аденокарциноми був значно вищим ніж у жінок з ДНМЗ. Зокрема, активність метилування у тканинах доброякісних новоутворень перевищувала нормальну активність у 5-9 разів, а при інвазивному раку молочної залози – у 15-25 разів.

Являють значний інтерес результати оцінки поширеності поліморфізмів генів *DKK4* та *GSR* встановлено, що гомозиготні варіанти патологічно обтяжених алелів зустрічаються лише у 4,0-8,0% випадків.

При оцінці розподілу різних генотипів у вибірковій сукупності встановлено, що у жінок з верифікованим РМЗ розподіл гомозиготних та гетерозиготних генотипів не відповідало рівнянню Харді-Вайнберга ($\chi^2 = 26,89$ $p < 0,001$), тимчасом як у жінок з ДДМЗ та жінок контрольної групи розподіл генотипів був рівноважний ($\chi^2 = 0,08$ та $\chi^2 = 0,05$, відповідно). Співвідношення між спостережуваною та очікуваною гетерозиготністю у пацієнтів I групи становило 0.79, II групи - 0.86, III групи - 1.03

Обговорюючи наведені дані, слід зазначити, що доброякісні й злякисні новоутворення молочної залози мають комплекс взаємнообумовлених патогенетичних ланок, серед яких велике значення мають гормональні та імунні порушення [52-56]. За останні роки досягнутий значний прогрес у клінічному використанні різних біологічних маркерів прогнозу та сприйнятливості. У їх числі різноманітні онкогени, оцінка функціонального стану рецепторів естрогенів і прогестерона, маркери апоптоза, рецептори факторів росту тощо. Всі ці показники дозволяють більш детально вивчити

молекулярно-біологічні особливості проліферативних захворювань молочної залози, асоціюються зі ступенем диференціювання та здатністю до малігнізації, а, отже, з особливостями перебігу й прогнозом захворювання в кожному конкретному випадку [78-81, 92].

Слід зазначити, що процеси патоморфозу при ДНМЗ є пов'язані зі змінами у репродуктивній системі. Таким чином, є висока можливість виникнення патологічних змін у молочній залозі при різних гінекологічних захворюваннях, які призводять до порушень регуляції у системі «гіпоталамус-гіпофіз-яєчники» [78, 79].

Підтвердження цьому було одержано ще у 40-х роках минулого сторіччя, коли Taylor H. C. виявив позитивну кореляцію між частотою захворювань геніталій і патологією молочної залози [93]. За даними деяких авторів, одночасні захворювання молочної залози і геніталій трапляються у 70–97 % випадків [57, 58, 94]. Так, Бурдіна Л. М. (1993) вивчала стан молочних залоз при різних нейроендокринних захворюваннях. Були виділені групи ризику з розвитку захворювань молочних залоз. Найбільший ризик був виявлений у хворих із гіперпластичними процесами геніталій (ендометріоз, міома матки, гіперплазії ендометрія). Саме при цих гінекологічних захворюваннях відзначено найвищу частоту патологічних змін молочних залоз [94].

Бурдіна Л. М. (1993), Кіра Є. Ф. і співавт. (2000) спостерігали найбільш тяжкі прояви виражених форм мастопатії при ендометріозі [94, 95]. Можливо, це пов'язано з тим, що ендометріодні ектопії негативно впливають на гормональну й овуляторну функцію яєчників, що, у свою чергу, проявляється ановуляцією та недостатністю лютеїнової фази. За даними багатьох авторів, при ендометріозі часто виявляються вузлові новоутворення в молочній залозі [96, 97]. Натомість, комплексне лікування ендометріозу

сприяє відносній стабілізації гормонального статусу жіночого організму, а згодом і поліпшенню стану молочної залози [96].

Інші автори у жінок з міомою матки виявили проліферативні форми мастопатії з перевагою залозистого компонента. У хворих з міомою матки частіше визначалися вузлові проліферати, ніж в інших категорій гінекологічних хворих [98]. Сидорова І. З. і співавт. (1999) у своїх дослідженнях відзначили зростання частоти РМЗ у хворих з міомою матки в постменопаузі [99]. Піддубний М. І. (1994) виявив регресію патологічних змін у молочній залозі після надпівхової ампутації матки із придатками у хворих на міому матки [100]. Подібні дані одержані й іншими дослідниками [101–105].

За іншими даними, при гіперпластичних процесах ендометрія частіше спостерігаються інволютивні процеси в молочній залозі [109]. Більшість дослідників відзначає підвищення частоти виникнення ДНМЗ та РМЗ у жінок з гіперплазіями ендометрія в постменопаузі [14, 56, 57, 106, 110, 111].

У хворих з гіперандрогенією в основному відзначаються фіброзно-кістозні зміни молочних залоз із яскраво вираженим фіброзним компонентом. Ці хворі мають дещо менший ризик розвитку патологічних змін в молочній залозі, ніж жінки з нормальним гормональним профілем [112–116]. Водночас деякі автори відзначають більш часті регресивні зміни у тканині молочної залози при гіперандрогеніях [14, 112, 113].

У патогенезі змін молочної залози при гіперпролактинемії відіграють роль не стільки підвищення рівня пролактину, скільки індуковане через центральні механізми регуляції гонадотропінів зниження функції яєчників, що проявляється гіпоестрогенією. У хворих з високим рівнем секреції пролактину переважають інволютивні процеси в молочній залозі [117–124]. При функціональній гіперпролактинемії Серов В. Н. і співавт. (1998) виявили

жирову інволюцію в 24 % випадків, а в 45,7 % випадків – гіперпластичні процеси в молочних залозах [121]. Втім, у нашому дослідженні кількість пацієнток із супровідною гіперпролактинемією не перевищувала 10 %.

При склерополікістозі яєчників деякі автори виявили в молочній залозі гіпопластичні зміни з переважанням у морфологічній картині жирової тканини й нерізко вираженим фіброзним компонентом [94], а Серов В. М. і співавт.(1998) відзначили у цієї категорії хворих більшу частоту розвитку мастопатії [121]. Ці дані збігаються із результатами наших досліджень.

Деякі автори при запальних процесах матки й придатків у 85 % жінок виявляли патологічні зміни молочних залоз [56, 57, 101, 125-132]. Це є цілком природним, тому що запальні процеси геніталій можуть бути причиною значних структурних і функціональних змін гіпоталамо-яєчничкової системи, які, у свою чергу, можуть сприяти виникненню дисгормональних дисплазій та іншої патології молочної залози [101, 102, 125, 126]. Багато авторів вказують на те, що запальні процеси геніталій є сприятливим фактором розвитку мастопатії [56, 57, 133–135]. Є дослідження, що показують роль *Trichomonas vaginalis* та іншої специфічної флори у розвитку фіброзно-кистозної хвороби. Передбачається, що трихомонадна інфекція може викликати дисплазію епітелію молочної залози [133]. Водночас Бурдіна Л. М. (1993) у своїх дослідженнях показала, що запальним процесам геніталій не належить провідна роль у формуванні патологічних змін молочної залози, тому що частота й ступінь вираженості змін у молочних залозах при цих захворюваннях набагато менші, ніж при нейроендокринних хворобах [94].

На думку деяких фахівців, при ДНМЗ і проліферативній мастопатії на тлі міоми матки й ендометріозу найчастіше відзначаються гіперестрогенія, прогестеронова недостатність, зниження базальної секреції ФСГ; при

запальних захворюваннях геніталій – гіперпролактинемія, порушення рівнів ТТГ, Т3 і Т4; підвищення показників біогенних амінів, гіперпродукція оксиду азоту; при порушенні менструальної функції – недостатність прогестерону, дисбаланс тиреоїдних гормонів, зниження активності ензимів антиоксидатного захисту [57–61, 82, 136, 137].

Отже, більшість дослідників вважають, що ризик розвитку захворювань молочних залоз при гінекологічних захворюваннях значно зростає й основною групою ризику є пацієнтки з гіперпластичними процесами геніталій (міома матки, аденоми, гіперплазія ендометрія). Втім, характер змін у молочній залозі й ступінь їхньої впливу на реалізацію ризику патології молочної залози досі є дискутабельними [14, 82].

Садвакасова Г. С. (2010) визначила, що у пацієнток з ДДМЗ спостерігається підвищення вмісту функціонально найбільш активних клітин, що експресують рецептори до інтерлейкіну-2 (CD25+) і рецептори, які сприяють підвищенню адгезивних властивостей клітин (CD11b+) та продукції імунорегуляторного цитокіну інтерлейкіну-2 [138]. На думку автора, це й призводить до порушення гормонального статусу у вигляді підвищення рівня пролактину й естрадіолу та до прогресування хвороби. Втім, переконливих доказів такого патогенетичного зв'язку робота казахського автора не містить.

Часте штучне переривання вагітності (на найбільш ранніх термінах вагітності) призводить до того, що порушення гормональних впливів викликають виражену перебудову залози та загальну гіперплазію залозистого компонента. За нашими даними, ризик виникнення ДНМЗ підвищується при надмірній масі тіла, а також при тривалому психоемоційному напруженні, які призводять до зміни секреторної функції ендокринних залоз. До інших факторів ризику належать пізня перша вагітність (після 30 років), відсутній,

короткий (не більше одного місяця) або довгий (більше одного року) період грудного вигодовування; раннє менархе (до 12 років); ендокринна безплідність (ановуляторна); порушення менструального циклу (дефіцит лютеїнової фази), гінекологічні захворювання (міома матки, ендометріоз, гіперпластичні процеси ендометрія), запальні захворювання молочних залоз (мастит).

Гормональному впливу піддається паренхіма, на яку діють естрогени, прогестерон, пролактин і соматотропний гормон. Опосередковано на тканини молочної залози впливають тиреоїдні гормони та інсулін. У меншій мірі до гормонального впливу схильна строма, в якій можлива гіперплазія під дією естрогенів. Взаємовідношення гормонів і жирової тканини молочної залози вивчені недостатньо. Жирова тканина, адипоцити молочної залози є депо естрогену, прогестерону і андрогенів. Адипоцити не синтезуються у статеві гормони, але активно їх захоплюють з плазми. Під впливом ароматаз андрогени перетворюються в естрадіол і естрон.

Цей процес з віком посилюється, що, можливо, є одним з факторів збільшення ризику розвитку РМЗ. За нашими даними, у жінок після 35 років ризик ДНМЗ збільшується вдвічі (ВШ=1,8; ДІ 95 % 1,3–2,3).

Важливою причиною виникнення диспластичних захворювань молочних залоз вважають порушення балансу статевих стероїдів – естрогену і прогестерону в організмі жінки, внаслідок якого розвивається відносна гіперестрогенія, що призводить до проліферації епітелію альвеол, проток, посиленню активності фібробластів і викликає проліферацію сполучної тканини молочної залози.

Сьогодні передбачаються три рівнозначних, які не виключають один одного, механізми проліферативної дії естрогенів на молочну залозу:

- 1) пряма стимуляція клітинної проліферації за рахунок взаємодії естрадіолу, пов'язаної з естрогенним рецептором з ядерної ДНК;
- 2) непрямий механізм – за рахунок індукції синтезу факторів росту, що діють на епітелій молочної залози авто- або паракринно;
- 3) стимуляція клітинного росту за рахунок негативного зворотного зв'язку, згідно з яким естрогени нівелюють ефекти інгібуючих факторів росту.

Вплив естрогенів на клітинну проліферацію в тканинах молочної залози може здійснюватися також опосередковано – через фактори росту. Стимулюють проліферацію і диференціювання епітеліальних клітин молочної залози і гальмують апоптоз такі фактори росту і протоонкогени: епідермальний фактор росту (ЕФР); інсуліноподібний фактор росту типів I і II (ІПФРІ і ІПФРІІ); α -трансформіруючий фактор росту (ТФР α) і протоонкогени.

Існує також теорія генотоксичної дії естрогенів, згідно з якою метаболіти естрадіолу, зокрема 4-гідроксіестрадіолу 3,4 хінон – проникають у клітину, минаючи естрогенові рецептори, зв'язуються з ядерною ДНК, ушкоджуючи її.

Прогестерон здатний обмежувати вплив естрогенів на тканину молочної залози. Залежно від дози та тривалості впливу прогестерон може потенційно видозмінювати відповідь як нормальних, так і ракових клітин молочної залози на різних рівнях. Це стимуляція продукції 17 β -гідроксистероїддегідрогенази і естронсульфотрансферази, які швидко окиснюють естрадіол в менш активний естрон і потім, зв'язуючи останній, перетворюють його на неактивний естрон-сульфат. Це дозрівання і диференціювання епітелію альвеол, який піддається подальшому клітинному поділу та down-регуляція естрогенних рецепторів у епітелії молочних залоз

проявляються зниженням проліферації клітин, стимульованої естрогенами. Нарешті, це модуляція апоптозу клітин молочної залози за допомогою p53 супресора пухлини та модулювання мітогенних протоонкогенів.

Таким чином, разом зі здатністю прогестерону знижувати експресію рецепторів естрогенів даний гормон зменшує локальну концентрацію активних естрогенів, обмежуючи тим самим стимуляцію проліферації тканин молочної залози.

Подібно до естрогенів, прогестерон також опосередковано впливає на клітинну проліферацію епітелію молочних залоз через фактори росту. Так, прогестерон підвищує експресію трансформуючого фактора росту (ТФР α) і епідермального фактора росту (ЕФР) і знижує експресію ТФР β і інсуліноподібного фактора росту (ІПФРІ). Зазначені вище фактори переважно виробляються стромою молочної залози під впливом прогестерону.

Встановлено, що ЕФР, ТФР α і ІПФРІ викликають проліферацію епітелію, тимчасом ТФР β інгібує її. Свої ефекти фактори росту проявляють відстрочено, а не відразу ж після впливу прогестерону, причому між самими факторами росту існують взаємодії, які проявляються змінами їх експресії та зв'язку з рецепторами.

Різнострамовано діючи на проліферацію, індуковані прогестероном фактори росту, ймовірно, зумовлюють протилежні ефекти прогестерону на тканини. Відзначено, що надлишкова експресія факторів росту може проявитися транзиторним зростанням проліферації з подальшим її пригніченням.

Неоднозначна дія прогестерону на тканини молочної залози також пов'язана з впливом останнього на різні типи рецепторів прогестерону, які бувають двох видів: А і В. Хоча обидва типи рецепторів зв'язуються з

прогестероном, функціональна активність у них різна. Тимчасом як В-тип рецептора забезпечує стимулювальні ефекти прогестерону на клітину, А-тип – супресуючу його активність. У різних тканинах-мішенях прогестерону співвідношення різних типів рецепторів може визначати чутливість цих тканин до дії даного гормону. Як було встановлено, в нормі співвідношення двох типів рецепторів однаково, проте при розвитку диспластичних процесів у молочній залозі в її тканинах починає переважати один з типів рецептора, забезпечуючи тим самим чутливість молочної залози до впливу прогестерону, причому співвідношення двох типів рецепторів варіює серед пацієнток.

Відомо, що розвиток гіперпластичних процесів у молочних залозах відзначається у 52 % хворих з гіперпролактинемією. Патогенетична роль гіперпролактинемії у розвитку мастопатії остаточно не уточнена.

Можливо, з одного боку, зростання вмісту пролактину в сироватці крові може бути тільки маркером центральних (гіпоталамо-гіпофізарних) порушень у системі регуляції репродуктивної функції. Але, з другого боку, надлишок пролактину робить прямий стимулювальний вплив на проліферативні процеси в периферичних органах-мішенях статеві системи, що реалізовується шляхом збільшення вмісту рецепторів до естрадіолу в тканинах молочної залози та підвищення чутливості клітин до дії останнього. Однак роль гіперпролактинемії як фактора ризику РМЗ не доведена.

Питання про роль гіпотиреозу в розвитку РМЗ також не вивчене. Однак доведено, що гіпофункція щитоподібної залози підвищує ризик виникнення дисплазій молочних залоз порівняно зі здоровими жінками в 3,8 разу. У більшості пацієнток з гіпотиреозом є недостатність лютеїнової фази циклу або ановуляторні цикли, а також відбувається підвищена стимуляція лактотрофів гіпофіза тироліберином і, як наслідок, виникає функціональна

гіперпролактинемія, що насамкінець, може призводити до розвитку проліферативних процесів у тканині молочної залози. Існуюча інсулінорезистентність при цукровому діабеті 2 типу та ожирінні супроводжується хронічною компенсаторною гіперінсулінемією та асоційованою з нею активацією проліферативних процесів.

Згідно з отриманими даними, можна зробити висновок, що спадкова схильність до РМЗ зумовлена кількома генами, алельні варіанти яких призводять до невисокого ризику виникнення хвороби, але з високою частотою представлені в популяції. Такі гени можуть діяти спільно, забезпечуючи мультиплікативний ефект. Ідентифікація додаткових генів спадкової схильності до РМЗ або з'ясування ролі варіантів відомих генів є актуальним завданням, однак не менше значення має й визначення характеру взаємодії між різними генетичними детермінантами.

До колокалізованих з *GSR* генів належать *TOX3*, *SLC4A7* та *MAP3K1*. При аналізі наявності спільного білкового домену була визначена група генів, тісно пов'язаних із генами антагоністів wnt-шляху, зокрема *DKK1*, *DKK2*, *DKK3* та *DKK4*. Таким чином, необхідно оцінювати стан епігенетичної регуляції мінімум для двох генів — *GSR* та *DKK4*.

Результати наших досліджень свідчать, що активність метилування у тканинах доброякісних новоутворень молочної залози перевищує нормальну активність у 5–9 разів (із урахуванням 95 % довірчого інтервалу), а при інвазивному РМЗ — у 15–25 разів. Таким чином, доведено, що високий рівень метилування гена *DKK4* притаманний злоякісним пухлинам молочної залози. Виявлена нами висока активність метилування у тканинах доброякісних новоутворень та інвазивного РМЗ обґрунтовує доцільність застосування кількісної оцінки метилування генів *DKK4* і *GSR* у діагностиці пухлин молочної залози.

Прогностична цінність позитивного результату тесту оцінки активності метилування становила для гена *DKK4* 82,6 %, а для гена *GSR* — 73,9 %. Прогностична цінність негативного результату для гена *DKK4* дорівнювала 74,1 %, а для гена *GSR* — 77,8 %. Проведений нами аналіз спільної прогностичної та діагностичної цінності аналізів активності метилування зазначених генів показав, що спільна позитивна прогностична цінність для обох маркерів сягає 95,6 %, спільна негативна прогностична цінність — 92,5 %, а спільна діагностична точність — 94,0 %. Отже, поєднане використання даних маркерів є більш інформативним у ранній діагностиці та прогнозуванні перебігу пухлин молочної залози.

Аналіз генотипів досліджуваних генів виявив, що співвідношення між спостережуваною та очікуваною гетерозиготністю у пацієнтів I групи дорівнювало 0,79; II групи — 0,86; III групи — 1,03. Таким чином, частота поліморфізмів rs3763511 гена *DKK4* та rs8190924 гена *GSR* серед жінок з ДДМЗ і РМЗ практично не відрізнялася (ВШ=1,1; ДІ 95 % 0,9–1,3).

При оцінці розподілу різних генотипів у сукупній вибірці встановлено, що у жінок з РМЗ розподіл гомозиготних і гетерозиготних генотипів не відповідав рівновазі Харді — Вайнберга ($\chi^2=26,89$; $p<0,001$), тимчасом як у жінок з ДДМЗ і жінок контрольної групи розподіл генотипів був рівноважним ($\chi^2=0,08$ та $\chi^2=0,05$ відповідно).

Частота різних алелів досліджуваних поліморфізмів для мутантного алеля гена *GSR* у пацієток I групи становила 0,4, II групи — 0,84, III групи — 0,73, тобто не мала статистично значущих відмінностей.

Відношення шансів у жінок з ДДМЗ не перевищувало для мутантного алеля 0,51 при довірчому інтервалі 0,16–1,63 ($\chi^2=1,32$; $p>0,05$). Відношення шансів у жінок з РМЗ дорівнювало для мутантного алеля 2,14 (ДІ 95 % 0,63–

7,25; $\chi^2=1,51$). Для співвідношення гомозиготних генотипів за мутантним та нормальним алелями гена *DKK4* у жінок з ДДМЗ одержані такі значення: ВШ=1,88; ДІ 95 % 0,59–5,91, а у жінок з РМЗ — ВШ=1,98; ДІ 95 % 0,60–6,51.

На підставі одержаних даних нами розроблений алгоритм діагностики та прогнозування перебігу пухлин молочної залози (рис. 7/1), який передбачає, поряд з проведенням рутинних тестів, застосування епігенетичних тестів метилування генів *DKK4*, *GSR*.

За наявності додаткових факторів ризику виникнення ПЗМЗ (гінекологічні захворювання, ендокринні порушення, пізні менархе, вік після 35 років, обтяжений спадковий анамнез) відповідно до даного алгоритму проводиться дослідження функціональних поліморфізмів генів *DKK4*, *GSR*, *TOX3*, *SLC4A7* та *MAP3K1*.

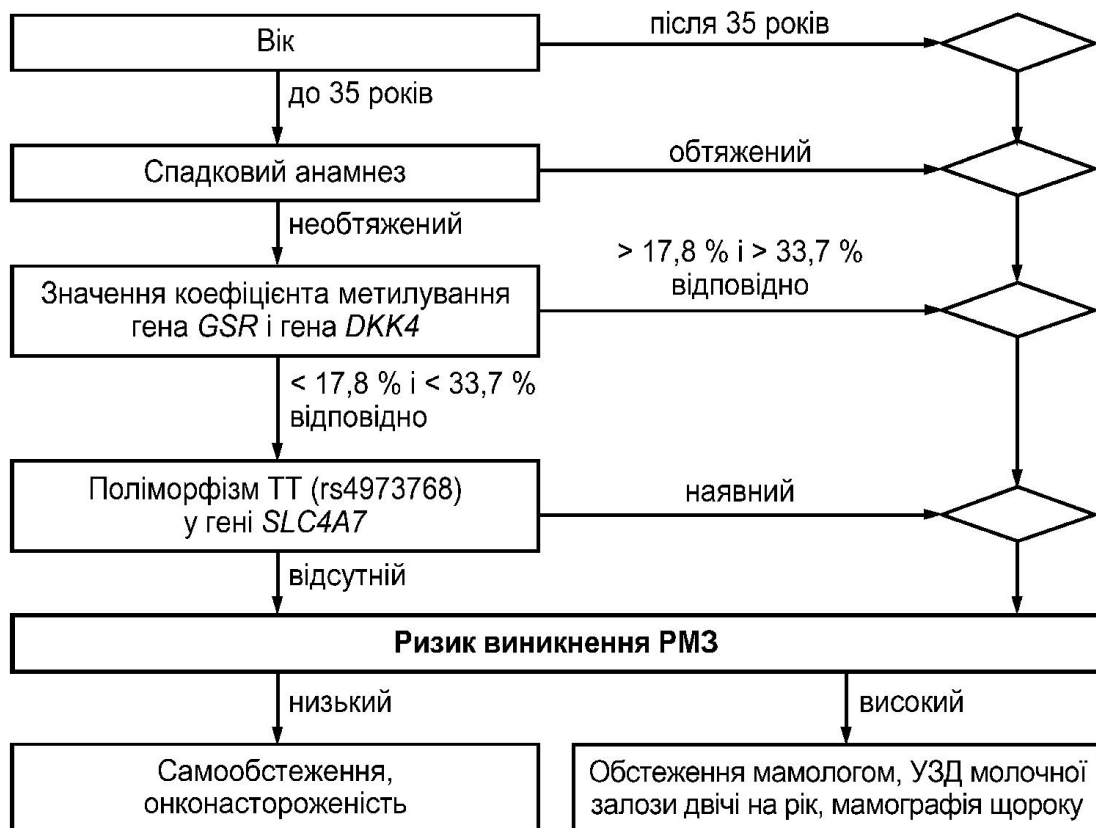


Рис. 7.1. Алгоритм діагностики та прогнозування перебігу пухлинних процесів при локальних формах доброякісної дисплазії молочної залози

У пацієток з локальними формами ДДМЗ виконують епігенетичне дослідження активності метилування генів *DKK4*, *GSR* у біоптаті тканини молочної залози. При значеннях коефіцієнта метилування гена *GSR* менше 17,8 % і гена *DKK4* менше 33,7 % ризик виникнення РМЗ є низьким. Запровадження даного алгоритму дозволило на 12,3 % збільшити точність прогнозування розвитку РМЗ у пацієток з проліферативними процесами молочної залози за рахунок збільшення показника прогностичності позитивного результату, яка для чинного клінічного протоколу становила 80,2 %.

Наведені у розділі дані були опубліковані у таких фахових виданнях:

1. Ромак Р. П., До питання диференційної діагностики пухлин молочної залози: епігенетична регуляція проліферації як маркер пухлинного процесу. Р. П. Ромак, О. І. Ромак //Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2013. – № 3, – С. 31-34.
2. Р. П. Ромак ., В. М. Запорожан ., В. Г. Дубініна ., В. В. Бубнов. Швидкий і надійний тест для типування поліморфізмів у генах *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* та *EGFR2* пов'язаних с ризиком розвитку раку молочної залози методом піросеквенування//Одеський медичний журнал. – 2013. – Т. 200, № 3. – С. 70-78.
3. Romak R.P., Association of Single Nucleotide Polimorphisms in Wnt Signalig Pathway Genes with Brest Tumours/ R. P. Romak ., V. N. Zaporozhan // European Applieg Sciences. – 2013. – N 7. – P. 68 – 71.

4. Ромак Р.П., Епігенетична регуляція проліферації при доброякісних дисплазіях молочної залози. Р. П. Ромак., В. М. Запорожан //Український медичний альманах–2013, Т. 16, № 3 – С.59 – 61.
5. Romak R.P., Epigenetic regulation of the proliferation in breast tumours/ R. P. Romak ., V. N. Zaporozhan //Journal of Health Sciences. – 2013. – vol 3 (10). P. 233 – 238.
6. Пат. 82003 Україна, МПК (2006.01) : А61В10/02.Спосіб прогнозування ризику спонтанного раку молочної залози / Ромак Р.П., Запорожан В. М., Дубініна В. Г., Бубнов В. В., Ромак О. І .; заявник та патентовласник Одес. нац. мед. ун-т. – № u2013 04526; заявл. 11.04.2013; опубл.10.07.2013. Бюл.№ 13.
7. Нікітенко Р. П. Молекулярна епідеміологія раку молочної залози Р.П. Нікітенко //15-й, міжнародний медичний конгрес молодих вчених .,м.Тернопіль / – 2011 р.2 – 7-29 квітня. – С.81.
8. Ромак Р.П., Епігенетична регуляція експресії гена DKK4 у жінок з пухлинами молочної залози. Р. П. Ромак., В. М. Запорожан //Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, № 4. – С.233 – 238.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримано нове рішення актуального наукового завдання з удосконалення діагностики та прогнозування проліферативних захворювань молочної залози шляхом оцінки стану метилування генів *DKK4* та *GSR*.

1. Встановлено, що основними факторами ризику виникнення пухлин молочної залози є наявність гінекологічних захворювань (ВШ=1,5; ДІ 95 % 1,2–1,7) та ендокринних порушень (ВШ=2,2; ДІ 95 % 1,7–2,4), пізнє менархе (ВШ=1,7; ДІ 95 % 1,5–1,9), вік після 35 років (ВШ=2,2; ДІ 95 % 1,7–2,4), обтяжений спадковий анамнез щодо злоякісних і доброякісних новоутворень молочної залози (ВШ=2,4; ДІ 95 % 1,6–3,2).

2. Визначено, що частота поліморфізмів rs3763511 гена *DKK4* та rs8190924 гена *GSR* серед жінок з доброякісними пухлинами та раком молочної залози не відрізняється (ВШ=1,1; ДІ 95 % 0,9–1,3). Частота поліморфізму rs4973768 гена *SLC447* у хворих на рак молочної залози достовірно зростає (ВШ=1,89; ДІ 95 % 1,0–3,4), відносний ризик становить 1,7 ($p \leq 0,049$). При оцінці розподілу різних генотипів у вибірковій сукупності встановлено, що у жінок з раком молочної залози розподіл гомозиготних та гетерозиготних генотипів за дослідженими поліморфізмами не відповідав рівнянню Харді — Вайнберга ($\chi^2=26,89$; $p < 0,001$), тимчасом як у жінок з доброякісною дисплазією молочної залози та жінок контрольної групи розподіл генотипів був рівноважним ($\chi^2=0,08$ та $\chi^2=0,05$ відповідно).

3. Доведено, що вміст метильованої ДНК гена *DKK4* у зразках тканини новоутворень молочної залози у пацієнток з проліферативними захворюваннями молочної залози є достовірно нижчим — $(23,2 \pm 3,4)$ %, ніж у

хворих на рак молочної залози — $(43,3 \pm 4,8)$ % ($p < 0,05$), та достовірно перевищує значення показника у гістологічно умовно нормальній тканині молочної залози — $(1,8 \pm 0,1)$ %.

4. Показано, що вміст метильованої ДНК гена *GSR* у зразках тканини новоутворень молочної залози пацієток з раком молочної залози — $(51,6 \pm 2,5)$ % достовірно вищий ($p < 0,05$), ніж у гістологічно умовно нормальній тканині молочної залози — $(1,5 \pm 0,2)$ % та у жінок із доброякісними захворюваннями молочної залози — $(4,9 \pm 1,1)$ %.

5. Розроблено й впроваджено алгоритм ранньої діагностики та прогнозування раку молочної залози з використанням епігенетичних досліджень, які дозволяють визначити персоналізований ризик виникнення злоякісних новоутворень у жінок із локалізованими формами доброякісної дисплазії молочної залози. При значенні коефіцієнта метилування гена *GSR* менше 17,8 % та гена *DKK4* менше 33,7 % ризик виникнення раку молочної залози є низьким, що дозволяє достовірно збільшити прогностичність позитивного результату на 12,3 %.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. У всіх жінок з пухлинними захворюваннями молочної залози необхідно досліджувати спадковий анамнез для формування груп високого ризику.

2. У жінок з ДДМЗ зі значущими факторами ризику, як от: наявність гінекологічних захворювань (ВШ=1,5; ДІ 95 % 1,2–1,7) та ендокринних порушень (ВШ=2,2; ДІ 95 % 1,7–2,4), пізнє менархе (ВШ=1,7; ДІ 95 % 1,5–1,9), вік після 35 років (ВШ=2,2; ДІ 95 % 1,7–2,4), обтяжений спадковий анамнез щодо злоякісних і доброякісних новоутворень молочної залози (ВШ=2,4; ДІ 95 % 1,6–3,2) — доцільно визначати генетичні маркери, такі як поліморфізм гена *SLC4A7*.

3. У жінок з локальними формами ДДМЗ доцільно визначати вміст метильованої ДНК генів *DKK4* та *GSR*. При значенні вмісту метильованої ДНК гена *GSR* менше 17,8 % та гена *DKK4* менше 33,7 % ризик виникнення РМЗ є низьким. При виявленому високому ризику розвитку РМЗ пацієнтку необхідно раз на півроку обстежувати із застосуванням УЗД і раз на рік проводити мамографічне дослідження

4. У жінок після 40 років дослідження інтенсивності метилування генів *DKK4* та *GSR* доцільно проводити у всіх випадках виникнення пухлин молочної залози за наявності спадкової схильності та інших факторів ризику.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Анализ ассоциаций полиморфизма генов SULT1A1 и UGT1A1 с риском и фенотипом рака молочной железы у русских женщин / Е. Г. Шаталова, В. И. Логинов, Е. А. Брага [и др.] // Медицинская генетика. — 2002. — № 3. — С. 122—125.
2. Антомонов М. Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М. Ю. Антомонов. — К., 2006. — 558 с.
3. Аульченко Ю. С. Методологические подходы и стратегии картирования генов, контролирующих комплексные признаки человека / Ю. С. Аульченко, Т. И. Аксенович // Медицинская генетика. — 2004. — С. 11—20.
4. Байлюк Е. Н. Клинико-морфологические особенности пролиферативных процессов в молочной железе у женщин с миомой матки / Е. Н. Байлюк, Э. К. Айламазян, В. Ф. Семиглазов // Здоровье женщины. — 2008. — № 4. — С. 33—37.
5. Баранова А. В. Гены-супрессоры опухолевого роста / А. В. Баранова, Н. К. Янковский // Молекулярная биология. — 1998. — Т. 32, № 2. — С. 206—218.
6. Беспалов В. Г. Лечение мастопатии и первичная профилактика рака молочной железы / В. Г. Беспалов // Лечащий врач. — 2007. — № 5. — С. 88—89.
7. Бугайцов С. Г. Рак молочной залози — реабілітація, корекція психосоматичних розладів в процесі комплексного лікування : автореф.

дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.07 / С. Г. Бугайов ; АМН України. Ін-т онкології. — К., 2003. — 36 с.

8. Бурдина Л. М. Диагностика и лечение доброкачественных патологических изменений молочных желез / Л. М. Бурдина // Терапевтический архив. — 1998. — № 10. — Р. 37—41.

9. Воробьева Л. И. Актуальность проблемы и пути усовершенствования диагностики и лечения онкогинекологических заболеваний / Л. И. Воробьева // Журнал практичного лікаря. — 2005. — № 1. — С. 38—40.

10. Вторичная профилактика — основной путь снижения смертности от рака молочной железы / В. А. Хайленко, В. А. Агафонов, Р. Ф. Гарькавцева [и др.] // Маммология. — 2007. — № 1. — С. 54.

11. Высоцкая И. В. Дисгормональные дисплазии молочных желез / И. В. Высоцкая, В. П. Летягин, Е. А. Ким // Маммология. — 2006. — № 2. — С. 9—12.

12. Гарин А. М. Десять наиболее распространённых злокачественных опухолей / А. М. Гарин, И. С. Базин. — М., 2006. — 272 с.

13. Гарькавцева Р. Ф. Молекулярно-генетические аспекты злокачественных новообразований / Р. Ф. Гарькавцева, И. В. Гарькавцев // Вестник Российской Академии медицинских наук. — 1998. — Т. 2. — С. 38—44.

14. Генетически обусловленная подразделенность популяций человека по риску развития рака молочной железы у женщин / В. А.

Тарасов, М. М. Асланян, Е. С. Цырендоржиева [и др.] // Доклады Академии наук. — 2006. — Т. 406, № 2. — С. 281—285.

15. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В. С. Баранова. — СПб., 2009. — 528 с.

16. Герштейн Е. С. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы / Е. С. Герштейн // Практическая онкология. — 2002. — Т. 3, №1. — С. 38—45.

17. Гетерогенность семей с наследственной предрасположенностью к раку молочной железы и яичников по встречаемости мутаций в гене BRCA1 II / Поспехова Н. И., Логинова А. Н., Любченко Л. Н., Гарькавцева Р. Ф. // Медицинская генетика. — 2003. — Т. 2, № 11. — С. 459—463.

18. Гинтер Е. К. Эволюция представлений о генетической природе мультифакториальных заболеваний / Е. К. Гинтер // Медицинская генетика. — 2003. — Т. 2, № 4. — С. 146—156.

19. Гольдберг А. П. Можно ли избежать заболеваний молочной железы? / А. П. Гольдберг, А. Н. Козин, Н. Н. Осмоловская // Сестринское дело. — 2007. — № 2. — С. 24—26.

20. Дацюк І. О. Генеалогічні та біологічні особливості спадкового раку молочної залози / І. О. Дацюк, Н. В. Бородай // Онкологія. — 2006. — № 4. — С. 309—314.

21. Дацюк І. О. Спадковий рак молочної залози: клінічні, морфологічні та імуногістохімічні особливості : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.07 / І. О. Пацюк ; НАН України ; Ін-т експерим. патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є Кравецького. — К., 2008. — 19 с.

22. Двенадцатова О. И. Влияние гормональной терапии в циклах индукции овуляции на структуру молочных желез у женщин при бесплодии / О. И. Двенадцатова // *Акушерство и гинекология*. — 2003. — № 2. — С. 21—26.
23. Динамика аномалий метилирования функциональных групп генов при развитии рака молочной железы / Н. А. Скрыбин, Е. Н. Толмачёва, И. Н. Лебедев [и др.] // *Молекулярная биология*. — 2013. — Т. 47, № 2. — С. 302.
24. Диффузные доброкачественные заболевания молочной железы / под ред. В. А. Солодкого, Н. И. Рожковой. — М., 2012. — 124 с.
25. Залетаев Д. В. Онкогеномика и молекулярная диагностика в онкологии. / Д. В. Залетаев, В. Н. Горбунова, О. В. Бабенко. — М., 2001. — 136 с.
26. Злоякісні новоутворення молочної залози С 50. Канцер-реєстр України, 2011 року уточнена інформація. [Електронний формат]. — Режим доступу : [http:// www. ncru. inf. ua/publications/BULL_14/PDF/15-mol. pdf](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_14/PDF/15-mol.pdf)
27. Зубкин В. И. Прогнозирование и диагностика нарушений репродуктивной системы женщин оперированных по поводу доброкачественных опухолей молочных желез / В. И. Зубкин, Г. Е. Золичев, И. М. Ордянц // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. — 2002. — № 1. — С. 240—241.

28. Иванов В. Г. Эпидемиологические факторы риска рака молочной железы. Ранняя диагностика / В. Г. Иванов // Практическая онкология. — 2002. — Т. 3, № 1. — С. 1—6.
29. Киселев Ф. Л. Гены стабилизации ДНК и канцерогенез / Ф. Л. Киселев // Молекулярная биология. — 1998. — Т. 32, № 2. — С. 197—205.
30. Клиническая маммология. Современное состояние проблемы / под ред. Е. Б. Камповой-Полевой, С. С. Чистякова. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 511 с.
31. Коган И. Ю. Мастопатия (фиброзно-кистозная болезнь): диагностические подходы / И. Ю. Коган // Мать и дитя : материалы 7-го Рос. форума. — М., 2005. — С. 402.
32. Коган И. Ю. Нейроиммуноэндокринология молочной железы / И. Ю. Коган, И. Н. Костючек // Руководство по нейроиммуноэндокринологии / М. А. Пальцев, И. М. Кветной. — М. : Медицина, 2006. — 256 с.
33. Комарова Л. Е. Маммографический скрининг и снижение смертности от рака молочной железы / Л. Е. Комарова // Маммология. — 2007. — № 1. — С. 50.
34. Корженкова Г. П. Сравнение методов биопсии молочной железы / Г. П. Корженкова // Маммология. — 2007. — № 1. — С. 39—41.
35. Костючек И. Н. Методологические подходы к количественной иммуногистохимической оценке экспрессии маркеров апоптоза и

пролиферации в молочной железе / И. Н. Костючек, И. Ю. Коган, И. М. Кветной // Архив патологии. — 2006. — № 1. — С. 47—48.

36. Логинова А. Н. Молекулярно-генетический анализ наследственной формы рака молочной железы и/или яичников : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. мед. наук. / А. Н. Логинова. — М., 2004. — 20 с.

37. Лушникова А. А. MMTV и канцерогенез молочных желез у человека / А. А. Лушникова // Молекулярная медицина. — 2007. — № 4. — С. 9—19.

38. Любченко Л. Н. Клинико-генетическая гетерогенность семейного рака молочной железы / Л. Н. Любченко, Р. Ф. Гарькавцева // Современная онкология. — 2004. — № 2. — С. 132—137.

39. Любченко Наследственный рак молочной железы и/или яичников: ДНК-диагностика, индивидуальный прогноз, лечение и профилактика : автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра мед. наук. — Л. Н. Любченко. — М., 2009. — 50 с.

40. Мандельштам М. Ю. Молекулярно-генетический анализ моногенных форм атеросклероза и рака молочной железы у жителей Санкт-Петербурга : автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра биол. наук / М. Ю. Мандельштам. — СПб., 2005. — 42 с.

41. Мастопатия (фиброзно-кистозная болезнь): диагностические подходы / И. Ю. Коган, А. А. Полянин, М. О. Мясникова [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. — 2004. — Т. LIII, вып. 2. — С. 60—65.

42. Мастопатия: фиброзно-кистозная болезнь / И. Ю. Коган, М. А. Тарасова, М. О. Мясникова [и др.] — СПб. : Изд-во Н-Л, 2005. — 40 с.
43. Международная классификация болезней [Электронный ресурс].
Режим доступа : [http:// www. mkb10. ru/](http://www.mkb10.ru/)
44. Минцер О. П. Методы обработки медицинской информации / О. П. Минцер, Б. Н. Угаров, В. В. Власов. — К. : Вища шк., 1982. — 159 с.
45. Моисеенко В. М. «Естественная история» роста рака молочной железы / В. М. Моисеенко // Практическая онкология. — 2002. — Т. 3, № 1. — С. 6—15.
46. Моисеенко В. М. Моноклональные антитела в лечении злокачественных опухолей / В. М. Моисеенко // Практическая онкология. — 2003. — Т. 4, № 3. — С. 148—157.
47. Молекулярна епідеміологія [Текст] / В. М. Запорожан, Ю. І. Бажора, В. Й. Кресюн [та ін.] ; за ред. В. М. Запорожана ; Одес. держ. мед. ун-т. — О. : ОДМУ, 2010. — 314 с.
48. Молекулярно-генетические аспекты наследственной предрасположенности к раку молочной железы и/или яичников / Н. И. Поспехова, А. Н. Логинова, Л. Н. Любченко [и др.] // Медицинская генетика. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 71—75.
49. Морфофункциональные закономерности формирования молочных желез на различных этапах онтогенеза / Э. К. Айламазян, И. Ю. Коган, А. А. Полянин [и др.] // Учёные записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. — 2004. — Т. XI, № 2. — С. 31—37.

50. Наследственная предрасположенность к раку молочной железы / А. В. Карпухин, А. Н. Логинова, Е. В. Хомич, Н. И. Поспехова // Медицинская генетика. — 2002. — Т. 1, № 6. — С. 254—259.
51. Новые маркеры метилирования и экспрессии генов при раке молочной железы / Е. Б. Кузнецова, Т. В. Кекеева, С. С. Ларин [и др.] // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41. № 4. — С. 624—633.
52. О тестировании рака молочной железы на онкоген HER2 (c-erbB2/neu) : метод. рекомендации [Электронный ресурс] / сост. : Р. Ш. Хасанов, С. В. Петров, Г. А. Раскин/ Казань, 2007. — Режим доступа : <http://www.rosoncoweb.ru/library/mammologia/005.pdf>
53. Опухоли женской репродуктивной системы / В. В. Баринов, А. Г. Блюменберг, В. Н. Богатырев [и др.] ; под ред. М. И. Давыдова, В. П. Летягина, В. В. Кузнецова. — М. : МИА, 2007. — 373 с.
54. Относительная площадь экспрессии фактора Mcl-1 в тканях фибroadеномы молочной железы / И. Ю. Коган, И. М. Кветной, А. Г. Манихас [и др.] // Проблемы диагностики и лечения рака молочной железы : материалы 1-й Междунар. ежегод. онколог. конф. — СПб., 2004. — С. 119.
55. Ошибки в клинической онкологии / под ред. В. И. Чиссова, А. Х. Трахтенберга. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 768 с.
56. Поддубная И. В. Клиническая характеристика тройного негативного рака молочной железы / И. В. Поддубная, Д. А. Карселадзе // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. — 2010. — Т. 21, № 1. — С. 71–76.

57. Полиморфизм гена гемохроматоза и риск рака молочной железы / Т. В. Кондрашова, Т. И. Иванова, И. А. Жарикова [и др.] // Молекулярный полиморфизм человека / под ред. С. Д. Варфоломеева. — М., 2007. — С. 383—397.
58. Полиморфизм генов супрессоров опухолей и генетический контроль канцерогенеза / под ред. С. Д. Варфоломеева // Молекулярный полиморфизм человека. — М., 2007. — Т. 1. — С. 343—383.
59. Попова Т. Н. Тактика при непальпируемых доброкачественных новообразованиях молочных желез в амбулаторных условиях / Т. Н. Попова, Л. И. Артеменко // Российский онкологический журнал. — 2007. — № 4. — С. 37—39.
60. Предрасположенность к раку молочной железы: этиология, клинические особенности и профилактика / Л. Н. Любченко, Р. Ф. Гарькавцева, С. М. Портной [и др.] // Медицинская генетика. — 2007. — Т. 6, № 6. — С. 3—8.
61. Про внесення змін до наказу МОЗ України від 17. 09. 2007 № 554 «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю “онкологія”» : Наказ від 30 липня 2010 року № 645 [Електронний ресурс]. — Режим доступу : [http:// document. ua/pro-vnesennja-zmin-do-nakazu-moz-ukrayini-vid-17. 09. 2007-n-5-doc69851. html](http://document.ua/pro-vnesennja-zmin-do-nakazu-moz-ukrayini-vid-17.09.2007-n-5-doc69851.html)
62. Профилактика рака молочной железы у больных пролиферативными процессами репродуктивной системы / В. Ф. Семиглазов, Э. К. Айламазян, Е. Н. Байлюк [и др.] // Вопросы онкологии. — 2006. — № 3. — С. 247—257.

63. Рак молочной железы / Ш. Х. Ганцев, А. М. Ханов, С. М. Демидов [и др.]. — М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2004. — С. 116.
64. Роль метилирования генов ингибиторов циклин-зависимых киназ в эпигенетической инактивации ретинобластомного пути регуляции клеточного цикла при раке молочной железы / Н. А. Скрябин, И. Н. Лебедев, Е. Н. Толмачева, Н. В. Чердынцева // Якутский медицинский журнал. — 2009. — № 2. — С. 89—91.
65. Салех Самир А. Прогнозирование и профилактика доброкачественных дисплазий молочных желез у женщин с гинекологическими заболеваниями / А. Салех Самир, Л. Мальхотра // Вестник Российского государственного медицинского университета. — 2006. — № 2. — С. 450.
66. Семиглазов В. В. Диагностика непальпируемых форм рака молочной железы / В. В. Семиглазов // Маммология. — 2007. — № 1. — С. 53.
67. Семиглазов В. Ф. Профилактика опухолей молочной железы / В. Ф. Семиглазов. — СПб. : Знание, 1993. — 240 с.
68. Семиглазов В. Ф. Неинвазивные и инвазивные опухоли молочной железы / В. Ф. Семиглазов, В. В. Семиглазов, А. Е. Клецель. — СПб. : Боргес, 2005. — 350 с.
69. Семиглазов В. Ф. Опухоли молочной железы (лечение и профилактика) / В. Ф. Семиглазов, К. Ш. Нургазиев, А. С. Арзуманов. — Алматы, 2001. — 344 с.

70. Семиглазов В. Ф. Профилактика и ранняя диагностика рака молочной железы / В. Ф. Семиглазов // Журнал акушерства и женских болезней. — 2000. — Т. XLIX, вып. 2. — С. 7—11.
71. Серов В. Н. Диагностика заболеваний молочных желез / В. Н. Серов, Т. Т. Тагиева, В. Н. Прилепская // Гинекология. — 1999. — № 1. — С. 6—10.
72. Современный высокотехнологичный метод скрининга дифференциального метилирования геномов на основе амплификации интерметилированных сайтов / В. В. Стрельников, А. С. Танас, В. В. Шкарупо [и др.] // Молекулярная медицина. — 2009. — № 4. — С. 18—27.
73. Стенина М. Б. Рак молочной железы: некоторые важные научные события и выводы последних лет / М. Б. Стенина // Практическая онкология. — 2005. — Т. 6, № 1. — С. 26—32.
74. Тагиева Т. Т. Доброкачественные узловые образования молочных желез у женщин репродуктивного возраста / Тагиева Т. Т. // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. — 2007. — Т. 18, № 4. — С. 54—58.
75. Таиц И. П. Генетические и иммунологические аспекты доброкачественных дисплазий молочных желёз : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.01 — акушерство и гинекология / И. П. Таиц. — М., 2010. — 113 с.
76. Факторы прогноза при раке молочной железы / А. А. Божок, В. Ф. Семиглазов, В. В. Семиглазов [и др.] // Современная онкология. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 13—18.

77. Филатов А. В. Гистологическая и цитологическая диагностика степени злокачественности различных вариантов рака молочной железы : дис. ... канд. мед. наук. — 14.00.15 — патологическая анатомия / А. В. Филатов. — М., 2008. — 109 с.
78. Филлипов О. С. Физиология и патология молочной железы в практике акушера-гинеколога. / О. С. Филлипов. — М., 2005. — С. 14—15.
79. Фіщук Л. Є. Поліморфні варіанти гена ендотеліальної NO-синтази у жінок, хворих на рак молочної залози, в Україні / Л. Є. Фіщук, Н. Г. Горовенко // Одеський медичний журнал. — 2013. — Т. 137, № 3. — С. 53—56.
80. Харченко В. П. Клиническая маммология / В. П. Харченко, Н. И. Рожкова. — М. : ООО Фирма Стром, 2005. — 28 с.
81. Харченко В. П. Новые технологии в диагностике и консервативном лечении кист молочной железы / В. П. Харченко, Н. И. Рожкова, С. П. Прокопенко // Маммология. — 1998. — № 4. — С. 21—26.
82. Хасанов Р. Ш. Мастопатия : рук. для врачей / Р. Ш. Хасанов, И. А. Гилязутдинов — Казань : ЗАО «Новое знание», 2006. — 212 с.
83. Частоты однонуклеотидных полиморфизмов и мутаций в гене BRCA1 при наследственно обусловленном раке молочной железы и яичников / А. В. Карпухин, Н. И. Поспехова, Л. Н. Любченко [и др.] // Доклады академии наук. — 2002. — Т. 383, № 5. — С. 706—709.
84. Экспрессия фактора p53 при дисгормональных дисплазиях молочной железы / И. М. Кветной, И. Ю. Коган, В. М. Седов [и др.] //

Проблемы диагностики и лечения рака молочной железы : материалы 1-й Междунар. ежегод. онколог. конф. — СПб., 2004. — С. 126—127.

85. Эпигенетические модификации генов контроля клеточного цикла RB1, CDKN2B, P14ARF в тканях молочной железы при развитии опухолевого процесса / Е. Н. Толмачёва, О. В. Васильева, И. Н. Лебедев [и др.] // Сибирский онкологический журнал. — 2008. — № S2. — С. 86—87.

86. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk / A. Cox, A. M. Dunning, M. Garcia-Closas [et al.] // Nat. Genet. — 2007. — Vol. 39 (3). — P. 352—358.

87. A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes / P. Smith, L. McGuffog, D. F. Easton [et al.] // Genes Chromosomes Cancer. — 2006. — Vol. 45. — P. 646—655.

88. A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families / T. Peelen, M. van Vliet, A. Petrij-Bosch [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 1997. — Vol. 60. — P. 1041—1049.

89. A prospective investigation of predictive and modifiable risk factors for breast cancer in unaffected BRCA1 and BRCA2 gene carriers / E. M. Guinan, J. Hussey, S. A. McGarrigle [et al.] // BMC Cancer. — 2013. — Vol. 13. — P. 138.

90. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families / H. Erkko, B. Xia, J. Nikkila [et al.] // Nature Publishing Group. — 2007. — Vol. 446, N 15. — P. 316—319.

91. A single ataxia-telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase / K. Savitsky, A. Bar-Shira, S. Gilad [et al.] // *Science*. — 1995. — Vol. 268. — P. 1749—1753.
92. A strong Candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 / Y. Miki, J. Swensen, D. Shattuck-Eidens [et al.] // *Science*. — 1994. — Vol. 266. — P. 66.
93. Abraham R. T. PI 3-kinase related kinases: “big” players in stress-induced signaling pathways Abraham R. T. // *DNA repair*. — 2004. — Vol. 3. — P. 883—1887.
94. Ahmed M. ATM and breast cancer susceptibility / M. Ahmed, N. Rahman // *Oncogene*. — 2006. — Vol. 25. — P. 5906—5911.
95. An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer / J. A. Lavigne, K. H. Helzlsouer, H. Y. Huang [et al.] // *Cancer Res*. — 1997. — Vol. 57. — P. 5493—5497.
96. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects / O. Diez, A. Osorio, M. Duran [et al.] // *Hum. Mutat*. — 2003. — Vol. 22. — P. 301—312.
97. Antoniou A. C. Models of genetic susceptibility to breast cancer / A. C. Antoniou, D. F. Easton // *Oncogene*. — 2006. — Vol. 25. — P. 5898—5905.
98. Are ATM Mutations 7271T3G and IVS10-6T3G Really High-Risk Breast Cancer-Susceptibility Alleles? / C. I. Szabo, M. Schutte, A. Broeks [et al.] // *Cancer Research*. — 2004. — Vol. 64. — P. 840—843.

99. Ashkenasi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2 / B. B. Roa, A. A. Boyd, K. V. Richards [et al.] // Nature Publishing Group. — 1996. — Vol. 14. — P. 185—187.
100. Association between CYP17 polymorphisms and the development of breast cancer / K. J. Helzlsouer, H. Y. Huang, P. T. Stribkland [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. — 1998. — Vol. 7. — P. 945—949.
101. Association between the CHEK2*1100delC germline mutation and estrogen receptor status / G. H. de Bock, M. J. E. Mounts, M. Schutte [et al.] // Int. J. Gynecol. Cancer. — 2006. — Vol. 16 (2). — P. 552—555.
102. Association of a common variant of the CASPS gene with reduced risk of breast cancer / M. P. Gordon, C. S. Healey, M. D. Teare [et al.] // J. of the National Cancer Institute. — 2004. — Vol. 96, N 24. — P. 1866—1869.
103. Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 genetic polymorphism with the risk of Japanese breast cancer / X. E. Huang, N. Hamajima, N. Katsuda [et al.] // Breast Cancer. — 2003. — Vol. 103. — P. 431 — 433.
104. Association of polymorphism in the transforming growth factor β 1 gene with disease outcome and mortality in rheumatoid arthritis / D. L. Matthey, N. Nixon, P. T. Dawes [et al.] // A. Rheum Dis. — 2005. — P. 1190—1194.
105. Association of two mutations in the CHEK2 gene with breast cancer / N. Bogdanova, N. Enflen-Dubrowskaja, S. Fetchenko [et al.] // Int. J. Cancer. — 2005. — Vol. 116. — P. 263—266.

106. Ataxia-telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro / S. Matsuoka, G. Rotman, A. Ogawa [et al.] // P. N. A. S. — 2000. — Vol. 97, N 19. — P. 10389—10394.
107. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage / S. Matsuoka, B. A. Ballif, A. Smogorzewska [et al.] // Science. — 2007. — Vol. 316. — P. 1160—1166.
108. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles / A. Renwick, D. Thompson, S. Seal [et al.] // Nat. Genet. — 2006. — Vol. 38. — P. 873—875.
109. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies / A. Antoniou, P. D. Pharoah, S. Narod [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2003. — Vol. 72. — P. 1117—130.
110. Bartek J. Chk2 kinase — a busy messenger / J. Bartek, J. Falck, J. Lukas // Nature Rev. Mol. Cell. Biol. — 2001. — Vol. 2. — P. 877—86.
111. Belugali Nataraj N. Crosstalk between VEGF and novel angiogenic protein regulates tumor angiogenesis and contributes to aggressiveness of breast carcinoma / N. Belugali Nataraj, B. P. Salimath // Cell Signal. — 2013. — Vol. 25 (1) — P. 277—294.
112. Bierie B. Tumor microenvironment: TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer / B. Bierie, H. L. Moses // Nat. Rev. Cancer. — 2006. — Vol. 6. — P. 506—520.

113. Biomarkers of response to Akt inhibitor MK-2206 in breast cancer / T. Sangai, A. Akcakanat, H. Chen [et al.] // *Clin Cancer Res.* — 2012. — Vol. 18 (20) — P. 5816—5828.
114. Blobe G. C. Role of transforming growth factor p in human disease / G. C. Blobe, W. P. Schiemann, H. F. Lodish / *NEJM.* — 2000. — P. 1350—1358.
115. Brandon M. Mitochondrial mutations in cancer / M. Brandon, P. Baldi, D. C. Wallace // *Nature Publ. Group.* — 2006. — Vol. 100. — P. 1—16.
116. BRCA1 sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic / D. Stoppa-Lyonnet, P. Laurent-Puig, L. Essioux [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 60. — P. 1021—1030.
117. BRCA1-Related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics / T. M. U. Wagner, R. A. Moeslinger, D. Muhr [et al.] // *Int J Cancer.* — 1998. — Vol. 7. — P. 354—360.
118. Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival / J. Tommiska, H. Eerola, M. Heinonen [et al.] // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11, N 14. — P. 5098—5103.
119. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1 and COMT: a mutagenic study on cancer susceptibility / C. S. Huang, H. D. Chern, K. J. Chang [et al.] // *Cancer Research.* — 1999. — Vol. 59. — P. 4870—4875.

120. Breast cancer risk factors in a defined population: weighted logistic regression approach for rare events / N. Zare, E. Haem, K. B. Lankarani [et al.] // *J Breast Cancer*. — 2013. — Vol. 16 (2). — P. 214—219.
121. Building a Multigenic Model of Breast Cancer Susceptibility: CYP17 and HSD17B1 Are Two Important Candidates / H. S. Feigelson, R. McKean-Cowdin, G. A. Coetzee [et al.] // *Cancer Research*. — 2001. — Vol. 61. — P. 785—789.
122. Buyru N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer / N. Buyru, H. Tigli, N. Dalay // *Oncol. Rep.* — 2003. — Vol. 10. — P. 711—714.
123. CHEK2-positive breast cancers in young Polish women / C. Cybulski, B. Gorski, T. Huzarski [et al.] // *Clin. Cancer Res.* — 2006. — Vol. 12, N 16. — P. 4832—4835.
124. Can the Gail model increase the predictive value of a positive mammogram in a European population screening setting? Results from a Spanish cohort / A. Buron, M. Vernet, M. Roman [et al.] // *Breast*. — 2013. — Vol. 22 (1) — P. 83—88.
125. Cannings C. Genealogical Genetic Structure (Cambridge Studies in Mathematical Biology) / C. Cannings. — 1 ed. — Cambridge University Press, 1981. — 172 p.
126. Carew J. S. Mitochondrial defects in cancer / J. S. Carew, P. Huang // *Mol. Cancer*. — 2002. — N 1. — P. 9.
127. Cavalieri E. L. Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators / E. L. Cavalieri, D. E. Stack, P. D.

Devanesan // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 10937—10942.

128. Cavenee W. K. Genetics and new approaches to cancer therapy / W. K. Cavenee // Carcinogenesis. — 2002. — Vol. 23. — P. 683 — 686.

129. Change of influence of prognostic markers on metastasis free interval during and after adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. / Z. Abu Rabi, N. Todorovic-Rakovic, M. Markicevic [et al.] // J BUON. — 2013. — Vol. 18 (2) — P. 321—327.

130. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene / C. Cybulski, B. Gorski, T. Huzarski [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2004. — Vol. 75. — P. 1131—1135.

131. CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk / O. Kilpivaara, P. Vahteristo, J. Falck [et al.] // Int. J. Cancer. — 2004. — Vol. 111. — P. 543—547.

132. Cheung V. PTHrP Overexpression Increases Sensitivity of Breast Cancer Cells to Apo2L/TRAIL / V. Cheung, S. Bouralexis, M. T. Gillespie // PLoS One. — 2013. — Vol. 8 (6). — e66343.

133. Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features / A. Martinez, R. A. Walker, J. A. Shaw [et al.] // J. Clin. Pathol. Mol. Pathol. — 2001. — Vol. 54. — P. 300—306.

134. Chun H. H. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype / H. H. Chun, R. A. Gatti // DNA repair. — 2004. — Vol. 3. — P. 1187—1196.

135. Cigarette smoking, cytochrome P450 1A1 polymorphisms, and breast cancer risk in the Nurses' Health Study / N. Ishibe, S. E. Hankilson, G. A. Colditz [et al.] // *Cancer Res.* — 1998. — Vol. 58. — P. 667—671.
136. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease // *Lancet.* — 2001. — Vol. 358. — P. 1389—1399.
137. Comparison between genotype and phenotype identifies a high-risk population carrying BRCA1 mutation / L. Cortesi, D. Turchetti, C. Bertoni [et al.] // *Genes, Chromosomes & Cancer.* — 2000. — Vol. 27. — P. 130—135.
138. Das P. M. DNA methylation and cancer / P. M. Das, R. Singal // *J. of Clinical Oncology.* — 2004. — Vol. 22, N 22. — P. 4632—4642.
139. Detection of promoter methylation of tumor suppressor genes in serum DNA of breast cancer cases and benign breast disease controls / S. R. Sturgeon, R. Balasubramanian, C. Schairer [et al.] // *Epigenetics.* — 2012. — Vol. 7 (11). — P. 1258—1267.
140. Dickson R. Growth factors in breast cancer / R. Dickson, M. Lippman // *Endocrine reviews.* — 2006. — Vol. 16, N 5. — P. 559—589.
141. Differential association of BRCA1 and BRCA2 genes with some breast cancer-associated genes in early and late onset breast tumors / N. Chander, S. Mandal, A. Roy [et al.] // *Annals of Surgical Oncology.* — 2004. — Vol. 11, N 12. — P. 1045—1055.

142. Digweed M. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks / M. Digweed, K. Sperling // DNA Repair. — 2004. — Vol. 3. — P. 1207—1214.
143. DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks / J. Drouet, C. Delteil, J. Lefrancois [et al.] // The J. of Biological chemistry. — 2005. — Vol. 280, N 8. — P. 7060—7069.
144. EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression / J. W. Gu, K. L. Makey, K. B. Tucker [et al.] // Vasc Cell. — 2013, May 2. — Vol. 5 (1). — P. 9.
145. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-Line p53 intron mutation in familial breast cancer / T. A. Lehman, B. G. Haffty, C. J. Carbone [et al.] // Cancer Research. — 2000. — Vol. 60. — P. 1062—1069.
146. Elevated serum levels of transforming growth factor- β 1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection / K. S. Shim, K. H. Kim, W. S. Han, E. B. Park // Cancer. — 1999. — Vol. 85. — P. 554—561.
147. Estimation of maspin's subcellular localization in invasive ductal breast cancer via light microscopy and computerized image analysis: a comparative study / M. Panou, N. Kavantzias, T. Sergentanis [et al.] // J BUON. — 2013. — Vol. 18 (2) — P. 342—351.
148. Evaluating the performance of the breast cancer genetic risk models BOADICEA, IBIS, BRCAPRO and Claus for predicting BRCA1/2 mutation

carrier probabilities: a study based on 7352 families from the German Hereditary Breast and Ovarian Cancer Consortium / C. Fischer, K. Kuchenbäcker, C. Engel [et al.] // *J Med Genet.* — 2013. — Vol. 50 (6). — P. 360—367.

149. Evaluation of changes in biologic markers ER, PR, HER 2 and Ki-67 index in breast cancer with administration of neoadjuvant dose dense doxorubicin, cyclophosphamide followed by paclitaxel chemotherapy / D. S. Dede,

B. Gumuskaya, G. Guler [et al.] // *J BUON.* — 2013. — Vol. 18 (2). — P. 366—371.

150. Evidence for selective expression of the p53 codon 72 polymorphs: implications in cancer development / M. M. Siddique, C. Balram, L. Fiszer-Maliszewska [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2005. — Vol. 14, N 9. — P. 2245—2252.

151. Filippini1 S. E. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2 / S. E. Filippini1, A. Vega // *Front Biosci.* — 2013. — Vol. 18. — P. 1358—1372.

152. Follow-up recommendations for benign breast biopsies / S. Shin, H. B. Schneider, F. J. Cole Jr., C. Laronga // *Breast J.* — 2006. — Vol. 12 (5). — P. 413—417.

153. Founder BRCA1/2 mutations among Male Patients with breast cancer in Israel / J. P. Struwing, Z. M. Coriaty, E. Ron [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 65. — P. 1800—1802.

154. Frequently occurring germline mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer in families from Russia / S. A. Gayther, P. Harrington, P. Russell [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 60. — P. 1239—1242.
155. Functional and genomic approaches reveal an ancient CHEK2 allele associated with breast cancer in the Ashkenazi Jewish population / A. Shaag, T. Walsh, P. Renbaum [et al.] // *Human Molecular Genetics.* — 2005. — Vol. 14, N 4. — P. 555—563.
156. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families / D. Ford, D. Easton, M. Stratton [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 62. — P. 676—689.
157. Genetic polymorphisms in catechol-O-methyltransferase, menopausal status and breast cancer risk / P. A. Thompson, P. G. Shields, J. L. Freudenheim [et al.] // *Cancer Res.* — 1998. — Vol. 58. — P. 2107—2110.
158. Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study / E. G. Shatalova, S. E. Walter, O. O. Favorova [et al.] // *Breast Cancer Research.* — 2005. — Vol. 7. — P. 909—921.
159. Genetic Polymorphisms in UGT1A1 and Association with Breast Cancer among African Americans / C. Guillemette, R. C. Millikan, B. Newman [et al.] // *Cancer Research.* — 2000. — Vol. 60. — P. 950—956.
160. Genetic polymorphisms in uridine diphosphoglucuronosyl-transferase 1A1 (UGT1AJ) and risk of breast cancer / O. J. Adegoke, X. O. Shu, Y. T. Gao [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2004. — Vol. 85. — P. 239—245.

161. Genetic polymorphisms of selected DNA repair genes, estrogen and progesterone receptor status, and breast cancer risk / K. M. Lee, J. Y. Choi, C. Kang [et al.] // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11, N 12. — P. 4620—4626.
162. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients / B. Gorski, T. Debniak, B. Masojc [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2003. — Vol. 106. — P. 379—381.
163. Germline mutation 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland / J. Steffen, D. Nowakowska, A. Niwinska [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2006. — Vol. 119. — P. 472—475.
164. Germline/?53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms / D. Malkin, F. P. Li, L. C. Strong [et al.] // *Science.* — 1990. — Vol. 250. — P. 1233—1238.
165. Giulianelli S. Targeting progesterone receptors in breast cancer / S. Giulianelli, A. Molinolo, C. Lanari // *Vitam Horm.* — 2013. — Vol. 93. — P. 161—184.
166. Gorski B. A common missense variant in BRCA1 predisposes to early onset breast cancer / B. Gorski, S. A. Narod, J. Lubinski // *Breast cancer Research.* — 2005. — Vol. 7. — P. 1023—1027.
167. Guo S. Notch, IL-1 and leptin crosstalk outcome (NILCO) is critical for leptin-induced proliferation, migration and VEGF/VEGFR-2 expression in breast cancer / S. Guo, R. R. Gonzalez-Perez // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6 (6) — e21467.

168. Hanna M. G. Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases / M. G. Hanna, L. P. Nelson // *Cell. Mol. Life Sci.* — 1999. — Vol. 55. — P. 691—706.
169. Haplotype and cancer risk analysis of two common mutations, BRCA1 4184del4 and BRCA1 2157delG, in high risk northwest England breast/ovarian families / D. G. R. Evans, S. L. Neuhausen, M. Bulman [et al.] // *J. med. Genet.* — 2004. — N 41 (2) — P. 342—348.
170. Harvey J. A. Quantitative assessment of mammographic breast cancer risk / J. A. Harvey, V. E. Bovbjerg // *Radiology.* — 2004. — Vol. 230. — P. 29—41.
171. High frequency of recurrent mutations in the BRCA1 and BRCA2 in Polish families with breast and ovarian cancer / E. Grzybowska, H. Zięntek, A. Jasinska [et al.] // *Hum. Mutat.* — 2000. — Vol. 16. — P. 482—490.
172. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA 1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area / P. Pohlreich, M. Zikan, J. Stribrna [et al.] // *Breast Cancer Res.* — 2005. — Vol. 7. — P. 728—736.
173. Ho D. N. Bibliometric analysis of theranostics: two years in the making / D. N. Ho, K. Y. Choi, S. J. Lee // *Theranostics.* — 2013. — Vol. 3 (7). — P. 527—531.
174. Hsu K. S. Alpha-actinin 4 and tumorigenesis of breast cancer / K. S. Hsu, H. Y. Kao // *Vitam Horm.* — 2013. — Vol. 93. — P. 323—351.

175. Hughes L. E. Classification of benign breast disorders. The ANDI classification based on physiological processes within the normal breast / L. E. Hughes // *Br Med Bull.* — 1991. — Vol. 47 (2). — P. 251—257.
176. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 / R. Wooster, G. Bignell, J. Lancaster [et al.] // *Nature.* — 1995. — Vol. 378. — P. 789—792.
177. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland / J. Steffen, R. Varon, M. Mosor [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2004. — Vol. 111. — P. 67—71.
178. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome / L. A. Boardman, S. N. Thibodeau, D. J. Schaid [et al.] // *Ann Intern. Med.* — 1998. — Vol. 128. — P. 896—899.
179. Keshava C. CYP3A4 polymorphisms — potential risk factors for breast cancer and prostate cancer / C. Keshava, E. C. McCanlies, A. Weston // *American J. of Epidemiology.* — 2004. — Vol. 160, N 9. — 825—841.
180. Levkovich N. N. Association of polymorphic G1934A variant allele *4) of CYP2D6 gene with increased risk of breast cancer development in Ukrainian women / N. N. Levkovich, N. G. Gorovenkop, D. V. Myasoedov // *Exp Oncol.* — 2011. — Vol. 33 (3). — P. 136—139.
181. Limited relevance of the CHEK2 gene in hereditary breast cancer / M. R. Dufault, B. Betz, B. Wappenschmidt [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2004. — Vol. 10. — P. 320—325.

182. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 1q22-23 / R. A. Gatti, I. Berkel, E. Boder [et al.] // *Nature*. — 1988. — Vol. 336. — P. 577—580.
183. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23 / M. R. Nelen, G. W. Padberg, E. A. Peeters [et al.] // *Nat. Genet.* — 1996. — Vol. 13. — P. 114—116.
184. Low incidence of BRCA1 mutations among Italian families with breast and ovarian cancer / M. Santarosa, A. Viel, R. Dolcetti [et al.] // *Int. J. Cancer*. — 1998. — Vol. 78. — P. 581—586.
185. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2 (*) HOdelC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations / H. Meijers-Heijboer, O. A. Van den, J. Klijn [et al.] // *Nat. Genet.* — 2002. — Vol. 31. — P. 55—59.
186. Lynch H. T. Heredity and breast cancer: implications for cancer control / H. T. Lynch, A. J. Krush // *Med Times*. — 1966. — Vol. 94 (5) — P. 599—605.
187. MacKarem G. The effectiveness of the Gail model in estimating risk for development of breast cancer in women under 40 years of age / G. MacKarem, C. A. Roche, K. S. Hughes // *Breast J.* — 2001. — Vol. 7 (1). — P. 34—39.
188. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway / P. Chaturvedi, W. K. Eng, Y. Zhu [et al.] // *Oncogene*. — 1999. — Vol. 18. — P. 4047—4054.

189. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease / R. N. Lightowers, P. F. Chinnery, D. M. Turnbull, N. Howell // Trends Genet. — 1997. — Vol. 13. — P. 450—455.
190. Mammographic breast density and family history of breast cancer / E. Ziv, J. Shepherd, R. Smith-Bindman, K. Kerlikowske // J. Natl. Cancer Inst. — 2003. — Vol. 95. — P. 556—558.
191. Mammographic density and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers / G. Mitchell, A. C. Antoniou, R. Warren [et al.] // Cancer Res. — 2006. — Vol. 66. — P. 1866—1872.
192. Marchant D. J. Diagnosis of breast disease and the role of the gynecologist / D. J. Marchant // Curr Opin Obstet Gynecol. — 1993. — Vol. 5 (1). — P. 67—72.
193. Martin A.-M. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer / A.-M. Martin, B. L. Weber // JNCL. — 2000. — Vol. 92. — P. 1126—1135.
194. MDC1 Regulates DNA-PK autophosphorylation in response to DNA damage / Z. Lou, B. Ping-Chi Chen, A. Asaithamby [et al.] // J. of Biolog. Chemistry. — 2004. — Vol. 279, N 45. — P. 46359—46362.
195. miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 +alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells / S. Cascio, A. D'Andrea, R. Ferla [et al.] // J Cell Physiol. — 2010. — Vol. 224 (1) — P. 242—249.
196. MMTV-гомологичные последовательности и их экспрессия у больных раком молочной железы в сочетании с лимфомами / И. Н. Крюкова, А. А. Лушникова, А. А. Пароконная [и др.] // Молекулярная медицина. — 2009. — № 2. — С. 34—38.

197. Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Skandinavian familial breast cancer / S. Hakansson, O. Johansson, U. Johansson [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 60. — P. 1068—1078.
198. Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland / L. Sarantaus, P. Huusko, H. Eerola [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 8. — P. 757—763.
199. Mutation analysis of the CHEK2 gene in families with hereditary breast cancer / M. Ainen, P. Huusko, S. Maentyniemi [et al.] // *Br. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 85. — P. 209—212.
200. Nandi S. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis / S. Nandi, R. C. Guzman, J. Yang // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1995. — Vol. 92. — P. 3650—3657.
201. Nathanson K. L. “Other” breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail / K. L. Nathanson, B. L. Weber // *Human Molecular Genetics.* — 2001. — Vol. 10, N 7. — P. 715—720.
202. Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation induced tumorigenesis / V. Dumon-Jones, P. O. Frappart, W. M. Tong [et al.] // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 7263—7269.
203. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia / K. B. Buslov, A. G. Iyevleva, E. V. Chekmariova [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2004. — Vol. 114. — P. 585—589.

204. NBS1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest / P. M. Girard, E. Riballo, A. C. Begg [et al.] // *Oncogene*. — 2002. — Vol. 21. — P. 4191—4199.
205. Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability / E. Seemanova, K. Sperling, H. Neitzel [et al.] // *J. Med. Genet.* — 2005. — Vol. 10. — P. 1136—1146.
206. Occult leydig cell tumour and androgen-receptor positive breast cancer in a woman with severe hyperandrogenism / G. Saraceno, V. Barresi, F. Trimarchi, S. Cannavo // *J Ovarian Res.* — 2013. — Jul 1, Vol. 6 (1). — P. 43.
207. Oliver C. P. Genetic factors in breast cancer / C. P. Oliver // *Proc Natl Cancer Conf.* — 1964. — Vol. 5. — P. 133—142.
208. Oral Contraceptives and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers / S. A. Narod, M. P. Dube, J. Klijn [et al.] // *JNCI*. — 2002. — Vol. 94. — P. 1773—1779.
209. Overexpression of cyclin E protein is associated with specific mutation types in the p53 gene and poor survival in human breast cancer / T. Lindahl, G. Landberg, J. Ahlgren [et al.] // *Carcinogenesis*. — 2004. — Vol. 25, N 3. — P. 375—380.
210. p53 Codon 72 Polymorphism Predicts the Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Cancer / Y. Xu, L. Yao, T. Ouyang [et al.] // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11, N 20. — P. 7328—7333.
211. P53 haplotype determination in breast cancer / A. Weston, C. Pan, H. B. Kseiski [et al.] // *Cancer Epidemiology*. — 1997. — Vol. 6. — P. 105—112.

212. Peng Y. Potential prognostic tumor biomarkers in triple-negative breast carcinoma / Y. Peng // Beijing Da Xue Xue Bao. — 2012. — Vol. 44 (5) — P. 666—672.
213. Phenol sulfotransferases: hormonal regulation, polymorphism, and age of onset of breast cancer / P. Seth, K. L. Lunetta, D. W. Bell [et al.] // Cancer Res. — 2000. — Vol. 60. — 6859—6863.
214. Pirn D. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression / D. Pirn, L. Banks // Int. J. Cancer. — 2004. — Vol. 108. — P. 196—199.
215. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention / P. D. Pharoah, A. Antoniou, M. Bobrow [et al.] // Nat. Genet. — 2002. — Vol. 31. — P. 33—36.
216. Polymorphisms and circulating levels in the insulin-like growth factor system and risk of breast cancer: a systematic review / O. Fletcher, L. Gibson, N. Johnson [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2005. — Vol. 14. — P. 2—19.
217. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women / A. M. Dunning, M. Dowsett, C. S. Healey [et al.] // J. Natl. Cancer. Inst. — 2004. — Vol. 96. — P. 936—945.
218. Polymorphisms in DNA repair gene, medical exposure to ionizing radiation, and breast cancer risk / R. C. Millican, J. S. Player, A. R. deCotret [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. — 2005. — Vol. 14, N 10. — P. 2326—2334.

219. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype / S. R. Lakhani, J. S. Reis-Filho, L. Fublford [et al.] // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11, N 14. — P. 5175—5180.
220. Predictive biomarkers in breast cancer: their value in neoadjuvant chemotherapy / L. Fuksa, S. Micuda, J. Grim [et al.] // *Cancer Invest.* — 2012. — Vol. 30 (9). — P. 663—678.
221. Prevalence and spectrum of p53 mutations associated with smoking in breast cancer / K. Conway, S. N. Edmiston, L. Cui [et al.] // *Cancer Research.* — 2002. — Vol. 62. — P. 1987—1995.
222. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary / M. Van der Looij, C. Szabo, I. Besznyak [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2000. — Vol. 86. — P. 737—740.
223. Promoter hypermethylation and post-transcriptional mechanisms for reduced BRCA1 immunoreactivity in sporadic human breast cancers / K. Miyamoto, T. Fukuyomi, K. Asada [et al.] // *Jpn. J. Clin. Oncol.* — 2002. — Vol. 32, N 2. — P. 79—84.
224. Prophylactic mastectomy: an appraisal / F. Zagouri, D. T. Chrysikos, T. N. Sergentanis [et al.] // *Am Surg.* — 2013. — Vol. 79 (2). — P. 205—212.
225. Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes / D. T. Brown, D. C. Samuels, E. M. Michael [et al.] // *Am J Hum Genet.* — 2001. — Vol. 68. — P. 533—536.
226. Rebbeck T. R. The contribution of inherited genotype to breast cancer / T. R. Rebbeck // *Breast Cancer Res.* — 2002. — Vol. 4. — P. 85—89.

227. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex / K. E. Adams, A. L. Medhurst, D. A. Dart, N. D. Lakin // *Oncogene*. — 2006. — N 25 (28). — P. 3894—3904.
228. Resemann H. K. Stat3 paradox: A killer and an oncogene / H. K. Resemann, C. J. Watson, B. Lloyd-Lewis // *Mol Cell Endocrinol*. — 2013 – Vol. 5 P. 303-307
229. Retention of the p53 codon 72 Arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in Arginine/Proline heterozygous breast cancer patients / M. Bonafe', C. Ceccarelli, F. Farabegoli [et al.] // *Clinical Cancer Research*. — 2003. — Vol. 9. — P. 4860—4864.
230. Role of the Nijmegen Breakage Syndrome 1 gene in familial and sporadic prostate cancer / S. J. Hebring, H. Fredriksson, K. A. White [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. — 2006. — Vol. 15, N 5. — P. 935—938.
231. Schon T. A. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis / T. A. Schon, T. Bonilla, S. DiMauro // *J. Bioenerg. Biomembr*. — 1997. — Vol. 29. — P. 131—149.
232. *Short Protocols in Human Genetics* / by Nicolas C. Dracopoli (Editor), Jonathan L. Haines (Editor), Bruce R. Korf. — 1 ed. — N. Y. : Wiley. — 898 p.
233. SIX1 induces lymphangiogenesis and metastasis via upregulation of VEGF-C in mouse models of breast cancer / C. A. Wang, P. Jedlicka, A. N. Patrick [et al.] // *J Clin Invest*. — 2012. — Vol. 122 (5). — P. 1895—1906.

234. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer / T. Walsh, S. Casadei, K. H. Coats [et al.] // JAMA. — 2006. — Vol. 295. — P. 1379—1388.
235. Speiser J. J. The functional role of notch signaling in triple-negative breast cancer / J. J. Speiser, C. Erşahin, C. Osipo // Vitam Horm. — 2013. — Vol. 93. — P. 277—306.
236. Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) polymorphism, PAH-DNA adduct levels in breast tissue and breast cancer risk in a case-control study / D. Tang, A. Rundle, L. Mooney [et al.] // Breast Cancer Res. Treat. — 2003. — Vol. 78. — P. 217—222.
237. Sulfotransferase 1A1 polymorphism, endogenous estrogen exposure, well-done intake, and breast cancer risk / W. Zheng, D. Xie, J. R. Cerhan [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. — 2001. — Vol. 10. — P. 89—94.
238. Survival and prognostic factors in BRCA1-associated breast cancer / C. T. M. Brekelmans, C. Seynaeve, M. Menke-Pluymers [et al.] // An. Oncol. — 2006. — Vol. 17. — P. 391—400.
239. T29C polymorphism in the transforming growth factor β 1 gene and postmenopausal breast cancer risk: the multiethnic cohort study II / L. L. Marchand, C. A. Haiman, D. van den Berg [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. — 2004. — Vol. 13, N 3. — P. 412—415.
240. Targeting the IKK β /mTOR/VEGF signaling pathway as a potential therapeutic strategy for obesity-related breast cancer / C. T. Chen, Y. Du, H. Yamaguchi [et al.] // Mol Cancer Ther. — 2012. — Vol. 11 (10). — P. 2212—2221.

241. Taylor A. M. Molecular pathology of ataxia-telangiectasia / A. M. Taylor, P. J. Byrd // *J. Clin. Pathol.* — 2005. — Vol. 58. — P. 1009—1015.
242. Tea intake, COMT genotype, and breast cancer in Asian-American women / A. H. Wu, C. C. Tseng, D. Van Den Berg [et al.] // *Cancer Research.* — 2003. — Vol. 63. — P. 7526—7529.
243. The Breast Cancer Association Consortium. Commonly studied SNPs and breast cancer: negative results from 12,000–32,000 cases and controls from the Breast Cancer Association Consortium // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2006. — Vol. 98. — P. 1382—1396.
244. The Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers // *JNCI.* — 1999. — Vol. 91. — P. 1310—1316.
245. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations / P. F. Chinnery, D. C. Samuels, J. Elson, D. M. Turnbull // *Lancet.* — 2002. — Vol. 360. — P. 1323—1325.
246. The heritability of mammographically dense and nondense breast tissue / J. Stone, G. S. Dite, A. Gunasekara [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2006. — Vol. 15. — P. 612 — 617.
247. Thompson P. A. Molecular Epidemiology of Genetic Polymorphisms in Estrogen Metabolizing Enzymes in Human Breast Cancer / P. A. Thompson, C. Ambrosone // *Journal of the National Cancer Institute Monographs.* — 2000. — Vol. 27. — P. 125—134.
248. Thyroid function in breast cancer patients / N. Ditsch, S. Liebhardt,

F. Von Koch [et al.] // *Anticancer Res.* — 2010. — Vol. 30 (5). — P. 1713—1717.

249. Transforming growth factor p2 levels in plasma of patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen / A. Kopp, W. Jonat, M. Schmahl, C. Knabbe // *Cancer Res.* — 1995. — Vol. 55. — P. 4512—4515.

250. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles / S. Seal, D. Thompson, A. Renwick [et al.] // *Nature genetics.* — 2006. — Vol. 38, N 11. — P. 1239—1241.

251. Twenty-year follow-up of the breast cancers diagnosed during the Breast Cancer Detection Demonstration Project / C. R. Smart, C. Byrne, R. A. Smith [et al.] // *CA Cancer J Clin.* — 1997. — Vol. 47 (3). — P. 134—149.

252. Variable specimen handling affects hormone receptor test results in women with breast cancer: a large multihospital retrospective study / F. L. Nkoy, M. E. Hammond, W. Rees [et al.] // *Arch Pathol Lab Med.* — 2010. — Vol. 134 (4) — P. 606—612.

253. Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility / M. Schutte, S. Seal, R. Barfoot [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 72. — P. 1023—1028.

254. Weigel M. T. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction / M. T. Weigel, M. Dowsett // *Endocr Relat Cancer.* — 2010. — Vol. 17 (4). — R245—262.