

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
МЕДИЧНИЙ ІНСТИТУТ

На правах рукопису

Лукавенко Іван Михайлович

УДК 618.19-006.03-084-089.8-06:575.822(043.5)

КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ  $PvuII$  ГЕНА РЕЦЕПТОРА  
ЕСТРАДІОЛУ АЛЬФА В ОБҐРУНТУВАННІ ПОКАЗАНЬ  
ДО ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ  
ДОБРОЯКІСНУ ДИСПЛАЗІЮ МОЛОЧНИХ ЗАЛОЗ

14.01.03 – хірургія

Дисертація  
на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Науковий керівник –  
канд.мед.наук, доцент В. В. Андрющенко

Київ – 2016

## ЗМІСТ

	С.
Перелік умовних скорочень .....	4
Вступ.....	5
<b>Розділ 1. Огляд літератури .....</b>	<b>13</b>
1.1. Сучасні погляди на патоморфологію при доброякісній дисплазії молочної залози, термінологія, класифікація.....	13
1.2. Роль естрогену та однонуклеотидного поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$ у розвитку проліферації при доброякісній дисплазії молочної залози.....	20
1.3. Перспективи діагностики проліферативних форм доброякісної дисплазії молочної залози.....	26
<b>Розділ 2. Матеріали та методи дослідження.....</b>	<b>34</b>
2.1. Інформаційне обґрунтування дослідження .....	34
2.2. Загальноклінічні методи дослідження та матеріали клінічної бази даних .....	37
2.3. Променеві методи дослідження при встановленні доброякісної дисплазії молочної залози .....	40
2.4. Методи морфологічних досліджень та характеристика морфологічної бази даних .....	42
2.5. Імуногістохімічні методи дослідження .....	45
2.6. Молекулярно-генетичні методи дослідження та характеристика генетичної бази даних .....	46
2.7. Статистичні методи опрацювання даних .....	50

<b>Розділ 3. Результати власних досліджень ..</b>	<b>52</b>
3.1. Зв'язок клінічного перебігу доброякісної дисплазії молочної залози залежно від експресії EsR $\alpha$ та впливу поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$ .....	52
3.2. Зв'язок морфології та рівня експресії EsR $\alpha$ залежно від генотипу за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$ при проліферативній доброякісній дисплазії молочної залози .....	65
3.3. Алгоритм діагностики та лікування проліферативних форм дисплазії молочної залози з урахуванням генотипів за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$ .....	92
<b>Розділ 4. Аналіз та обговорення одержаних результатів.....</b>	<b>101</b>
Висновки .....	115
Практичні рекомендації .....	116
Список використаних джерел .....	117

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

- SNP – single nucleotide polymorphism (однонуклеотидний поліморфізм);
- EsR $\alpha$  – рецептор естрогену альфа;
- EsR $\beta$  – рецептор естрогену бета;
- PvuII – однонуклеотидний поліморфізм гена EsR $\alpha$  (міжнародна назва rs223469);
- BIRADS – breast imaging-reporting and data system (система звітування даних зображень молочної залози);
- APES – aminopropiltrietskisilan (амінопропілтриетоксисилан);
- ПЛП – полімеразна ланцюгова реакція;
- ДДМЗ – доброякісна дисплазія молочної залози;
- ЗГТ – замісна гормонотерапія;
- ІГХ – імуногістохімія;
- РМЗ – рак молочної залози;
- ІМТ – індекс маси тіла;
- ЯМРТ – ядерно-магнітна резонансна томографія;
- КОК – комбіновані оральні контрацептиви;
- УЗД – ультразвукова діагностика.

## ВСТУП

### Актуальність теми

Передпухлинні хвороби молочної залози останнім часом набули значного поширення як у високорозвинених країнах світу, так і в Україні. Високий рівень фатальних наслідків та місце, яке посідають онкологічні захворювання в умовах складних фінансово-економічних і медико-соціальних негараздів, потребують використання значних інтелектуальних, організаційних та економічних ресурсів.

Частота доброякісної дисплазії молочної залози (ДДМЗ) у загальній популяції становить 35–50 %, а серед жінок репродуктивного віку – 67–95 % [25, 28, 31, 37, 40].

Відомо, що проліферативні форми ДДМЗ є фоном для розвитку раку молочної залози (РМЗ) [5, 25, 136]. Установлено, що ризик розвитку раку при непроліферативній формі ДДМЗ перевищує популяційний в 1,27 раза; при помірній проліферації – в 1,88 раза, а при атипівій проліферації – у 4,24 раза [40, 58]. Існує думка, що розвитку інвазійного раку передуює ДДМЗ, однак лише окремі морфологічні варіанти дисплазії мають пухлинний потенціал [40].

Основним етіологічним фактором, що провокує зміни у молочній залозі, вважають порушення балансу естрогенів. Так, під впливом стероїдних гормонів проявляється проліферативна активність епітеліоцитів залози. Доведена роль гіперестрогенії в розвитку мастопатії та РМЗ. На підставі наведених ефектів гормонів існують пропозиції з використання методів імуногістохімії для вивчення наявності рецепторів стероїдних гормонів та маркерів проліферації, що сприятиме своєчасному комбінованому лікуванню дисплазій молочної залози [9, 124].

У практичній діяльності хірурга-мамолога трапляється немало хворих, коли передпухлинні патологічні зміни у молочній залозі зумовлені не стільки рівнем гормонів крові, скільки рівнем експресії рецепторів до них. Проте

відомості щодо локалізації цих рецепторів у молочній залозі висвітлені недостатньо і стосуються в основному досліджень при РМЗ [105, 109, 111, 124]. Співвідношення між показниками проліферації елементів залози та рівнем експресії рецепторів стероїдних гормонів зокрема естрогену при передпухлинній патології вивчено недостатньою мірою [100, 113, 170].

Діагностичні дослідження молочної залози на сьогодні орієнтовані на виявлення вогнищевих новоутворень. Разом із тим доведено, що у 56 % обстежених атипова гіперплазія молочної залози відбувається без утворення вузлів [5]. Як зазначають автори [2, 3], частота помилок цитологічної діагностики у хворих із доброякісними пухлинами молочних залоз досягає 7 %, а неінформативність пункції – 18,6 % [46, 144]. Отже, діагностика передпухлинних змін молочної залози у значному відсотку випадків неспроможна.

Останнім часом з'явилися праці з вивчення впливу генетичних чинників, а саме простих одонуклеотидних поліморфізмів, на фенотип людини. Є відомості про вплив поодиноких поліморфізмів гена естрогену альфа ( $EsR\alpha$ ) на розвиток проліферації молочної залози [101, 164]. Але інформація про функціональний вплив окремих поліморфізмів обмежена. Вивчення поліморфізму  $PvuII$  гена  $EsR\alpha$  у забезпеченні клініцистів інформацією щодо особливостей естрогенпозитивного чи естрогеннегативного статусу новоутворення у молочній залозі може сприяти ефективності естрогенотерапії.

Зважаючи на перелічене, вивчення алельного поліморфізму поряд із клінічними та лабораторними показниками в осіб на передпухлинні процеси молочної залози дасть корисну інформацію щодо діагностики, профілактики та лікування [115, 163, 177]. Питання діагностики передпухлинних хвороб молочної залози, що є факторами високого ризику розвитку РМЗ, залишаються актуальними [4, 15, 22, 36, 70, 135, 157].

З огляду на зростання останніми десятиліттями захворюваності на проліферативні форми мастопатії та молодий вік осіб, які страждають на ці

процеси, важливим залишається пошук механізмів ранньої діагностики та новітніх критеріїв оцінювання передпухлинних хвороб. Однак прийняті на цей час методики оцінювання клінічних та інструментальних показників і морфологічних змін недостатньо інформативні. Оскільки здебільшого вони є інвазійними, це обмежує їх використання у широкому загалі, особливо під час вагітності та лактації. У зв'язку з цим пошук молекулярно-генетичних предикторів передпухлинних захворювань набирає все більшого значення, що й визначає актуальність даної проблеми. Можна зробити висновок, що завдання діагностики ДДМЗ, які є факторами високого ризику розвитку раку, залишаються актуальними та потребують подальшого наукового пошуку.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами**

Робота є складовою частиною науково-дослідних тем Сумського державного університету: «Репродуктивне здоров'я жінок Сумщини» (номер держреєстрації 0110U007596), «Роль алельного поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб» (номер держреєстрації 0110U005038), «Морфогенез загальнопатологічних процесів» (номер держреєстрації 0113U003315).

**Мета дослідження** – розробити критерії діагностики проліферативної доброякісної дисплазії молочної залози на основі імуногістохімічних та молекулярно-генетичних досліджень із метою обґрунтування показань до хірургічного лікування.

### **Завдання дослідження**

1. Визначити частоту алельних варіантів поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  у хворих на доброякісну дисплазію молочної залози.
2. Визначити провідні клінічні предиктори формування доброякісної дисплазії молочної залози у жінок із факторами ризику патології грудей.
3. Установити морфологічні та імуногістохімічні (експресія EsR $\alpha$ ) особливості при різних типах проліферативних змін молочної залози.

4. Вивчити вплив поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  на експресію EsR $\alpha$  у молочній залозі та визначити їх діагностичну значущість у хворих на доброякісну дисплазію молочної залози.

5. Визначити доцільність генетичних досліджень за вивченим поліморфізмом із метою обґрунтування хірургічного лікування хворих на доброякісну дисплазію молочної залози на підставі статистичного математичного аналізу.

6. Вивчити можливості розроблення та практичного застосування алгоритму діагностичної та лікувальної тактик у хворих на проліферативні форми доброякісної дисплазії молочної залози.

Об'єкт дослідження – проліферативні форми доброякісної дисплазії молочної залози.

Предмет дослідження – участь генетичного чинника (однонуклеотидного поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$ ) у розвитку доброякісної дисплазії молочної залози.

#### **Методи дослідження**

1. Клінічні методи дослідження, що доводять ДДМЗ і характеризують антропометричні, функціональні, біохімічні та інші показники життєдіяльності організму.

2. Морфологічні, імуногістохімічні (ІГХ) методи, які характеризують особливості рецепторного статусу ураженої тканини при ДДМЗ.

3. Визначення різних варіантів однонуклеотидного поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  із використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим проведенням аналізу фрагментів ДНК, отриманих за допомогою відповідних рестриктаз.

4. Методи статистичного аналізу, що дозволяють виявити або заперечити зв'язок між різними варіантами генотипу та розвитком патологічних процесів і хвороб у людей.



## **Наукова новизна результатів**

Уперше вивчено розподіл алельних варіантів гена *EsRα* за поліморфізмом *RvuII* у хворих на проліферативну форму доброякісної дисплазії молочної залози.

Уперше здійснено комплексний аналіз і виявлено зв'язок клініко-анамнестичних, імуногістохімічних предикторів проліферативної доброякісної дисплазії молочної залози з молекулярно-генетичними особливостями за поліморфізмом *RvuII* гена *EsRα*. Доведено, що носії мінорного алеля *C/C* за поліморфізмом *RvuII* гена *EsRα* мають схильність до виражених проліферативних та атипичних змін тканини молочної залози. Показано, що у розвитку проліферативної мастопатії важливу роль відіграє рівень експресії *EsRα*, зумовлений наявністю мінорного алеля *C/C* за поліморфізмом *RvuII* гена *EsRα*.

Уперше доведено доцільність визначення генотипу пацієнта за поліморфізмом *RvuII* гена *EsRα* під час обстеження ДДМЗ і використання цього генетичного маркера як достовірного критерію необхідності хірургічного лікування.

## **Практичне значення роботи**

Результати дослідження розширюють теоретичні знання про причини й механізми розвитку ДДМЗ, фактори ризику, ранню діагностику, вибір оптимальної тактики лікування проліферативної дисплазії та дієву профілактику РМЗ.

Одержані дані доводять необхідність генотипування за поліморфізмом *RvuII* гена *EsRα* пацієнтів групи високого ризику атипії тканини молочної залози з метою вирішення питання про доцільність хірургічного лікування та запобігання розвитку малігнізації.

Доведено, що генотип *C/C* за поліморфізмом *RvuII* гена *EsRα* асоційований зі збільшенням експресії *EsRα* та ступенем проліферації при ДДМЗ.

Доведено, що при поєднанні клінічних предикторів проліферативної дисплазії молочних залоз (мастодинія, тривалий період *mensis*), зменшенні індексу маси тіла (ІМТ) із гомозиготним станом С/С за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  показане хірургічне лікування із подальшим ПГХ-тестом.

На підставі одержаних результатів ми розробили та впровадили для застосування практичні рекомендації з діагностики, профілактики та лікування ДДМЗ зі схильністю до активної проліферації.

Розроблено та запропоновано в практику методики хірургічного лікування проліферативної форми доброякісної дисплазії молочної залози, а саме:

- спосіб профілактики лактаційної дисфункції при хірургічному лікуванні доброякісних новоутворень молочних залоз (патент України № 84896);
- спосіб оперативного лікування доброякісних захворювань протокової системи молочної залози (патент України № 83922);
- спосіб підшкірної мастектомії з одномоментним субмускулярним ендопротезуванням молочних залоз силіконовими імплантатами (патент України № 83954).

Розроблено і впроваджено в практику хірургічний інструмент для фіксації та утримання доброякісного новоутворення молочної залози (патент України № 83923).

### **Особистий внесок здобувача**

Визначення теми дисертації, поставлення завдань дослідження, обговорення та узагальнення результатів дослідження проведено разом із науковим керівником – канд. мед. наук, доцентом Андрющенком Володимиром Вікторовичем. Дисертант вивчив і проаналізував наукову й патентну літературу. Самостійно обґрунтував актуальність, визначив мету досліджень, провів підбір, клінічне обстеження хворих та формування груп пацієнтів із ДДМЗ. Дисертант самостійно забезпечив організацію проведення лабораторних досліджень, клінічне обстеження та лікування хворих.

Статистично опрацював і проаналізував результати досліджень. Написав усі розділи дисертації, сформулював основні положення та висновки, що виносяться на захист, оформив дисертаційний матеріал.

### **Апробація результатів дисертаційної роботи**

Основні положення і результати наукової праці доповідалися та обговорювалися на: III Міжнародному науково-практичному семінарі, присвяченому Всесвітньому дню боротьби з раком (2012 р.); Міжнародній науковій конференції студентів і молодих учених «Актуальні питання сучасної медицини» (2014 р.); I та II Міжнародних науково-практичних конференціях студентів та молодих учених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини» (2013, 2014 рр.), IV з'їзді ВАПРЕХ «Актуальні питання пластичної, реконструктивної та естетичної хірургії» (2014 р.), 1st International Academic Congress «Fundamental and Applied Studies in the Pacific and Atlantic Oceans Countries» (Tokyo, Japan, 25 October 2014).

Основні положення дисертаційної роботи та наукові розробки впроваджені у навчальний процес студентів і лікарів-інтернів кафедри хірургії з дитячою хірургією з курсом урології Сумського державного університету, а також у роботу лікувальних установ м. Сум та Сумської області.

### **Публікації за темою дисертації**

За матеріалами дисертації опубліковано 23 наукові праці, в яких повністю відображені основні результати дисертації, зокрема 4 статті – у фахових наукових виданнях України; 2 статті – у виданнях, що входять до наукометричної бази Scopus, 1 – у зарубіжному виданні, 12 публікацій – у вигляді тез доповідей наукових конференцій та конгресів. Отримано 4 деклараційні патенти України на корисну модель.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація викладена на 135 сторінках друкованого тексту, складається з таких розділів: вступу, огляду літератури, розділів матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, порівняльного

оцінювання результатів досліджень, обговорення та висновків. Список використаних джерел включає 184 найменування. Робота ілюстрована таблицями, малюнками та схемою діагностичного алгоритму доброякісної дисплазії молочних залоз.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Сучасні погляди на патоморфологію при доброякісній дисплазії молочної залози, термінологія, класифікація**

Загальна назва доброякісних змін молочної залози, що значно відрізняються між собою за анатомічними ознаками, клінічними проявами, небезпекою малігнізації, змушує розглядати це захворювання як передпухлинну хворобу – мастопатію. Відповідно до рекомендації МКХ-10 правильним терміном є доброякісна дисплазія молочних залоз.

Уперше кістозні зміни у молочній залозі описав у 1829 році Cooper. У 1838 році при визначенні мастопатії J. Velpeau використав термін «хронічна індурація». У 1840 році R. Brodie запропонував цю недугу називати «серозно-кістозна пухлина молочної залози», а Shimmelbush у 1892 році – «кістозна аденома».

Такі синоніми, як «хвороба Реклю», хвороба «Шиммельбуша», «грудна залоза, що кровоточить», «хронічний кістозний мастит», мають лише історичне значення. Однобічно характеризує захворювання і термін «фіброаденоматоз», прийнятий в англійській літературі. Термін «доброякісна дисплазія молочних залоз» не набув у вітчизняній літературі значного поширення, оскільки «накладається» на більш вузький термін – «дисплазія епітелію», що застосовується для визначення процесів, у яких «задіяний» як епітеліальний, так і сполучнотканинний компонент. Більш адекватним є термін «фіброзно-кістозна хвороба» з визначенням ступеня проліферації й атипії клітин.

Виділяють декілька ступенів проліферації тканини молочної залози із наростанням її атипії та переходом у рак: 1-й – норма, де епітеліальні клітини розміщені трьома – чотирма прошарками; 2-й – помірна гіперплазія, коли епітеліальні клітини утворюють більше ніж чотири прошарки, часто із супутнім замиканням порожнистого простору; 3–4-й – гіперплазія, якщо

спостерігається розмноження клітин у групах гіперпластичних осередків із типовою появою перекритого і нечіткого розподілів ядер; атипова протокова гіперплазія морфологічно імітує протоковий преінвазивний рак; 5-й – *in situ* [12, 182].

Визначають високий та низький ступені атипії епітелію у хворих на ДДМЗ. За даними епідеміологічних досліджень, високий ступінь атипії пов'язаний із розвитком РМЗ [142, 157].

Одне з центральних місць у онкоморфології молочної залози займають проліферативні форми дисплазії як потенційні причини розвитку раку. У зв'язку з цим, на нашу думку, доцільно відступити від викладення матеріалу відповідно до стандартної схеми дисгормонального захворювання і почати опис цього процесу з огляду на пухлинний потенціал. Правильніше, з комплексу процесів, що характеризуються, за трактуванням ВООЗ (1984 р.), широким спектром проліферативних та регресивних змін тканини молочної залози з ненормальним співвідношенням епітеліального і сполучнотканинного компонентів.

Існує значна кількість класифікацій дисгормональних гіперплазій, кожна з яких більшою чи меншою мірою віддзеркалює прогресивні (гіперплазія) і регресивні (фіброз) зміни молочної залози [57].

В Україні у клінічній практиці прийнята класифікація, розроблена С. А. Холдіним (1962) і модифікована в подальшому Д. І. Головіним [12]. Ця класифікація поділяє ДДМЗ на дифузні й вузлові форми, що відображаються на рентгенограмах під час ультразвукового та морфологічного досліджень. Для клініциста такий розподіл виявився зручним у використанні, але на сьогодні він морально застарілий, оскільки відомо, що у 56 % хворих атипова гіперплазія молочної залози проходить без утворення вузлів [5]. У 1981 році ВООЗ запропонована «Гістологічна класифікація пухлин молочної залози».

У нашому науковому дослідженні ми користувалися запропонованою патоморфологами класифікаційною схемою А. G. Selim, С. А. Wells (1999) [170].

Останнім часом простежується тенденція до зростання частоти дисгормональних захворювань молочної залози, що діагностуються у кожній 4-ї жінки у віці до 30 років [4, 28, 61, 62]. А серед підлітків 4–8% страждають на різні види дисплазії [13, 33, 35, 42, 54, 89, 120, 122, 137, 149].

Особливої актуальності ця проблема набуває через те, що проліферативні форми ДДМЗ розглядають як маркери ризику раку, який у 3–5 разів частіше виникає при дифузних змінах паренхіми і в 30–40 разів частіше – при вузлоутворенні [1, 20, 29, 123].

Розвитку інвазійного раку завжди передують доброякісні захворювання молочних залоз, однак лише окремі морфологічні варіанти мають пухлинний потенціал [40]. Деякі автори [122, 144] пов'язують розвиток осередків малігнізації у молочній залозі з утворенням проліферативних центрів серед клітин різного типу (епітелій, міоепітелій, фіброзна тканина тощо).

Відносний ризик розвитку РМЗ за різних варіантів передпухлинних захворювань наведено нижче.

1. Не підвищують ризику розвитку (непроліферативні захворювання):

- ✓ метаплазія;
- ✓ ектазія проток;
- ✓ мастит.

2. Невелике збільшення ризику (в 1,5–2 рази) – проліферативні захворювання без атипії:

- ✓ склерозивний аденоз та фіброаденома (в 1,7 рази);
- ✓ гіперплазія епітелію проток;
- ✓ внутрішньопротокова папілома;
- ✓ виражені фіброзно-кістозні зміни.

3. Помірне підвищення ризику (в 4–5 разів):

- ✓ атипова гіперплазія (протокова, часточкова);

✓ гіперплазія епітелію проток та обтяжений сімейний анамнез на РМЗ.

4. Високий ризик (у 8–10 разів):

✓ часточкова карцинома *in situ*;

✓ протокова карцинома *in situ*;

✓ атипова протокова гіперплазія та обтяжений сімейний анамнез на РМЗ.

Розрізняють непроліферативну і проліферативну форми ДДМЗ [40]. До непроліферативних уражень відносять: кісти, папілярні апокрифові зміни зв'язані з епітелієм кальцинати, м'яку епітеліальну гіперплазію; протокову ектазію; несклерозивний аденоз, навколопротоковий фіброз. Уперше кістозна форма мастопатії була описана Бельто у 1838 році як хронічний кістозний мастит під назвою «*induration en masse*». Сучасні погляди науковців ґрунтуються на думці, що непроліферативна форма ДДМЗ не пов'язана з ризиками малігнізації і потребує лише спостереження без подальшого лікування [58, 147]

Однак деякі дослідники вважають, що непроліферативні форми ДДМЗ хоча і не мають загрози малігнізації, але при тотальному ураженні асоціюються із виникненням РМЗ [136]. Наприклад, при дифузній кістозній трансформації (полікістоз) асоціація з РМЗ спостерігається у 3 % [136]. Сверджується, що ризик малігнізації при непроліферативних формах ДДМЗ перевищує популяційний в 1,27 раза, при помірній проліферації – в 1,88 раза, а при атиповій проліферації – у 4,24 раза [5, 46].

Під час гістологічного дослідження операційного матеріалу РМЗ поєднується з дисплазією у 40–90% випадків, а ризик малігнізації при непроліферативній формі становить близько 1 %; при помірній проліферації – 2 %; при різко вираженій проліферації – до 25 %, а при проліферації з атипією досягає 40 % [8].

Останнім часом інтерес до ДДМЗ зростає передусім завдяки проліферативним формам, частота яких у загальній популяції становить 36–50 %, а серед жінок репродуктивного віку, які страждають на різні гінекологічні захворювання, досягає 67–95 % [45, 57, 123].



Проліферація епітелію в основному починається з термінальних відділів у часточках (часточкова гіперплазія) чи у прилеглий до часточки екстрачасточковій протоці (протокова гіперплазія). При виявленні того чи іншого виду гіперплазії виникають окремі труднощі, оскільки основні зміни виникають у різних відділах одночасно. З огляду на це пропонують виділяти слабку, помірну і тяжку дисплазію в епітелії проток та часточок за аналогією з іншими локалізаціями, але такий підхід не виправдав себе щодо епітелію молочної залози, оскільки в ній ураховують не лише і не стільки атипію окремих клітин, скільки наявність структурних змін у цілому [8, 12].

Так, ступінь ризику розвитку раку на фоні атипової часточкової гіперплазії коливається у межах 9–14 разів у жінок у віці 45–47 років щодо частоти раку в популяції та зменшується до 3 разів у жінок у віці 55–65 років. Клінічно цей вид ураження ніяк не проявляється і визначається лише мікроскопічно під час дослідження сектору молочної залози, видаленого з приводу диспластичних змін. Хворі, у яких виявлено вогнища атипової часточкової гіперплазії, мають повинні перебувати під динамічним контролем. Існує думка, що такі хворі можуть підлягати гормональній терапії антиестрогенами [173, 174, 178, 184].

У процесі дисплазії епітеліальний компонент може трансформуватися з гіперплазії у метаплазію, атипію та рак. Сосочкові проліферати мають особливе значення. Протоковий папіломатоз також пов'язаний із проліферативною епітеліальною гіперплазією. Доведено, що жінки з такими змінами мають високий ризик захворіти на рак [78]. Установлено, що множинні дрібні папіломи на відміну від папілом великих проток, підвищують ризик розвитку раку у 4–6 разів порівняно з іншими різновидами протокової гіперплазії. За наявності 5 і більше папілом у межах локалізованого сегмента констатують папіломатоз. Численні папіломи частіше спостерігаються білатерально. Ймовірність їх метаплазії у рак вища, ніж при центральній папіломі. Несприятливим у цьому плані визначається процес, що одержав назву «ювенільний папіломатоз» який трапляється у

12–16 річному віці та уражає протоки на значному проміжку. Макроскопічно у видаленій частині такої залози виявляють дрібні кісти із сірими пухкими масами у просвіті. Мікроскопічно виявляються множинні кістозно розширені протоки з папіломами. Крім того, виявляють виражену проліферацію епітелію, іноді – за типом аденозу. Пацієнтки з подібними змінами потребують тривалого спостереження, оскільки доведено, що у 5 % на фоні цього процесу у подальшому виникає рак [14, 27].

Протоковий папіломатоз виникає рідко і спостерігається у молодих жінок до 30 років [154].

Типовим варіантом фіброепітеліальної проліферації є фіброаденома, що нерідко виявляється разом з іншими варіантами проліферації у вигляді дрібних вузлів серед фокусів аденозу чи осередків склерозу [5, 8, 12].

У групі пухлин та пухлиноподібних уражень молочної залози після раку і ДДМЗ фіброаденома займає третє місце [181].

У відомих джерелах літератури відсутня однозначна думка щодо небезпеки фіброепітеліальних вогнищ проліферації [133, 169].

За даними авторів, фіброаденоми становлять 18 % серед усіх вузлових новоутворень і проявляються трьома гістологічними варіантами: периканалікулярним (51 %), інтраканалікулярним (47 %), змішаним (2 %) [40]. У 9,3 % діагностують двобічну форму фіброаденоматозу, а у 9,4 % – множинну. Ймовірність малігнізації фіброаденом становить 0,5–1%, а при інтраканалікулярному рості – у 2–7,5 рази вище [40].

Клінічні прояви фіброаденом зумовлені особливостями їх гістологічної будови. При утрудненій інструментальній діагностиці (УЗД, мамографія) використовують імуногістохімічні дослідження, що не лише доповнюють відомості про нозологічну належність новоутворення, а й дозволяють оцінити характер росту, що впорядковує показання до хірургічного лікування, враховуючи небезпеку малігнізації залежно від їх гістологічної будови.

Міоепітеліальний тип проліферації і склерозивний аденоз клінічно можуть проявлятися невеликими рухливими, іноді множинними щільними

вузликами, що імітують рак, а при мамографічному обстеженні розпізнаються із труднощами. У подібних випадках рекомендують виконувати швидке гістологічне дослідження, що дозволяє встановити правильний діагноз [144, 145].

Подібні труднощі трапляються й за іншого різновиду склерозивного процесу у молочній залозі, що одержав декілька назв: «проліферативний центр Semba», «радіальний шрам», «склерозивна сосочкова проліферація», «доброякісна сосочкова протокова проліферація», «інфільтруюча епітеліома», «індуративна мастопатія».

«Проліферативний центр Semba» є псевдоінфільтруючим пошкодженням, що підвищує ризик РМЗ удвічі [145]. Клінічно захворювання проявляється у вигляді щільного вузла діаметром до 1 см та потребує диференціального діагнозу з раком. Мамографічна картина може нагадувати вузол із характерним зірковим малюнком. Макроскопічно це щільне новоутворення зіркової або овальної форми білого кольору. Мікроскопічно визначається фіброеластоїдне ядро, що має тубулярні структури, затиснені у стромі. По периферії центрального ядра визначаються розширені протоки із солідними, сосочковими, криброзоподібними структурами з усіма варіантами атипової протокової гіперплазії. Іноді утвір включає мікрокальцинати. Далі від центра переважають кісти різного діаметра. Таким чином, простежується певна зональність розподілу структур за радіусом, від центра до периферії. Звідси одна з назв – «радіальний рубець». Проліферативні зміни можуть бути множинними, поєднуватися зі звичайними ділянками фіброзно-кістозної хвороби [25, 144].

Різноманітність морфологічних структур, властивих ДДМЗ, виникає у результаті розвитку проліферативних центрів, а з останніми – морфогенез раку, особливо тубулярного [3, 5, 8, 144]. Патоморфологи схиляються до того, що частота розвитку РМЗ залежить від кількості осередків проліферації, тривалості захворювання ДДМЗ та періоду спостереження за пацієнтом [66, 135, 144].

Таким чином, основні шляхи онкогенезу модулюються через механізми проліферації, яка характеризує ДДМЗ. Крім того, на них впливають стресові ситуації та генетичні зміни організму.

## **1.2. Роль естрогену та однонуклеотидного поліморфізму RvuII гена EsRa у розвитку проліферації при доброякісній дисплазії молочної залози**

Відомо, що молочна залоза – орган-мішень для ряду гормонів [9, 11, 32, 85, 100]. Це істотно впливає на особливості її будови та істотні зміни під час вагітності й лактації. Найвагоміша роль серед усіх гормонів, що регулюють функцію молочної залози у нормі, належить естрогену та прогестерону.

Основним етіологічним чинником, який провокує морфологічні та функціональні зміни у структурі молочної залози, визнано зміну балансу естрогенів із розвитком відносної чи абсолютної гіперестрогенії. Остання призводить до проліферації епітелію, сполучної тканини і проток, що, у свою чергу, спричиняє порушення гістоструктури. Прогестерон та його аналоги беруть участь у регуляції проліферації та диференціюванні паренхіматозних клітин органа [58, 38].

Під впливом естрогену можуть проявлятися зміни проліферативної активності епітеліоцитів залози, підвищення якої розглядається як важливий показник на злоякісне переродження [32, 53, 101, 164].

Останніми роками в літературі обговорюється багато факторів ризику ДДМЗ. Однак єдиного трактування їх значущості не існує. Більшість дослідників відзначає порушення обміну естрогенів як основний фактор у розвитку ДДМЗ і раку [9]. Серед дослідників зазначеної тематики до цього часу немає єдиної думки щодо того, чому в ряді випадків проліферативні зміни поширюються не на всю молочну залозу, а лише на її окремі ділянки. Більшість авторів виходять із того, що таке явище зумовлене не стільки рівнем гормонів крові, скільки станом рецепторного апарату [109, 111]. Саме тому в нашому дослідженні було порівняно особливості патоморфології

тканини ДДМЗ і поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  з локалізацією новоутворень, показниками естрадіолу крові, захворюваннями матки, яєчників, наявністю абортів, пологів у анамнезі тощо. Гормональний дисбаланс у тканині молочної залози у бік надлишку естрогену супроводжується набряком і гіпертрофією внутрішньочасточкової сполучної тканини, а проліферація протокового епітелію призводить до формування кіст.

На підставі клінічних даних та досліджень на тваринах автори доводять, що естроген прямо причетний до онкогенезу [124]. Вони висловлюють думку, що фактори ризику, пов'язані із захворюванням на рак, кумулятивно впливають на епітелій молочної залози через естроген. Ще однією клінічною ознакою ДДМЗ може бути синдром виділення з молочної залози (сецернація). Явище сецернації не є специфічним, але свідчить про набряк тканини та може бути додатковим клінічним критерієм впливу стероїдних гормонів [9, 13].

Привертають до себе увагу праці, в яких вивчений і доведений негативний вплив на молочну залозу патологічних станів статевих органів, що впливає на рівновагу статевих гормонів [27, 33]. Це хронічні, часто рецидивні запальні захворювання (аднексит, ендометрит, кольпіт), пухлини матки (лейоміома), порушення менструально-овуляторного циклу (хронічна ановуляція, лютеїнова недостатність, синдром передчасної лютеїнізації фолікула). Установлено, що ДДМЗ відзначається втричі частіше у жінок із зобом [15, 35]. Оскільки ДДМЗ трапляється у віці 20–45 років, тобто у період найбільшої активності статевих залоз, деякі автори [33, 51, 54] пов'язують це із захворюванням геніталій.

Існує дві гіпотези, що пояснюють цей вплив [174]. Перша доводить, що зв'язок естрогену зі своїм рецептором стимулює проліферацію клітин через активацію синтезу ДНК, яка може призвести до мутацій, що порушують такі клітинні процеси, як апоптоз, проліферація клітин чи реплікація ДНК. Друга гіпотеза стверджує, що метаболізм естрогенів супроводжується утворенням генотоксичних продуктів, які можуть безпосередньо ушкоджувати ДНК у

результаті точкових мутацій. Автори наводять докази, що естрогени можуть діяти через обидва механізми. Так, ще у кінці XIX ст. англійським хірургом George Beatson було доведено, що оваріоектомія призводить до регресії поширеного РМЗ [87].

Із того часу почалося плідне вивчення рецепторного статусу клітин різних органів і особливостей проходження деяких хвороб. Сьогодні у розвинених країнах світу визначення гормонального статусу пухлин у пацієнтів, хворих на РМЗ, – обов'язкова діагностична процедура [125].

Першими клінічними маркерами, визначення яких стало використовуватися у практичній медицині, були рецептори до стероїдних гормонів: естрогенів (EsR) і прогестерону (PrR). Їх визначення проводилося у хворих на рак, і результати враховувалися при призначенні терапії. Вважається, що наявність у пухлині EsR та PrR свідчить за чутливість останньої до екзогенних гормонів і враховується як позитивно–прогностичний чинник. PrR синтезується в клітині під дією естрогенів і, як наслідок, визначається показником функціональної активності EsR.

Отже, найбільш дослідженими й такими, що заслуговують на увагу клініцистів, є рецептори естрогену [19, 26, 114]. Перший підтип цих рецепторів (EsR1, EsR $\alpha$ ) у клітинах пухлин молочної залози детально описаний ще у 1986 році [126]. З наявністю EsR $\alpha$  пов'язують чутливість тканин до антиестрогенів. Десять років потому був виявлений другий підтип цих рецепторів – EsR $\beta$ , – у тимусі, селезінці, яєчниках і яєчках людини [146, 92].

Доведено, що ці підтипи рецепторів виконують різну трансдукцію гормональних сигналів. Після стимуляції 17-бетаестрадіолом EsR $\alpha$  активується транскрипція генів, а після стимуляції EsR $\beta$  транскрипція, навпаки, пригнічується [97]. Однак свідчення про локалізацію та рівень рецепторів у інтактній тканині молочної залози у науковій літературі висвітлені недостатньо і більше стосуються порівняльних досліджень про рак [52, 86, 130, 141, 175].

На сьогодні відомо, що вміст рецепторів стероїдних гормонів завжди більший у високодиференційованих пухлинах. Установлено, що тканини з рівнем експресії EsR, PrR 10 % та більше чутливі до гормонотерапії, тобто є рецептор-позитивними [56, 173, 184]. Хворі, у яких експресія EsR, PrR у тканині менша за 10 % (рецептор-негативні), на гормонотерапію реагують лише у 5–10 %.

Інформація про вміст рецепторів стероїдних гормонів у інтактній тканині молочної залози суперечлива. Доведено, що у незмінній тканині та при ДДМЗ рецептори стероїдних гормонів виявляються значно рідше і в меншій кількості, ніж у тканинах злоякісної трансформації [59, 143].

EsR $\alpha$  вивчені в осередках протокової проліферації і часточкових гіперплазій. Автори висловлюють думку, що наявність цього маркера у клітинах доброякісних новоутворень є несприятливим фактором, який свідчить про ризики РМЗ. З метою прогнозування перетворення протокової гіперплазії молочної залози на рак запропонували визначати у них експресію EsR $\alpha$ . Хворим із ризиком на РМЗ призначають тамоксифен, який інгібує проліферацію клітин [172,173].

Інші автори у своїх дослідженнях також визначили посилення експресії EsR $\alpha$  при доброякісних та передпухлинних хворобах молочної залози і зробили висновки, що вона може бути загальним механізмом при проліферативних захворюваннях молочної залози та ранньою ознакою генетичних змін РМЗ [105].

Існують протилежні результати. Вчені дослідили, що у незмінній тканині молочної залози рецепторний статус був позитивним у 58 % досліджених, а експресія EsR $\alpha$  була достовірно вищою у незмінній тканині, ніж у пухлині [60].

Таким чином, відсутність чітких та об'єктивних критеріїв про розподіл, рівень та функціональну активність рецепторів естрогену у молочній залозі, їх взаємозв'язок із гістологічною формою хвороби є актуальною проблемою у діагностиці та лікуванні хворих на ДДМЗ. Вирішення цих завдань може

пояснити не лише патогенетичні механізми розвитку проліферативних процесів, а й допоможе коректно призначити мамологу терапію з метою їх профілактики. Поряд із клінічними характеристиками визначення стану експресії EsR $\alpha$  – важливий чинник, що допоможе будувати схеми індивідуального комплексного лікування і обґрунтуватиме доцільність гормонотерапії. Перелічене свідчить про потребу вивчення рецепторного статусу тканини молочної залози. У той самий час у працях, що мають практичну спрямованість, рідко проводиться паралельне вивчення рівня експресії рецепторів та їх молекулярно-генетичних особливостей при передпухлинній патології.

Генетичні пошкодження, що можуть виникати у результаті інтенсивного проліферативного клітинного поділу, здатні повністю трансформувати генотип клітини, перетворюючи її з нормальної на злякисну [103]. Основні шляхи онкогенезу модулюються через механізми проліферації, диференціювання тканин, стресові ситуації, а також генетичні зміни організму. Аналіз даних засвідчує, що оцінювання цих уражень допоможе забезпечити корисною інформацією стосовно можливого виникнення пухлин, а також з'ясувати походження та функціональне значення конкретного фенотипу через біологічні особливості організму [115, 117, 118].

Оскільки мутації – характерна риса злякисних клітин, то молекулярно-генетичні методи будуть мати високу специфічність. З іншого боку, оскільки процес злякисної трансформації багатостадійний і тривалий, можна очікувати, що ті чи інші мутації імовірні й при передпухлинних процесах, наприклад при проліферативній формі ДДМЗ, що доводить ряд наукових праць [49]. Додатковими дослідженнями можна встановити реальні оцінювання для специфічності конкретних показників. Використання молекулярних маркерів при проліферативних хворобах молочної залози дозволяє проводити діагностику, оцінювання ступеня поширеності хвороби та прогноз, оцінювання медикаментозного впливу.



З огляду на той факт, що EsR $\alpha$  характеризується як показник проліферації та диференціювання тканини молочної залози, а точкові мутації гена EsR $\alpha$  цікаві для вивчення як можливі причини розвитку проліферативних змін при ДДМЗ, ми дослідили літературні дані про вивчення молекулярно-генетичних маркерів порушення роботи EsR $\alpha$ .

Ген EsR $\alpha$  локалізується у 6-й хромосомі та кодує рецептор естрогену альфа. Рецептор являє собою трансмембранний білок, С-кінець якого має центр зв'язування з лігандом, а N-кінець вміщує декілька доменів, що сприяють збільшенню транскрипційної активності ряду генів. Приєднання гормонів до рецептора викликає дисоціацію комплексу рецептора з білком HSP90. Далі рецептор у вигляді гетеродимеру взаємодіє з естрогеновим відповідним елементом (estrogen response element), збільшуючи експресію відповідних генів. Серед причин, за яких важливе вивчення поліморфізму гена EsR $\alpha$ , – гормоноспецифічні пухлини у жінок, неспецифічна дисплазія сполучної тканини, пролапс геніталій тощо [83, 131, 151].

Установлено, що наслідками наявності поліморфізмів гена EsR $\alpha$  є зміна реакції сполучної тканини на гормональну дію і, як наслідок, проходження змін в її структурі [96, 151].

На сьогодні у пошукових системах зареєстровано близько 2234 поодиноких однонуклеотидних поліморфізмів гена EsR $\alpha$  [131]. Поліморфізм RvuII гена EsR $\alpha$  вивчався найчастіше. Міжнародний код поліморфізму RvuII – rs2234693, назва поліморфізму – T1943C (заміна нуклеотиду тиміну на цитозин у некодуючій частині гена, що зачіпає сайт рестрикції RvuII, частота мутантного гена в популяції 42–45 %, тип наслідування аутосомно-домінантний), спостерігається у чоловіків та жінок із однаковою частотою. Для розвитку захворювання достатньо успадкувати 1 мутантний варіант гена від одного з батьків, ймовірність виникнення хвороби у дітей становить 50 %. Функції гена: кодує альфа-рецептор гормону естрогену, що бере участь у регуляції статевого дозрівання, росту, функціонуванні серцево-судинної системи [112].

Ряд асоціацій між поліморфізмом RvuII ESR $\alpha$  та деякими патологічними станами уже був вивчений. Зокрема, це стосується хвороб серцево-судинної системи [104], інфаркту міокарда [108], остеопорозу [83], артеріальної гіпертензії [81, 183], прееклампсії [80], гіпоспадії [116], спонтанного аборту [74], венозного тромбозу та емболії [84], раку ендометрія [106] і нейродегенеративних хвороб [82, 160, 161]. У 1991 році з'явилися перші повідомлення про перебудови у локусі кодування EsR $\alpha$ , пов'язані з розвитком РМЗ [162].

Сучасні наукові дослідження хвороб молочної залози орієнтовані на вивчення поодиноких поліморфізмів гена EsR $\alpha$  у різних популяціях, передусім на визначення асоціації з РМЗ [72, 76, 107, 109, 110, 115, 128, 152, 175, 177]. Так, дослідники стверджують, що аналіз поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  разом із визначенням експресії EsR $\alpha$  у пухлинній тканині може передбачити реакцію грудей і гінекологічного раку на призначення антиестрогенів (тамоксифен) [156]. Проте інформації щодо вивчення взаємозв'язку RvuII гена EsR $\alpha$  з ДДМЗ в Україні не знайдено.

Отже, незважаючи на достатню кількість праць із вивчення структурних особливостей молочної залози, до цього часу не виділені чіткі морфологічні та ІГХ-критерії ДДМЗ з урахуванням клінічного перебігу. Не визначені роль та ступінь впливу на них генетичних і гормональних факторів [17, 86, 132], що потребує вивчення їх взаємозв'язку і впливу на перебіг ДДМЗ та обґрунтування показань до можливого хірургічного втручання.

### **1.3. Перспективи діагностики проліферативних форм доброякісної дисплазії молочної залози**

До методів відбору пацієнтів у групу ризику відносять анкетування, ультразвукове дослідження (УЗД), самообстеження, рентгенодіагностику, визначення базальних гормонів крові та титру рецепторних білків. Відповідно до висновку експертів ВООЗ тести для масового огляду повинні бути високоінформативними (до 80 %) та з низьким відсотком помилкових

результатів. Разом із тим вони мають бути технічно простими, здатними досліджувати значну кількість осіб, швидко аналізованими, нетравматичними та економічно обґрунтованими.

Електрофізіологічні методи (електроakupунктурна діагностика, метод Фоля), іридодіагностика, вимірювання електропровідності тканини та інші не набули належного поширення у практичній мамології.

Анкетування дозволяє відібрати 38 % жінок до групи ризику та на 62 % зменшити кількість осіб, які потребують дообстеження. Найбільш значущими чинниками, відображеними в анкеті, є: надлишкова маса тіла після 40 років; перші пологи після 30 років; перша вагітність після 30 років, що завершилася абортom; початок менструації після 15 років; гостра психічна травма або постійний хронічний стрес; попередні хірургічні втручання на молочній залозі; злоякісні захворювання будь-якої локалізації у близьких та рідних.

Незважаючи на достатню кількість сучасних методів діагностики захворювань молочної залози, на першому місці залишаються клінічний метод обстеження, огляд і пальпація залози та зон лімфатичного відтоку. Крім того, до основних методів діагностики відносять традиційне рентгенологічне дослідження, УЗД, магніторезонансну томографію (МРТ), інтервенційну діагностику (біопсію) [88].

Рентгенологічний метод є базовим у дослідженні молочних залоз. До переваг потрібно віднести високу інформативність багатопроєкційність зображення, особливо при новоутвореннях, що не пальпуються, можливість диференціальної діагностики, сприяння для проведення інтервенційних процедур та інше. Однак основним недоліком мамографії залишається той факт, що щільний фон тканини у 6 % обстежених не дозволяє виключити рентгенонегативне злоякісне новоутвірєння. Це унеможлиблює використання мамографії у жінок молодого віку з метою ранньої діагностики хвороб молочної залози [14, 20, 23].

УЗД завдяки інформативності, неінвазійності, швидкості використання, можливості багаторазового проведення без шкоди для пацієнтки займає одне з провідних місць серед інших методів дослідження. Можливості УЗД розширилися завдяки енергетичному доплеру, нативній та вторинній гармоніці, тривимірному зображенню, ангіографії, еластографії тощо. До основних переваг УЗД відносять: можливість обстеження вагітних жінок, обстеження молодих жінок, проведення диференціальної та інтервенційної діагностики, динамічний контроль за лікуванням. До недоліків УЗД відносять: суб'єктивність діагнозу, малу інформативність при жировій інволюції. Проте, незважаючи на комплексне використання сучасних діагностичних методів, іноді діагноз залишається невстановленим. Методика дуплексного та триплексного УЗД підвищує специфічність традиційного УЗД від 83 до 93 %, точність комплексної діагностики РМЗ – з 93 до 98 %, утвору, що не визначається пальпацією, – з 62 до 75 % [88].

ЯМРТ відрізняється високим контрастом м'яких тканин, дозволяє одержувати зображення у будь-якій проекції з високою чіткістю. Висока специфічність досягається при динамічному обстеженні з внутрішньовенним контрастуванням. Показаннями до використання ЯМРТ залишаються дослідження молодих жінок, вагітних та жінок у період лактації, мультифокальні ураження молочної залози, гігантомастія. ЯМРТ не використовують при вживлених електронних системах та феромагнітних імплантатах [88, 147].

Інтервенційні методи діагностики (біопсія) дозволяють насамперед установити якісний характер ураження. Однак цю маніпуляцію необхідно проводити під контролем методу, що допомагає візуалізувати новоутворення достовірно. Тому біопсію виконують за наявності вогнища, не меншого за 5 мм, та при локалізації новоутворення не в зоні магістральних судин і з мінімалізацією ятрогенних ускладнень (пневмоторакс) [158].

Методи дослідження вмісту гормонів та їх метаболітів ґрунтуються на імунологічних способах – радіоімунологічному та імуноферментному або на

імунофлуоресцентних варіантах детекції комплексів «антиген – антитіло», де роль антигенів відіграють гормони та їх метаболіти. Крім того, останнім часом став поширюватися імунохромато-мас-спектрометричний метод, який вважали референтним для дослідження ряду гормонів. Перевагами цього методу є висока специфічність і точність, однак до цього часу він залишається досить вартісним. Крім того, концентрації гормонів, отриманих різними методами, можуть відрізнятись. Більше того, вони можуть залежати від конкретних фірм-виробників [65].

Важливим напрямком у діагностиці ДДМЗ є розроблення методів, на основі яких можна прогнозувати ризик розвитку раку [69]. Вплив стероїдів на тканину молочної залози пояснює використання методів ІГХ для вивчення рецепторного статусу при ДДМЗ, оскільки дозволяє виявити точну локалізацію тканинного чи клітинного компонентів за допомогою імунологічних та гістохімічних реакцій. При цьому імунологічний аналіз тканини та біопсійного матеріалу проводиться в умовах збереження морфології тканин [11, 32, 44, 73, 164].

У діагностичній практиці виділяють декілька основних сфер використання ІГХ: по-перше, з метою визначення гістогенезу недиференційованих пухлин, для встановлення віддалених метастазів, для диференціювання окремих компонентів, що входять до комплексу пухлини; по-друге, з метою прогностичного оцінювання подальшого перебігу хвороби і, нарешті, під час призначення терапії [44, 77, 164].

Безсумнівна роль ІГХ при визначенні рецепторів до стероїдних гормонів із метою можливого призначення ряду гормональних препаратів (тамоксифен). Визначення рецепторів до стероїдних гормонів доцільне для вибору тактики лікування та встановлення ефективності гормонотерапії, оскільки чутливість тканини залози до гормонів визначається збереженням і функціональною активністю рецепторів, які мають здатність «приймати гормональний сигнал» і транслювати його в ядро [166].

ІГХ-метод дозволяє більш точно оцінювати ризик можливого злоякісного перетворення пухлин. При встановленні ризиків злоякісної трансформації молочної залози автори довели, що вивчення рецепторного статусу дозволяє встановити ступінь можливої трансформації, який дає нові можливості для лікування хворих із різними формами ДДМЗ [77, 140].

Обґрунтуванням для введення в сучасну медицину генетичних маркерів є концепція патогенезу злоякісного переродження, яка при РМЗ виділяє ряд послідовних стадій, що відрізняються властивостями епітеліальних клітин проток та альвеол. Стадійність процесу канцерогенезу можна подати у вигляді такого ряду: порушення регуляції → гіперплазія I, II, III ст. → неоплазія. Реалізація кожного етапу трансформації потребує певних молекулярних перетворень. Весь процес потребує від трьох до семи незалежних випадкових змін, пов'язаних із генетичними чи епігенетичними змінами у функції ряду ключових протеїнів – регуляторів клітинного циклу [47, 49, 75, 118].

На сьогодні доведена роль мутації генів BRCA1 та BRCA2 у виникненні РМЗ. У випадку мутації BRCA1 її оцінюють як 80 % ймовірність розвитку РМЗ при досягненні 70-річного віку. Проте мутація гена BRCA1 відносно не часта у спорадичних формах РМЗ [7, 148, 171].

На цей час виявлено не менше 80 факторів ризику РМЗ [13, 15, 28, 31, 33, 40, 54, 79, 89, 121, 122, 135, 138, 150, 120].

Основні з них можна поділити на 5 класів [37, 55, 98]:

1. Статеві, вікові, конституціональні: жіноча стать, вік більше 60 років, високий зріст.

2. Генетичні: кровні родичі, які хворіли на РМЗ; сімейний РМЗ; носії мутантних генів BRCA1 і BRCA2; мутації інших генів – p53, ATM, NBS1, LKB1, ER; генетичні синдроми; первинно-множинні пухлини.

3. Репродуктивні: раннє менархе (до 12 років), пізня менопауза (після 54 років), відсутність вагітностей, пізня перша вагітність (після 30 років), відсутність лактації, аборти.

4. Гормональні та метаболічні порушення: гіперестрогенії, гіпотиреоз, порушення обміну гормонів гіпофіза, порушення менструального циклу, безплідність, гінекологічні хвороби, ожиріння, цукровий діабет, хвороби печінки, замісна гормонотерапія, вживання комбінованих оральних контрацептивів більше 10 років.

5. Фактори зовнішнього середовища: проживання в економічно розвинених країнах, високий соціально-економічний статус, дія іонізуючого випромінювання і хімічних канцерогенів, зловживання алкоголем, жирами тощо.

Крім того, запропоновано декілька математичних моделей, що прогнозують імовірність виникнення РМЗ, – BRCAPRO, статистичну модель Клауса, модель Гейла, Тапліна, Рознера [90, 102, 139, 180]. Необхідно відзначити, що всі ці моделі мають високе прогностичне значення у разі проведення популяційних, досліджень. Для оцінювання індивідуального ризику вони менш інформативні, оскільки не беруть до уваги вік, менопаузи, приймання комбінованих оральних контрацептивів, вживання алкоголю, одnobічне або двобічне пухлинне ураження у близьких родичів, вплив зовнішнього середовища, стресу, радіації (Чорнобиль), причетність до тієї чи іншої популяції тощо [4, 22, 28, 47, 90].

На цей час існує інформація про декілька тисяч поліморфізмів, що впливають на різні біохімічні процеси в організмі людини. Серед багатьох генетичних маркерів хвороб молочної залози – однонуклеотидний поліморфізм PvuII гена EsR $\alpha$  [32, 74, 112, 115].

**Резюме.** Таким чином, аналіз даних літератури свідчить, що серед передпухлинних хвороб молочної залози існує значна молекулярна неоднорідність як в організмі загалом, так і в осередку безпосередніх трансформацій. Сучасні погляди на стадійність РМЗ привертають увагу науковців до морфологічної структури доброякісних новоутворів. Однак стадійність проліферативних процесів у молочній залозі далеко не завжди дозволяє визначитися зі схильністю метаплазованих тканин до злоякісного

переродження і, відповідно, до потреби активної тактики. Разом з тим залишаються поза увагою клініцистів питання профілактики РМЗ на підставі одержаних морфологічних даних. Отже, широкий спектр структурних змін ускладнює як діагностику, так і лікування осіб на дисгормональні гіперплазії. З огляду на перелічене, розроблення методів діагностики ДДМЗ насамперед повинне враховувати не лише морфологічні особливості тканини, а й наявність рецепторів естрогену.

Сучасна тактика лікування хворих на дисгормональні гіперплазії передусім повинна враховувати не лише гістологічні особливості ДДМЗ, а й аналізувати стадії проліферації та перспективи малігнізації з урахуванням експресії EsR $\alpha$ .

Разом з тим інформація про функціональний вплив окремих поліморфізмів залишається обмеженою й існує значна ймовірність, що універсальне застосування цих досліджень для прогнозування естрогенчутливих захворювань на цей час обмежене. Потенційна роль поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  паралельно з визначенням гормонального статусу тканини молочної залози у забезпеченні клініцистів прогностичною інформацією щодо сприйнятливості при естрогенчутливих захворюваннях зростає. Поряд із клінічними характеристиками перебігу хвороби визначення стану експресії EsR – важлива характеристика, що може допомогти створити схему індивідуального комплексного лікування та обґрунтувати доцільність гормонотерапії.

Розуміння генетичних основ патологічного процесу забезпечить можливість визначення генетичних особливостей захворювання окремі пацієнтки (генодіагностика), на підставі чого можна буде визначати рекомендації щодо проведення повноцінного комплексу профілактичних заходів. Безсумнівно, впровадження у медицину такого підходу розширить арсенал методів терапії, а можливо, й генотерапії. Іншими словами, з'являється науково обґрунтований метод, завдяки якому з певною ймовірністю можна визначити ризик розвитку РМЗ у будь-якої жінки, а за



виконання окремих спеціально розроблених профілактичних заходів ліквідувати ризики й попередити подальшу метаплазію тканин молочної залози шляхом гормонотерапії чи обґрунтованим застосуванням хірургічного втручання.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Інформаційне обґрунтування дослідження

Ураховуючи недостатнє висвітлення низки питань, що стосуються проблеми діагностики передпухлинних хвороб молочної залози, ми вважали за доцільне уточнити фактори ризику проліферативної дисплазії, а також виявити особливості проліферативних змін ДДМЗ.

Установлення діагнозу та обстеження пацієнтів, які взяли участь у дослідженні, проводили згідно із чинними наказами МОЗ України № 624 від 03.11.2008 р. та № 645 від 30.07.2010 р., із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи виконання наукових медичних досліджень за участі людини і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Усі пацієнти письмово надали інформовану згоду на участь у дослідженні та проведенні генетичного аналізу.

Були сформовані бази даних пацієнтів та морфологічних препаратів за такою схемою:

- паспортна частина (прізвище, номер зразка, вік, стать, національність, освіта, місце проживання);
- скарги (біль, ущільнення, сецернації, мастодинія, тривалість захворювання);
- генотип за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$  (C/C, C/T, T/T);
- антропометричні показники (вага, зріст, колір очей, розмір ступні);
- анамнестичні дані (обтяжений сімейний анамнез щодо хвороб молочної залози, травма молочної залози, попередні хірургічні втручання, приймання гормонів, аборти, тривалість менструального циклу, пологи та лактація, вік та початок менархе);
- стресові фактори та шкідливі звички;

- лабораторні показники;
- супутні захворювання;
- характеристики новоутворень (локалізація, кількість пухлин, розмір ураженої ділянки, цитоморфологічні характеристики, гістоморфологічні характеристики, імуногістохімічні дослідження з визначенням експресії рецептора естрогену, категорія BIRADS для УЗД та мамографії, товщина залозистого компонента та фіброгландулярного прошарку молочної залози під час УЗД).

Хворих обстежували амбулаторно у рамках роботи кабінету лікаря-хірурга, який працює відповідно до ліцензійних умов (ліцензія АГ № 600519), оперували на клінічних базах кафедри хірургії з курсом дитячої хірургії та урології, зокрема в Сумському обласному онкологічному диспансері; морфологічний матеріал вивчений у центрі патоморфологічних досліджень кафедри патологічної анатомії (керівник центру – д-р мед. наук, професор А. М. Романюк); молекулярно-генетичні дослідження проведені у науковій лабораторії молекулярно-генетичних досліджень Сумського державного університету (керівник лабораторії – д-р мед. наук, професор О. В. Атаман).

Грунтовно вивчені особливості анамнезу, етапи діагностики, клінічна картина проліферативної дисплазії молочної залози, наслідки хірургічного лікування, морфогенез новоутворень та генетичні особливості пацієнтів. Відповідно до поставлених мети та завдань на першому етапі проведений аналіз соматичного та репродуктивного здоров'я жінок, які брали участь у дослідженні, ретельно вивчений сімейний анамнез щодо хвороб репродуктивної системи та молочної залози зокрема.

Усі хворі проліковані хірургічно. Критеріями відбору пацієнтів у дослідження були ознаки, які більшість авторів [8, 39] вважають показанням до генетичного дослідження на РМЗ, а саме: множинні первинні пухлини в одному органі; множинні первинні пухлини у різних органах; білатеральні первинні пухлини у парних органах; мультифокальність усередині одного

органа; поява пухлини у ранньому віці (до 21 року); один і більше близьких родичів із тим самим типом пухлин; два родичі й більше з тим самим типом пухлини; два родичі й більше з пухлинами однієї локалізації; два родичі й більше з пухлинами, що належать до сімейного раку; два родичі і більше з рідкісною формою раку; три родичі і більше у двох поколіннях із пухлинами однієї локалізації.

Критеріями винятку були: непроліферативні зміни в молочній залозі; відсутність ознак генетичної схильності до хвороб молочної залози; відмова пацієнта брати участь у дослідженні.

Оперативне лікування проводили способом стандартної секторальної резекції молочної залози, а також за авторськими методиками:

- спосіб профілактики лактаційної дисфункції під час хірургічного лікування доброякісних новоутворень молочних залоз (патент України № 84896);

- спосіб оперативного лікування доброякісних захворювань протокової системи молочної залози (патент України № 83922);

- спосіб підшкірної мастектомії з одномоментним субмускулярним ендопротезуванням молочних залоз силіконовими імплантатами (патент України № 83954).

Для фіксації та утримання доброякісного новоутворення молочної залози використовували спеціально розроблений хірургічний інструмент (патент України № 83923 «Хірургічний інструмент для фіксації і утримання тканини молочної залози»).

Досліджували: тканину молочної залози та кров. Для гістологічного дослідження матеріал брали під час операції і розміщували в тару з формаліном. Кров із периферичної вени забирали до або після хірургічного втручання за стандартною методикою і зберігали за температури -20 °С.

## 2.2. Матеріали клінічної бази даних та загальноклінічні методи дослідження

У роботі були задіяні сучасні високоінформативні методи дослідження з використанням реактивів та апаратури провідних фірм-виробників лабораторного, діагностичного обладнання.

Основними принципами під час проведення досліджень були такі:

- ретельне вивчення ретроспективних даних;
- зіставлення клінічного перебігу передпухлинних хвороб молочної залози, результатів лабораторних, інструментальних досліджень з морфологічними та ІГХ-особливостями тканини проліферативної форми ДДМЗ, а також результатами молекулярно-генетичних досліджень;
- максимально зближені терміни біохімічних, гомеостазіологічних та гістологічних досліджень, використання для визначення стану грудей інструментальних (УЗД, мамографія), та інвазійних (зокрема біопсії) методів.

Крім скарг та анамнезу, передбачали загальний огляд пацієнтів, за якого оцінювали стан серцево-судинної, дихальної, нервової, травної та сечовивідної систем.

Під час зовнішнього обстеження молочної залози визначали розмір, симетрію, стан сосково-ареолярного комплексу та регіонарних лімфатичних вузлів, характер виділень із залози за їх наявності. Всім пацієнткам проводили стандартне обстеження: визначення клінічних та біохімічних показників крові, гемостазіограму. Обов'язково проводився аналіз крові на кількість естрадіолу. За наявності виділень із соска проводили їх цитологічне дослідження.

Наявність естрадіолу вивчали шляхом аналізу комбінації конкурентної імуноферментної реакції і флуорисцентного визначення продуктів реакції. Аналізували плазму крові. Результат автоматично розраховували й зберігали в пам'яті. Одиниця виміру: пг/мл.

Спостереженням було охоплено 66 (78,6 %) осіб м. Сум та 18 (78,6 %) – Сумської області. Середній вік обстежених становив  $(32,3 \pm 1,1)$  роки і був у

межах 16 – 62 років, поміж них – 83 (96,4 %) етнічні українки та 3 (3,6 %) росіянки. Обстеження та лікування проводили у 2012 – 2013 рр. Серед досліджених – 82 (97,6 %) жінки з ДДМЗ та 2 (2,4 %) чоловіки, які страждали на гінекомастію з вузлуотворенням. Обтяжений анамнез на РМЗ у близьких родичів мали 33 (39,3 %) особи.

Проведений аналіз свідчить, що переважали містяни. Вищу освіту мали 65,5 % пацієнтів. Більшою мірою (69 %) це були особи молодого віку, що значною мірою обумовлено критеріями відбору до дослідження. Прискіпливо вивчали сімейний анамнез загалом і репродуктивний та «онкологічний» зокрема.

Крім поглиблених даних щодо анамнезу, вивчали особливості клінічного перебігу та супутніх захворювань. Проводили інструментальні та лабораторні дослідження. Вивчалися морфологічні та ІГХ-особливості видалених тканин, а також генетичні відмінності пацієнтів. За віком досліджені були розділені на три групи: до першої групи (до 21 року) ввійшло 15 (17,8 %) осіб, до другої (22–39 років) – 43 (51,2 %), до третьої (старших за 40 років) – 26 (31,0 %) досліджених.

При аналізі антропометричних даних в обстежених відхилень від популяційних норм не виявлено: середня маса тіла становила ( $59,4 \pm 1,2$ ) кг, середній зріст ( $166,6 \pm 0,63$ ) см, а ІМТ ( $21,41 \pm 0,42$ ) кг/м<sup>2</sup>.

Брали до уваги шкідливі звички. Так, серед обстежених 36 (42,9 %) осіб палили і вживали алкоголь; 48 (57,1 %) досліджених не палили, а алкоголь вживали дуже рідко. У соматичному анамнезі пацієнток серед хвороб серцево-судинної системи переважали вегетативно-судинні порушення – 43 (51,2 %) особи, серед хвороб шлунково-кишкового тракту – хронічний гастрит – 6 (7,1 %), серед захворювань ендокринної системи – наявність зоба у 9 (10,7 %) пацієнток, епізодичне збільшення естрадіолу в крові виявлено у 10 (11,9 %) досліджених.

Тривалість основної хвороби (ДДМЗ) становила у середньому ( $2,65 \pm 0,20$ ) років. Середній розмір ураженої ділянки молочної залози дорівнював ( $22,5 \pm 1,23$ ) мм.

У 44 осіб (53,4 %) діагностовано одне новоутворення молочної залози у 34 (40,5 %) – два новоутворення, а у 6 (7,1 %) – по три ділянки ураження молочної залози. Новоутворення в усіх досліджених були видалені з подальшим гістологічним й імуногістохімічним дослідженням. Таким чином 74,6 % пацієнтів із проліферативною формою ДДМЗ оперовано з приводу мультифокального ураження молочної залози.

Аналіз анатомо-гістологічних даних не виявив уроджених дефектів чи аномалій розвитку молочної залози. Висота фіброгландулярної тканини за даними УЗД становила в середньому ( $18,82 \pm 0,64$ ) мм, а висота залозистого компонента – ( $13,46 \pm 0,47$ ) мм відповідно. У 30 (35,7 %) спостережених спостерігалось двобічне ураження, а у 54 (64,3 %) – однобічне.

З огляду на вплив гормонального фону, зокрема естрадіолу, на розвиток ДДМЗ особливу увагу приділяли аналізу акушерського та гінекологічного анамнезу. Так, у вивчених пацієток менархе наставало у середньому у ( $13,30 \pm 0,18$ ) років. Тривалість менструального циклу становила ( $27,81 \pm 0,35$ ) днів. Аборти в анамнезі відмічали 28 (33,3 %) жінок. Крім того, майже третина пацієток – 26 (31 %) – упродовж останніх п'яти років приймала гормональні препарати для контрацепції чи лікування гінекологічних захворювань. Інші 58 (69,0 %) пацієнтки заперечили вплив на свій організм екзогенних гормональних препаратів.

З анамнезу та результатів обстеження встановлено, що 43 (51,2 %) пацієнтки раніше не спостерігались і не лікувались з приводу будь-яких захворювань статевих органів, а 41 (48,8 %) досліджених мали хронічні захворювання матки та її додатків: аднексит, порушення менструального циклу, кісти яєчників.

Ніколи не народжували 42 (50,0 %) пацієнтки. Решта 42 (52,0 %) – мали пологи й лактацію в анамнезі. Лактація понад 6 місяців була двічі в

11 (13,1 %) пацієток, один раз – у 31 (36,9 %) відповідно до кількості пологів.

Травму молочної залози в анамнезі, зокрема й оперативні втручання, зафіксовано у 17 (20,2 %) досліджених. У процесі діагностування ДДМЗ явища сецернації спостерігали у 17 (20,2 %) пацієток.

### **2.3. Променеві методи дослідження під час встановлення доброякісної дисплазії молочної залози**

Ультразвукове дослідження проводили за допомогою ультразвукової діагностичної системи «Toshiba» Nemio XG SSA-580A, виробництво Японії (мультичастотний лінійний датчик із частотою 6–12 МГц).

Мамографію виконували у кабінеті мамографії Сумського обласного психоневрологічного диспансеру апаратом Hologic Lorad M-IV з дигітайзером Kodak Direct View Classic CR (США).

Оцінка характеристик УЗД та рентгенологічної картини визначалася за шкалою BIRADS американської колегії рентгенологів, що передбачає 5 категорій змін у молочній залозі:

- 0 категорія означає, що за даними променевого обстеження неможливо виключити або підтвердити патологічні зміни молочної залози. У таких випадках показане проведення додаткових методів дослідження.

- 1-ша категорія – варіант вікової норми, тип і структура відповідають віку, конституції та функціонального стану пацієтки;

- 2-га категорія – кісти й ліпоми. Пацієткам рекомендують проходити скринінгове обстеження відповідно до віку;

- 3-тя категорія – вперше виявлені типові фіброаденоми. Рентгенологічні зміни при ній характеризують вузлову форму мастопатії й за наявності кальцинатів хворим показаний контрольний огляд через 3 тижні після первинного виявлення змін. У подальшому за стабільних розмірів – 1 раз на 6 місяців. До цієї групи також відносять набрякову форму маститу, динамічний нагляд за яким проводять у процесі консервативного лікування. У разі



неефективності консервативного лікування виявлені зміни «переводять» до наступної категорії;

– 4-та категорія – зміни нагадують атипові кісти, внутрішньопротокові пухлини, ліпогрануломи, фіброаденоми з посиленням інтра- та перитуморальним кровотоком і фіброаденоми, що мають тенденцію до збільшення у процесі динамічного нагляду. Рентгенологічні зміни при 4-й категорії мають згруповані мікрокальцинати розмірами від 50 до 600 мкм. Описані зміни потребують морфологічного дослідження матеріалу, одержаного під час пункційної біопсії.

– 5-та категорія – явні ознаки РМЗ. Показане виконання біопсії для морфологічного підтвердження діагнозу з огляду на можливості проведення системної терапії та/або радикального хірургічного лікування; для визначення гістологічного типу пухлини, ступеня її злоякісності, проведення імуногістохімічного аналізу, визначення її рецепторного статусу.

Першочерговою та стандартною процедурою під час встановлення діагнозу ДДМЗ було проведення УЗД та мамографії. Ретроспективно аналіз даних УЗД та мамографії для кожного новоутворення проведений окремо. Розподіл об'єктів за класами BIRADS УЗД показав, що 66 (49,3 %) досліджень мали індекс BIRADS 3 і лише 18 (13,4 %) виявили чіткі прояви проліферативної активності, що обґрунтовувало показання до інвазивних методів діагностики (BIRADS 4). У решти 50 (37,3 %) новоутворень ознак активної проліферації під час УЗД не встановлено, їм надано індекс BIRADS 1 і 2.

Аналогічна ситуація спостерігалася при аналізі розподілу новоутворень за класами BIRADS під час мамографії. Проте з огляду на віковий ценз рентгенодіагностиці підлягала значно менша кількість пацієнтів. Аналіз даних мамографії проведений щодо 30 осіб: індекс BIRADS 1 у 5 осіб (16,7 %), BIRADS 2 у 13 (43,2 %), BIRADS 3 у 7 (23,3 %), BIRADS 4 у 5 (16,7 %).

## **2.4. Методи морфологічного дослідження та характеристика морфологічної бази даних**

У хворих на проліферативну форму мастопатії вивчали тканину молочної залози, одержану субопераційно на межі здорова тканина – уражена ділянка. Вивчено 134 фрагменти молочних залоз із проліферативними змінами, видалених у 84 пацієнтів. При цьому проводилися:

- макроскопічне інтраопераційне оцінювання ділянки резекції патологічного фрагмента;
- гістологічне дослідження тканини молочної залози (здорового й патологічного фрагментів) під час забарвлення парафінових зрізів гематоксилін-еозином та толуїдиновим синім і пікофурцином за Ван Гізоном.

Матеріал фіксували у 10 % нейтральному формаліні на фосфатному буфері, обробляли на апараті гістологічного проведення тканин фірми «Pool Scientific Instrumental» (Швейцарія) і заливали у парафін. Загальний час фіксації, проведення та заливання матеріалу не перевершував 48 годин. Готували серійні парафінові зрізи (не менше 22), товщиною до 8–10 мікронів. Зрізи фіксували на предметних скельцях, покритих адгезивом (полілізин, амінопропілтриетоксисілан (APES) та інкубували у термостаті при 37 °С упродовж 12 годин. Наступним кроком було їх депарафінування та зневоднення у батареї із трьох ксилолів, двох 95 % спиртів, 80 та 70 % спиртів та дистильованої води. Після цього зрізи забарвлювали.

Під час гістологічного дослідження проводили якісне порівняльне оцінювання типів проліферативних змін, їх локалізації та ступінь вираженості.

У процесі роботи вивчено 134 новоутворення молочної, одержаних від 84 оперованих пацієнтів. У 72 (53,7 %) випадках морфологічного дослідження підлягали зразки з одного органа, а у 62 (46,3 %) аналізовані новоутворення, видалені за двобічного ураження грудей. Середній час доклінічного спостереження за досліджуваними становив  $(2,78 \pm 0,161)$  роки.

При цьому, середній розмір патологічного новоутворення дорівнював (22,29 ± 1,02) мм.

Результати розподілу морфологічних зразків ДДМЗ за віком свідчать: більша частина операційних препаратів 94 (70,2 %), видалених з приводу ДДМЗ, належала пацієнткам молодого віку (до 40 років); 40 (29,8 %) морфологічних зразків належали пацієнткам віком понад 40 років. Значна кількість морфологічних зразків зумовлена множинним ураженням молочної залози.

Поміж вивчених морфологічних препаратів більшість зразків належала оперованим, що ніколи не зазнавали впливу комбінованих оральних контрацептивів (КОК) – 95 (70,9 %). Проте 39 (29,1 %) зразків морфологічних препаратів ДДМЗ належали жінкам, які одержували гормонотерапію для лікування чи контрацепції.

Майже порівну гістологічний матеріал був узятий у жінок, які не мали гінекологічних захворювань, – 71 (53,0 %) і у тих, які відмічали в анамнезі хвороби матки та її додатків – 63 (47,0 %).

Серед досліджених морфологічних препаратів ДДМЗ 69 (51,5 %) зразків одержані від жінок, які не народжували, і 65 (48,5 %) у пацієнток, які народжували та мали лактацію.

Кількість гістологічних зразків, одержаних у жінок, в анамнезі яких відмічались аборти, становила 44 (32,8 %), решта 90 (67,2 %) – у пацієнток, які не мали в анамнезі абортів.

Усі гістологічні зразки одержані з вогнищ ДДМЗ мали типову гістологічну структуру й відрізнялися за типом проліферативних змін. У більшості гістологічних зразків – 65 (48,5 %) – переважав фіброепітеліальний тип проліферації. Переважання міоепітеліального типу проліферації спостерігали у 15 (11,2 %). Епітеліальна дольова та епітеліальна протокова проліферації траплялись у 25 (18,7 %) та 29 (21,6 %) препаратах відповідно.

У дослідженні переважали зразки ДДМЗ із проліферативною активністю 3–4-го ступенів та метаплазією в окремих ділянках чи зразках з тенденцією до атипових змін у 86 (64,2 %) досліджених. Новоутворення з невираженою проліферативною активністю 1–2-го ступенів становили меншість – 48 (35,8 %) досліджень.

Результати цитологічного дослідження були поділені на категорії від С1 до С2 [144]:

- С1 – неадекватний зразок. Висновок С1 може бути одержаний з кількох причин. Іноді із новоутворень, навіть під час проведення біопсії досвідченим лікарем, не вдається одержати зразок, достатній для встановлення діагнозу. В такому разі може допомогти повторна тонкоголкова біопсія. Однак, наприклад, для фіброзних рубців характерна невелика кількість клітинного матеріалу;
- С2 – доброякісне новоутворення. Для встановлення кінцевого діагнозу доброякісного новоутворення в досліджуваному матеріалі має бути знайдено більше 5 нормальних груп клітин. Це впорядковані пласти на фоні більш дрібних розкиданих клітин, що розміщуються попарно;
- С3 – у патолога виникли сумніви з приводу типу пухлини. Домінуючий характер свідчить про доброякісний характер новоутворення, однак наявні й деякі елементи атипії. Рекомендована повторна біопсія;
- С4 – потенційно злоякісне новоутворення. До цієї категорії відносять зразки, в яких знайдено мало аномальних клітин для того, щоб установити діагноз;
- С5 – злоякісне новоутворення. Про типовий малюнок злокісного новоутворення говорять, якщо у зразку виявлено значну кількість великих клітин, розміщених у полі зору в хаотичному порядку. Розмір та форма клітин сильно відрізняються. Вони можуть знаходитися в оточенні змінених кров'яних або мертвих клітин.

Аналіз цитологічного дослідження пунктів із видалених новоутворень, виявив меншу чутливість. Так, у 21 (15,7 %) пункті

цитологічна експертиза засвідчувала активний проліферативний процес при ДДМЗ і в 113 (84,3 %) відзначала типову цитоморфологічну характеристику доброякісного новоутворення з ознаками невираженої проліферативної активності без атипових ознак.

Морфологічний поліморфізм змін тканини молочної залози за її доброякісної дисплазії спонукав нас до вивчення особливостей гормонального статусу тканини. З огляду на цитоморфологічні зразки новоутворень підлягали ІГХ аналізу з вивченням експресії EsR $\alpha$ .

## 2.5 Імуногістохімічні методи дослідження

Дослідження ІГХ виконувалися на тих самих фрагментах тканини молочної залози, одержаних після хірургічного втручання у 84 хворих. Реакції ІГХ проводилися на серійних парафінових зрізах завтовшки 5 мкм, що поміщалися на скельцях, покритих APES - шаром (Janice A., 1983).

Після депарафінування та зневоднення препарати проходили всі етапи стандартного імуногістохімічного дослідження. Демаскування антигену, яким виступали рецептори естрогену, проводилося на водяній бані БВ-4 за температури 97–98 °С упродовж 30 хвилин у цитратному буфері (рН 6,0). Пригнічення ендогенної пероксидази відбувалося за рахунок нейтралізації її протягом 10 хвилин 3 % розчином H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Після обробки перекисом водню препарати промивали у трис-буфері (рН 7,0–7,6). Як первинні антитіла використовували моноклональні антитіла до EsR $\alpha$  (Lab Vision, 1:100). Імуногістохімічна реакція проходила у 2 етапи: I – інкубування із первинними антитілами протягом 30 хвилин за 37 °С; II – інкубування із вторинними антитілами (UltraVision ONE HPR Polimer) – 30 хвилин (t – 37 °С). За хромоген слугував використаний діамінобензидин (37 °С – 10 хвилин). Унаслідок реакції утворювався нерозчинний в органічних розчинниках кінцевий продукт реакції, що візуалізувався у вигляді структур коричневого забарвлення. Після цього скельця змивали дистильованою

водою і дофарбовували непофарбовані ядра гематоксиліном Маєра. Опісля зрізи вкладали у синтетичне середовище, використовуючи покривне скельце.

Результати імуногістохімічних реакцій експресії EsR $\alpha$  оцінювали напівкількісним способом за 8-бальною шкалою з урахуванням частки забарвлення ядер та їх інтенсивності забарвлення (Allred D.C., et al., 1998). Негативною реакцією вважали суму балів 0–2, слабопозитивною – 3–4, позитивною – 5–6 і сильнопозитивною – 7–8 балів.

Аналіз результатів розподілу морфологічних зразків за ступенем експресії EsR $\alpha$  в молочній залозі за її доброякісної дисплазії виявив значну неоднорідність. Так, переважала слабопозитивна реакція (3–4 бали), що становило 78 (58,2 %) випадків. Найменше виявлено зразків із сильнопозитивною (7–8 балів) ІГХ реакцією до EsR $\alpha$  – 8 (6,0 %), зразки з помірно позитивною (5–6 балів) та негативною (0–2 бали) виявлені в 29 (21,6 %) та 19 (14,2 %) випадках відповідно. Середній рівень експресії EsR $\alpha$  становив  $(3,96 \pm 0,134)$  бали.

Морфологічні препарати було поділено на дві групи, а критерієм поділу послужив рівень експресії EsR $\alpha$ . Так, до першої групи було віднесено 74 (55,2 %) естрогенпозитивні зразки, до другої групи – 60 (44,8 %) зразків з естрогеннегативною ІГХ-реакцією. Позитивною вважали зразки з ІГХ-реакцією не менше ніж у 10 % клітин (більше 3 балів) досліджуваного фрагмента.

## **2.6. Молекулярно-генетичні методи дослідження та характеристика генетичної бази даних**

Венозну кров у досліджених хворих набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 мМ) – («Sarstedt», Німеччина), заморожували та зберігали за температури  $-20$  °С.

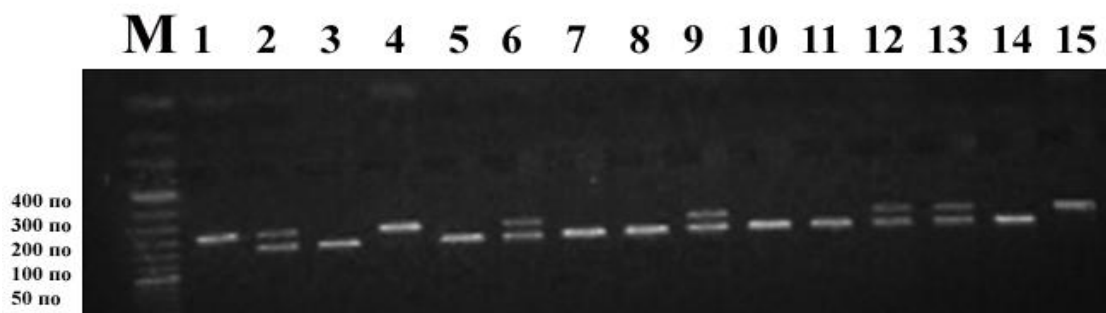
ДНК виділяли з нерозведеної крові з використанням наборів D1Atom DNA Prep 100 («Isogene», Росія). Метод базується на використанні

лізувального реагента із гуанідинізоціонатом, призначеним для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. За наявності лізувального реагента ДНК активно сорбується на *NucleoS<sup>TM</sup>*-сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагують із сорбента та переносять у стерильні, вільні від ДНК та РНК мікропробірки. Одержана ДНК може безпосередньо використовуватися для проведення полімеразної ланцюгової реакції. Набір дозволяє виділяти зі свіжого біологічного матеріалу високомолекулярну ДНК (40–50 тисяч пар нуклеотидів високої чистоти ( $OD_{260/280 \text{ nm}}$  1,6–2,0). Вихід чистої ДНК із 100 мкл незбираної крові становить 3–5 мкг. У процесі виділення ДНК ми дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції згідно з протоколом.

*PvuII* (міжнародна назва rs2234693) – поліморфізм 1-го інтрона, позиція на хромосомі 152.163.335, нуклеотидна заміна в положенні 1943 T > C, визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP).

Для цього ампліфікували ділянку зазначеного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5' CACACATCACCATTTCTCAGC 3' і зворотного (antisense) – 5' TCTAGACCACACTCAGGGTCTC 3'. Праймери були синтезовані фірмою «Metabion» (Німеччина). Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД *Taq*-полімерази («Ферментас», Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікація фрагмента 1-го інтрона складалася із трьох циклів: денатурації – 94 °С (50 с), гібридизації праймерів – 64,5 °С (45 с) та елонгації – 72 °С (1 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували за 37 °С упродовж 18 годин із 3 ОД-рестриктази *PvuII* («Thermo Scientific», США) у буфері G такого складу: 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ хлориду

магнію, 50 мМ NaCl і 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в С1943Т позиції гена ESR1 містилися тимін та ампліфікат, що складався із 392 пар основ, розщеплювався рестриктазою PvuII на два фрагменти – 342 і 50 пар основ. У разі заміни тиміну на цитозин сайт рестрикції для PvuII втрачався й утворювався один фрагмент розміром 392 пари основ (рис. 2.1). Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Горизонтальний електрофорез (0,13А; 200V) проводили впродовж 35 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).



**Рисунок 2.1 – Фрагмент візуалізації ДНК у транслюмінаторі після горизонтального електрофорезу в агарозному гелі**

На рис. 2.1 зображені результати рестрикційного аналізу PvuII (1943 T > C) - поліморфізму гена EsRα, де М – маркер молекулярної маси; ПО – пари нуклеїнових основ; доріжки 1, 4, 15 відповідають С/С-генотипу; доріжки 2, 6, 9, 12, 13 – С/Т-генотипу; 3, 5, 7, 8, 10, 11, 14 – Т/Т-генотипу.

Перед аналізом клінічні асоціації розподілу генотипів з вивченого поліморфізму PvuII були призведені до відповідності закону Харді – Вайнберга.

Уявлення про генетичну рівновагу в популяціях уперше знайшло відображення у законі Харді – Вайнберга і становить основу сучасної концепції про взаємодію популяційно-генетичних процесів. Закон Харді–Вайнберга (закон генетичної рівноваги) – закон популяційної генетики, що



встановлює співвідношення між частотами генів і генотипів у популяції з вільним схрещуванням.

Умови закону Харді:

- кількість популяції диплоїдних організмів настільки велика, що можна знехтувати випадковими флуктуаціями частот генів;
- у популяції не виникають нові мутації з вивченого гена;
- у популяції відсутня міграція особин;
- у популяції існує відбір за генотипами, що вивчаються;
- при двохалельному поліморфізмі частоти генотипів у популяції залишаються однаковими з покоління в покоління і задовольняють відношення Харді – Вайнберга

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1, \text{ де } p \text{ і } q - \text{ частоти відповідних алелів.}$$

За дотримання сформульованих вище умов співвідношення залишатиметься постійним із покоління в покоління незалежно від зміни кількості популяції та від величин  $p$  і  $q$ . Завдяки цьому закону можна істотно спростити опис популяційно-генетичних процесів, зменшивши число необхідних параметрів. Зіставлення фактичних частот генотипів, що спостерігаються, з теоретично очікуваним за законом Харді – Вайнберга дозволяє оцінити частоти алелів, оцінити фактори, що впливають на них, і одержати кількісні характеристики відбору, міграції, випадкових флуктуацій тощо.

Був проведений аналіз розподілу алелів та генотипу поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$ , розміщеного в 6-й хромосомі (6q25.1).

Усі вивчені генотипи в дослідженні підпорядковувалися відношенню Харді – Вайнберга.

Генетичний розподіл серед досліджених пацієнтів відображений у табл. 2.1

При аналізі розподілу варіантів генотипів за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  видалених новоутворень у пацієнтів досліджуваної групи одержані такі

результати: генотип Т/Т – 36 (26,9 %), генотип Т/С – 71 (53,0 %), генотип С/С – 27 (20,1 %).

Результати аналізу частот окремих генотипів за поліморфізмом PvuII залежно від рецепторного статусу новоутворень засвідчили, що у зразках EsR $\alpha$ - новоутворень співвідношення гомозигот за основним алелем (Т/Т), гетерозигот (Т/С) і гомозигот за мінорним алелем (С/С) становило 4 (5,4 %), 43 (58,1 %) і 27 (36,5 %) відповідно, у випадку EsR $\alpha$ + реакції – відповідні показники дорівнювали 32 (53,3 %), 28 (46,7 %) і 0 (0 %).

Таблиця 2.1

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII  
у пацієнтів з проліферативною формою ДДМЗ**

Генотип	Частота, n	Процент, %
Т/Т	23	27,4
Т/С	43	51,2
С/С	18	21,4
Разом	84	100,0

Примітка: n – кількість осіб

Урахувавши описову частину досліджуваного матеріалу, ми використали стратифікаційну рандомізацію, якій передуює стратифікація (розшарування) – виділення підгруп за ознакою, що, ймовірно, може впливати на результати дослідження. У кожній із цих підгруп рандомізація проходить незалежно. Стратифікаційну рандомізацію провели з огляду на підгрупи, які виділяли за однією чи двома ознаками, що попередньо можуть вплинути на результат.

## 2.7. Статистичні методи опрацювання даних

Усі одержані результати дослідження заносилися до спеціально розробленої тематичної таблиці.

Статистичне опрацювання одержаних результатів проводили на персональному комп'ютері за допомогою програмного пакета «SPSS Statistics 17.0 for Windows». Для вибору статистичних методів дослідження першочергово визначали, до якої статистичної шкали (номінальної, порядкової, інтервальної) належать змінні. Для змінних, що належать до інтервальної шкали (вік, маса тіла, результати імуногістохімічних досліджень), за допомогою побудови гістограм із розрахунком середнього значення і стандартного відхилення перевіряли, підпорядковуються чи ні значення нормальному розподілу. Перед перевіркою статистичних гіпотез відповідно до вимог ГОСТ 11.006-74 проведений аналіз нормальності розподілу величин у вибірках шляхом визначення коефіцієнтів асиметрії та ексцесу за допомогою критеріїв Уїлкі – Хана – Шапіро та Ліллієфорса за алгоритмами, що реалізовані у програмі SPSS-17, а також вільного у використанні продукту WINPEPI версії 10.7 [71]. Визначення достовірності відмінностей між двома вибірками проводили за допомогою критерію Стьюдента ( $t$ ). На основі величини  $t$  і кількості ступенів свободи ( $l = n_1 + n_2 - 2$ ) за таблицею розподілу Стьюдента знаходили достовірність відмінностей двох вибірок ( $P$ ). Відмінність вважали достовірною, якщо достовірність випадкової різниці не перевищувала 0,05 ( $p < 0,05$ ). Для перевірки розрахунків оцінки відмінностей у середніх тенденціях та незалежних вибірках використовували непараметричні критерії, а саме: критерій Вілконсона – Манна – Уїтні (критерій  $U$ ) та точний метод Фішера для чотирипільної таблиці [21, 67].

Для дослідження значущості відмінностей між середніми значеннями декількох груп даних (групи з різними генотипами) використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA – analysis of variance) із критерієм Фішера та Дункана [30].

Для визначення статистичної значущості різниць частот алелів і генотипів у групах хворих використовувався критерій  $\chi^2$  Пірсона.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### **3.1. Зв'язок клінічного перебігу доброякісної дисплазії молочної залози залежно від експресії EsR $\alpha$ і впливу поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$**

За допомогою статистичного аналізу ми вивчали зв'язок особливостей клінічного перебігу ДДМЗ з основними факторами ризику захворювання. Паралельно з цим вивчали вплив рівня експресії EsR $\alpha$  у тканині молочної залози та алельного розподілу поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$ .

З огляду на те, що антропометричні показники значною мірою корелюють із розвитком різних патологічних станів, у своєму дослідженні ми вивчали їх вплив на ДДМЗ.

Із табл. 3. 1 бачимо, що маса тіла у пацієнтів, хворих на проліферативні форми ДДМЗ достовірно відрізняється ( $F = 8,050$ ;  $P = 0,001$ ), що залежить від генотипу за RvuII-поліморфізмом гена EsR $\alpha$ . Так, у жінок із генотипом T/T маса тіла дорівнювала ( $66,40 \pm 2,97$ ) кг, із генотипом T/C – ( $55,94 \pm 1,06$ ) кг, із генотипом C/C – ( $58,89 \pm 2,42$ ) кг.

За критерієм Дункана також доведено, що у пацієнтів-гомозигот за основним алелем (T/T) маса тіла достовірно більша, ніж у гетерозиготних носіїв із генотипами T/C і у пацієнтів-носіїв мінорного алеля (C/C).

Аналогічний зв'язок спостерігали при аналізі ІМТ та розміру ступні пацієнтів. Із табл. 3.1 можна побачити, що у хворих на проліферативні форми ДДМЗ із різним генотипом за RvuII-поліморфізмом показники ІМТ та розміру ступні виявлена достовірна різниця ( $F = 5,020$ ;  $P = 0,009$  та  $F = 4,756$ ;  $P = 0,011$  відповідно).

Застосувавши для аналізу критерій Дункана, ми дослідили, що у носіїв-гомозигот за основним алелем (T/T) показники ІМТ та розміру ступні достовірно більші, ніж у пацієнтів-носіїв мінорного алеля (C/C) і гетерозиготних носіїв із генотипами T/C.

**Антропометричні показники у пацієнтів, хворих на ДДМЗ залежно від варіанта генотипу за RvuII-поліморфізмом гена EsR $\alpha$  (M  $\pm$  m)**

Показник	T/T	T/C	C/C	F	P
	(n = 23)	(n = 43)	(n = 18)		
Маса тіла, кг	66,40 $\pm$ 2,97	55,94 $\pm$ 1,06	58,89 $\pm$ 2,42	8,050	0,001
Зріст, см	168,35 $\pm$ 1,08	165,37 $\pm$ 0,81	167,28 $\pm$ 1,69	2,202	0,117
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	23,41 $\pm$ 1,01	20,45 $\pm$ 0,35	21,17 $\pm$ 1,06	5,020	0,009
Розмір ступні (eur)	38,26 $\pm$ 0,29	37,33 $\pm$ 0,151	37,50 $\pm$ 0,31	4,756	0,011
Висота залозистої складової залози (мм)	12,52 $\pm$ 0,65	13,98 $\pm$ 0,76	13,44 $\pm$ 0,70	0,849	0,431
Висота фіброгландулярної складової залози (мм)	19,31 $\pm$ 1,50	18,37 $\pm$ 0,82	19,28 $\pm$ 1,30	0,252	0,778

Примітка: n - кількість осіб

Крім масо-зростових показників, проаналізовані зв'язки генетичним розподілом за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  із кольором забарвлення райдужки ока та нікотиною залежністю. Різниці значень визначених показників і їх залежності від варіантів генетичного поліморфізму не знайдено ( $\chi^2 = 2,235$ ; P = 0,693 та  $\chi^2 = 0,365$ ; P = 0,833 відповідно).

З огляду на те, що віковий ценз – вагомий фактор ризику хвороб репродуктивної системи і молочної залози, зокрема на РМЗ, у нашому дослідженні встановлено, що вік обстежених хворих на ДДМЗ у середньому становив (32,3  $\pm$  1,1) роки. З табл. 3.2 та 3.3 бачимо, що всі пацієнтки були розподілені на три вікові групи.

До першої групи (до 21 року) ввійшло 15 (17,8 %) пацієнтів, до другої групи (22 – 39 років) – 43 (51,2 %), до третьої (старше 40 років) – 26 (31,0 %) відповідно. Статистичний аналіз та порівняння у кожній групі рецепторного

статусу за експресією EsR $\alpha$  у новоутвореннях ДДМЗ залежно від віку пацієнток показав, що EsR $\alpha$ -негативні трапляються у 43,5 % першої групи (до 21 року), у той час як EsR $\alpha$ -рецепторпозитивні – у 56,5 %. У другій групі рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$  спостерігались у 39,4 %, а рецепторпозитивні – у 60,6 %. У третій групі (старше 40 років) рецепторнегативні зразки за EsR $\alpha$  траплялись у 55,0 %, а рецепторпозитивні – у 45,0 %.

Таким чином, рецепторнегативні зразки у третій групі (старші 40 років) траплялися частіше, ніж у першій групі у 1,3 раза, і частіше, ніж у другій групі – у 1,4 раза. З іншого боку, рецепторнегативні зразки були менш частими у першій групі, ніж у другій, у 1,1 раза та частішими, ніж у третій групі, у 1,3 раза.

Під час дослідження поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  серед пацієнтів – гомозигот за основним алелем (Т/Т) зафіксовано у 20 %, гетерозигот (Т/С) – у 53,3 % агомозигот носіїв мінорного алеля (С/С) – 26, 7 % у (табл. 3.3). Отже, найчастіше траплявся варіант Т/С-гетерозигот, що було більше, ніж варіант гомозигот Т/Т у 2,7 раза, та варіант гомозигот С/С удвічі. У другій групі варіант гомозигот Т/Т зафіксовано у 23,3%, варіант гетерозигот Т/С – у 53,4 %, гомозигот С/С – у 23,3 %. Таким чином, варіант зигот С/С був частішим, ніж варіант Т/Т у 2,3 раза і варіант С/С – з такою самою частотою. У третій групі варіант гетерозигот Т/С спостерігався в 46,2 %, що було частіше, ніж варіант гомозигот Т/Т (38,5%), у 1,2 раза та частіше, ніж варіант гомозигот С/С, – у 3,0 раза.

Аналіз результатів доводить, що рецепторний статус новоутворень при ДДМЗ не залежав від віку пацієнтів ( $\chi^2 = 2,525$ ;  $P = 0,283$ ). Крім того, розподіл алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII статистично не відрізнявся в усіх вікових групах ( $\chi^2 = 2,620$ ;  $P = 0,623$ ). Можна стверджувати, що серед обстежених пацієнтів статистичного зв'язку між особливостями рецепторного статусу новоутворень та поліморфізмом RvuII залежно від віку не виявлено.

**Частота експресії EsR $\alpha$  у пацієнтів різних вікових груп при ДДМЗ**

Експресія EsR $\alpha$	Вік пацієнтів, n (%)		
	До 21 року	22–29 років	Старше 40 років
EsR $\alpha$ -	10 (43,5)	28 (39,4)	22 (55,0)
EsR $\alpha$ +	13 (56,5)	43 (60,6)	18 (45,0)
Разом	23 (100)	71 (100)	40 (100)
$\chi^2 = 2,525; P = 0,283$			

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$

Таблиця 3.3

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII у пацієнтів різних вікових груп при ДДМЗ**

Генотип	Вік пацієнтів, n (%)		
	До 21 року	22 – 39 років	Старше 40 років
T/T	3 (20,0)	10 (23,3)	10 (38,5)
T/C	8 (53,3)	23 (53,4)	12 (46,2)
C/C	4 (26,7)	10 (23,3)	4 (15,3)
Разом	15 (100)	43 (100)	26 (100)
$\chi^2 = 2,620; P = 0,623$			

Примітка: n – кількість осіб

Частота кількості видалених пухлин залежно від генотипу оперованих жінок наведена у табл. 3.4. Множинність новоутворень в органі – вагомий критерій можливої генетичної схильності до хвороб грудей. Ураження двох парних органів – додаткова причина аналізу генетичних особливостей кожного індивідуума. За порівняними показниками кількості видалених

новоутворень, залежно від генотипу за RvuII-поліморфізмом гена EsR $\alpha$  було з'ясовано, що вивчені показники не залежать від варіантів генетичного поліморфізму.

Так, обчислення даних за  $\chi^2$  - критерієм Пірсона показали, що різна кількість новоутворень не залежала від наявності вивченого поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  ( $\chi^2 = 1,512$ ; P = 0,824) (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII  
залежно від кількості видалених пухлин**

Генотип	Кількість видалених пухлин, n (%)		
	1	2	3
T/T	11 (25,0)	11 (32,4)	1 (16,7)
T/C	24 (54,5)	15 (44,1)	4 (66,6)
C/C	9 (20,5)	8 (23,5)	1 (16,7)
Разом	44 (100)	34 (100)	6 (100)
$\chi^2 = 1,512$ ; P = 0,824			

Примітка: n – кількість осіб

Залежно від локалізації новоутворень ДДМЗ пацієнти розділися на дві групи: оперовані особи з однобічним ураженням молочних залоз – 54 (64,29 %) та оперовані особи з двобічним ураженням – 30 (35,71 %) відповідно (табл. 3.5). Із таблиці бачимо, що у гомозигот C/C наявність вивченого поліморфізму RvuII статистично не відрізняється від розподілу серед пацієнтів - гомозигот за основним алелем (T/T) і не призводить до особливої локалізації вогнищ ДДМЗ. Установлено, що у вивченій групі пацієнтів статистичного зв'язку між хворими з однобічним або двобічним ураженням грудей та вивченим поліморфізмом не існує ( $\chi^2 = 1,281$ ; P = 0,527).



Таблиця 3.5

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII  
з однобічним та двобічним ураженнями**

Генотип	Однобічне ураження, n (%)	Двобічне ураження, n (%)
T/T	17 (31,5)	6 (20,0)
T/C	26 (48,1)	17 (56,7)
C/C	11 (20,4)	7 (23,3)
Разом	54 (100)	30 (100)
$\chi^2 = 1,281; P = 0,527$		

Примітка: n – кількість осіб

У зв'язку з тим, що в забезпеченні функціонування молочних залоз важливу роль відіграє рівень естрадіолу, всі оперовані були обстежені на рівень естрадіолу крові. Збільшення кількості останнього виявлено у 10 (11,9 %) хворих. Зв'язок різних алельних варіантів за поліморфізмом RvuII серед пацієнтів із фізіологічним та підвищеним рівнями естрадіолу крові показаний у табл. 3.6.

Розподіл алельних варіантів вивченого за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  статистично не відрізняється у пацієнтів із фізіологічним рівнем естрадіолу крові та в осіб із явищами гіперестрогенії ( $\chi^2 = 0,409; P = 0,815$ ). Таким чином, серед оперованих нами хворих наявність патологічного генотипу (C/C) поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  не призводить до явища гіперестрогенії.

За результатами, поданими у табл. 3.7, не виявлено зв'язку між тривалістю менструального циклу і початком менархе в оперованих з проліферативними формами ДДМЗ, залежно від варіанта генотипу за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$ . Однак було доведено, що у пацієток із

різним генотипом за дослідженим поліморфізмом показник тривалості menses різний ( $F = 3,017$ ;  $P = 0,055$ ).

Таблиця 3.6

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII у пацієнтів з нормальним та підвищеним рівнями естрадіолу крові**

Генотип	Фізіологічний рівень, n (%)	Підвищений рівень, n (%)
T/T	21 (28,4)	2 (20,0)
T/C	37 (50,0)	6 (60,0)
C/C	16 (21,6)	2 (20,0)
Разом	74 (100)	10 (100)
$\chi^2 = 0,409$ ; $P = 0,815$		

Примітка: n – кількість осіб

Таблиця 3.7

**Гінекологічний статус оперованих хворих на ДДМЗ залежно від варіанта генотипу за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$**

Показник	T/T	T/C	C/C	F	P
	(n = 23)	(n = 43)	(n = 18)		
Вік початку менархе, років	13,72 $\pm$ 0,39	13,17 $\pm$ 0,22	13,17 $\pm$ 0,41	0,392	0,398
Тривалість циклу, днів	27,79 $\pm$ 0,62	27,48 $\pm$ 0,54	28,61 $\pm$ 0,53	0,860	0,427
Тривалість menses, днів	5,47 $\pm$ 0,30	4,88 $\pm$ 0,19	5,67 $\pm$ 0,30	3,017	0,055

Примітка: n – кількість осіб

За критерієм Дункана ми дослідили, що жінки - гомозиготи за мінорним алелем (C/C) мали триваліший час menses, ніж гетерозиготи (T/C) та гомозиготи за основним алелем (T/T): (5,67  $\pm$  0,30) днів проти (5,47  $\pm$  0,30) та (4,88  $\pm$  0,19) днів відповідно. Це доводить, що наявність поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  хоч і не призводить до зміни рівня естрадіолу крові, але

впливає на метаболізм естрогену і, найімовірніше, через зміну якісних або кількісних характеристик EsR $\alpha$ . Клінічним відображенням цього явища може бути тривалість *mensis*.

У нашому дослідженні було вивчено асоціацію вузлового зоба як фактора розвитку ДДМЗ, із поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  (табл. 3.8) в оперованих пацієнтів.

У 9 (10,7 %) жінок виявлено вузловий зоб із періодичним порушенням обміну тиреоїдних гормонів. Однак розрахунок за критерієм Пірсона не виявив зв'язку між формуванням зоба та алельним поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$ . Різниця у розподілі осіб із різними алельними варіантами була недостовірною ( $\chi^2 = 0,669$ ; P = 0,716). Це свідчить, що серед обстежених пацієнтів розвиток вузлового зоба не залежав від наявності поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$ .

Таблиця 3.8

**Наявність зоба в оперованих залежно від частоти алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII**

Генотип	Наявний зоб, n (%)	Відсутній зоб, n (%)
T/T	3 (33,3)	20 (26,7)
T/C	5 (55,6)	38 (50,6)
C/C	1 (11,1)	17 (22,7)
Разом	9 (100)	75 (100)
$\chi^2 = 0,669$ ; P = 0,716		

Примітка: n – кількість осіб

Ми провели дослідження наявності чи відсутності зв'язку між гінекологічними захворюваннями серед оперованих хворих залежно від алельних варіантів поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  (табл. 3.9). Як бачимо, групи пацієнтів із наявною гінекологічною патологією та без неї майже однакові: 41 (48,8 %) та 43 (51,2 %). Ми порівняли кожену групу пацієнтів за

генотипами вивченого поліморфізму (табл. 3.9). Показник P, визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, дорівнював 0,306. Отже, генотип C/C за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$  не асоційований з існуванням гінекологічних захворювань.

Таблиця 3.9

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII залежно від супутніх гінекологічних захворювань**

Генотип	Наявна гінекологічна патологія, n (%)	Відсутня гінекологічна патологія, n (%)
T/T	13 (31,7)	10 (23,2)
T/C	22 (53,7)	21 (48,8)
C/C	6 (14,6)	12 (12,0)
Разом	41 (100)	43 (100)
$\chi^2 = 2,368; P = 0,306$		

Примітка: n – кількість осіб

Ми проаналізували розподіл оперованих із ДДМЗ залежно від рецепторного статусу новоутворень, видалених при хірургічному лікуванні досліджених (табл. 3.10).

При порівнянні морфологічних зразків у видалених препаратах за рецепторним статусом EsR $\alpha$  у хворих із наявними гінекологічними захворюваннями та без них статистичної різниці не встановлено – показник P, визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, дорівнював 0,783.

Отже, виконані статистичні обчислення свідчать про відсутність зв'язку між рецепторним статусом EsR $\alpha$  новоутворень молочної залози та гінекологічними захворюваннями.

Ми вивчили розподіл за алельними варіантами поліморфізму PvuII у групі оперованих жінок, які народжували й у яких відбулася лактація, та у групі оперованих, які не народжували (табл. 3.11).

Таблиця 3.10

**Частота експресії EsR $\alpha$  у пацієнтів із ДДМЗ  
залежно від наявності гінекологічних захворювань**

Експресія EsR $\alpha$	Наявна гінекологічна патологія, n (%)	Гінекологічної патології не виявлено, n (%)
EsR $\alpha$ -	29 (46,0)	31 (43,7)
EsR $\alpha$ +	34 (54,0)	40 (56,3)
Разом	63 (100)	71 (100)
$\chi^2 = 0,076; P = 0,783$		

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$ .

Таблиця 3.11

**Залежність частоти алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом  
RvuII від пологів та лактацій**

Генотип	Пологи та лактація, n (%)	
	Не було	Були
T/T	8 (19,0)	15 (35,7)
T/C	26 (62,0)	17 (40,5)
C/C	8 (19,0)	10 (23,8)
Разом	42 (100)	42 (100)
$\chi^2 = 4,236; P = 0,120$		

Примітка: n – кількість осіб

Розподіл генотипів за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  у групах порівняння не відрізняється ( $\chi^2 = 4,236; P = 0,120$ ).

Одним із клінічних проявів надлишкового впливу естрогенів може бути мастодинія, при якій у жінки в молочних залозах спостерігаються больові

відчуття різної інтенсивності та набряк грудей у передменструальний період. Неприємні відчуття у молочних залозах перед менструацією трапляються практично у всіх жінок, але інтенсивність болю незначна, і це не призводить до істотного дискомфорту. Патологічними визначають виражені больові відчуття, що тривають довго і знижують якість життя. Справжня мастодинія, як правило, білатеральна, найбільше виражена у місцях скупчення залозистої тканини, у верхньозовнішніх квадрантах та аксилярній ямці. Це одна з основних скарг пацієнок при ДДМЗ. Ми дослідили наявність мастодинії залежно від алельних варіантів поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

**Зв'язок алельного поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  із мастодинією у пацієнок з проліферативною формою ДДМЗ**

Генотип	Мастодинія відсутня, n (%)	Мастодинія наявна, n (%)
T/T	11 (42,3)	12 (20,7)
T/C	15 (57,7)	28 (48,3)
C/C	0 (0)	18 (31,0)
Разом	26 (100)	58 (100)
$\chi^2 = 11,444; P = 0,003$		

Примітка: n – кількість осіб

Із таблиці 3.12 видно зв'язок між поліморфізмом PvuII і мастодинією: генотип T/T встановлено у жінок, у яких не буває болю та набряку молочної залози, а генотип C/C пов'язаний з розвитком мастодинії.

Серед обстежених пацієнок зі скаргами на мастодинію співвідношення гомозигот за основним алелем (T/T), гетерозигот (T/C) і гомозигот за мінорним алелем (C/C) становило 20,7, 48,3 і 31,0 % відповідно. У пацієнок, які не відмічали мастодинії, розподіл був іншим: T/T – 42,3 %, T/C – 57,7 %, C/C – 0 %.

Показник P, визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, дорівнював 0,003, що свідчить про достовірну різницю у розподілі алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII у пацієток залежно від наявності мастодинії.

У проведеному дослідженні було вивчено розподіл алельного варіанта гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII у оперованих із явищами сецернації і без. Результати наведені у таблиці 3.13. Отже, зв'язку між сецернацією та вивченим поліморфізмом не існує ( $\chi^2 = 2,173$ ; P = 0,337).

Таблиця 3.13

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII у оперованих залежно від наявності сецернації**

Генотип	Відсутня сецернація, n (%)	Наявна сецернація, n (%)
T/T	17 (25,4)	6 (35,3)
T/C	37 (55,2)	6 (35,3)
C/C	13 (19,4)	5 (29,4)
Разом	67 (100)	17 (100)
$\chi^2 = 2,173$ ; P = 0,337		

Примітка: n – кількість осіб

З огляду на вплив генетичних особливостей індивідуума на розвиток різних захворювань важливим було вивчення сімейного анамнезу. Обстежені пацієтки розділені на дві групи відповідно до наявності РМЗ у близьких родичів. Так, до першої групи (не обтяжений сімейний анамнез) увійшла 51 (60,7 %) хвора. До другої групи (обтяжений сімейний анамнез) увійшли 33 (39,3 %) пацієтки. Одержані результати розподілу пацієток за генотипом досліджуваного поліморфізму залежно від сімейного анамнезу щодо РМЗ подано у таблиці 3.14.

Як свідчать дані таблиці 3.14, частота різних алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за PvuII-поліморфізмом у вивчених групах істотно не відрізняється. Різниця у розподілі осіб із різними алельними варіантами гена була

недостовірною ( $\chi^2 = 2,136$ ;  $P = 0,344$ ). Таким чином, наявність патологічного алеля (C/C) поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  у досліджуваних пацієнтів не асоційована з обтяженим сімейним анамнезом на РМЗ.

Таблиця 3.14

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII у оперованих залежно від сімейного анамнезу щодо РМЗ**

Генотип	Не обтяжений анамнез, n (%)	Обтяжений анамнез, n (%)
T/T	15 (29,4)	8 (24,2)
T/C	23 (45,1)	20 (60,6)
C/C	13 (25,5)	5 (15,2)
Разом	51 (100)	33 (100)
$\chi^2 = 2,136$ ; $P = 0,344$		

Примітка: n – кількість осіб

**Резюме.** Аналіз клінічних та анамнестичних показників не дає відповіді на запитання про причини та механізми проліферативних змін при ДДМЗ. Серед показників, асоційованих із патологічним алелем RvuII гена EsR $\alpha$ , неспецифічні показники (маса тіла та ІМТ). Серед специфічних симптомів, асоційованих із патологічним алелем RvuII гена EsR $\alpha$ , – тривалість menses та мастодинія. Можливо, це пов'язано із дефіцитом гестагенів і чутливістю рецепторів до естрадіолу. Результати розрахунків свідчать, що ДДМЗ починають формуватися на тлі збереженого менструального циклу та репродуктивної функції. Можна припустити, що вирішальну роль у розвитку осередків проліферації при ДДМЗ відіграє не рівень гормонів у плазмі, а стан локальних рецепторів естрадіолу в тканині молочної залози. Ймовірно, саме активність рецептора визначає розвиток патологічного процесу. Дисбаланс гормонів сприяє морфофункціональній перебудові. У одних жінок цей процес не виходить за рамки фізіологічної норми, в інших – в умовах активації рецепторного апарату молочної залози



формується патологічні стани. Першочерговим у розумінні причин та механізмів проліферації при ДДМЗ може бути визначення специфіки гістологічної будови тканини, особливостей рецепторного апарату клітини та генетичних предикторів.

### **3.2. Зв'язок морфології та рівня експресії EsR $\alpha$ залежно від генотипу за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$ при проліферативній доброякісній дисплазії молочної залози**

Ми ретроспективно проаналізували результати хірургічного лікування жінок із проліферативними формами ДДМЗ. Головним завданням було установити морфологічні та імуногістохімічні (експресія EsR $\alpha$ ) особливості різних типів проліферації в молочній залозі і порівняти ці показники з алейним розподілом одонуклеотидного поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$ .

У хворих на проліферативну форму мастопатії вивчали тканину молочної залози, одержану субопераційно на межі здорова тканина – уражена ділянка. Для оцінювання морфологічних змін новоутворень у оперованих пацієнтів із ДДМЗ після хірургічного втручання виконували гістологічне дослідження. Гістологічні препарати, залежно від переважаючого типу проліферації були представлені такими гістологічними варіантами:

- фіброепітеліальний (рис 3.1);
- міоепітеліальний (рис. 3.2);
- епітеліальний часточковий (рис. 3.3);
- епітеліальний протоковий (рис. 3.4).

З огляду на ступінь проліферативних змін усі патогістологічні препарати розділили на зразки із м'якою (1–2-га стадії) та вираженою (3–4-га стадії) проліферацією. У 65 (48,5 %) препаратах переважав фіброепітеліальний тип проліферації.

На рисунку 3.1 (А, В) зображені проліферувальні стромальні клітини, що стискають протоки з утворенням щілиноподібних структур.



Рисунок 3.1 – (А, В) Мікрофотографія фіброепітеліального типу проліферації ДДМЗ. Морфологічна структура змішаної фіброаденоми. Забарвлення гематоксиліном та еозином, зб.  $\times 100$

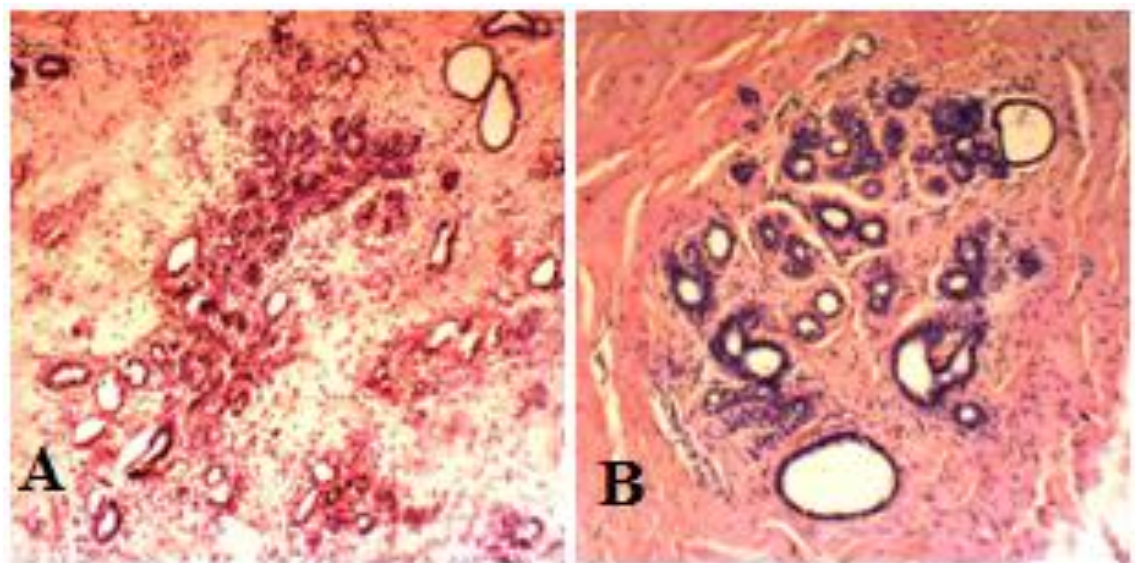


Рисунок 3.2 – (А, В) Мікрофотографії міоепітеліального типу проліферації. Морфологічна структура склерозувального аденозу. Забарвлення гематоксиліном та еозином, зб.  $\times 100$

Стромальний компонент особливо виражений у пухлинах молодих жінок, часто із значною проліферацією клітин сполучної тканини разом із міксоматозом, а також гіалінозом та кальцифікацією. Епітеліальний

компонент демонструє різний ступінь проліферації. Трапляються вогнища апокринової та плоскоклітинної метаплазії. У 15 (11,2 %) препаратах переважав міоепітеліальний тип проліферації.

На рисунку 3.2 (А, В) показані порушення епітеліального, міоепітеліального та стромального компонентів у термінальних протоково-часточкових структурах. У препараті звивисті, витягнуті або облітеровані залози та трубочки, обмежені міоепітеліальними клітинами у склерозованій стромі. Не виключена апокринова метаплазія епітелію («апокриновий аденоз»). При масованому ураженні формується так званий нодулярний або туморальний аденоз.

Епітеліальна часткова та епітеліальна протокова проліферація у дослідженні траплялася у 25 (18,7 %) та 29 (21,6 %) оперованих відповідно (рис. 3.3).

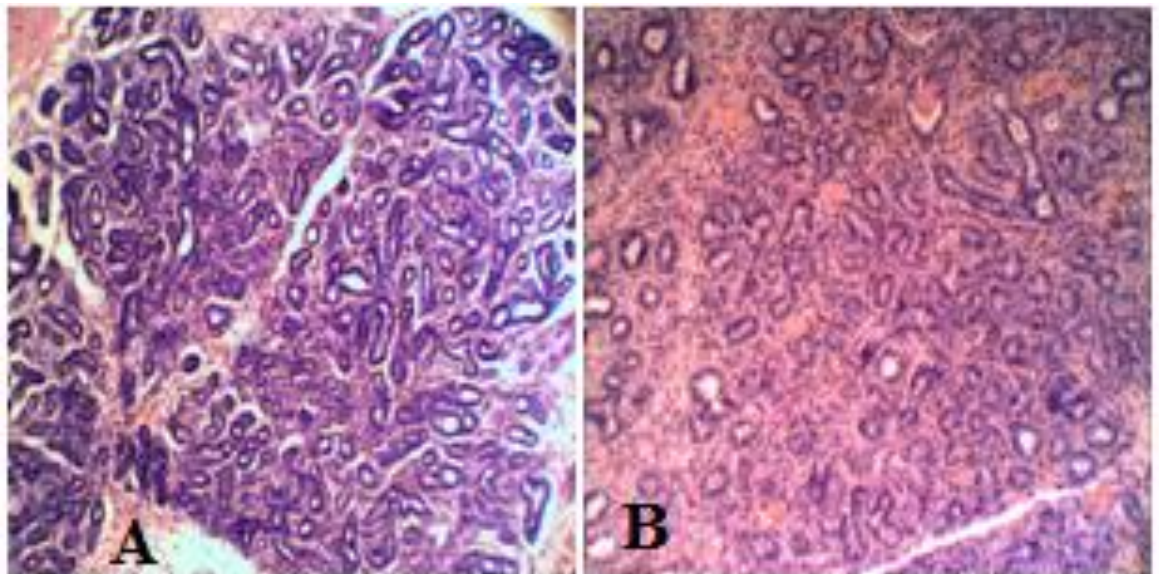


Рисунок 3.3 – (А, В) Мікрофотографія епітеліальної часточкової проліферації. Забарвлення гематоксиліном та еозином, зб.  $\times 100$

На рисунку 3.3 (А) показана атипова морфологічна структура часточкової гіперплазії молочної залози. Тяжка дисплазія належить до передракових станів і характеризується збільшенням часточок і практично повним заповненням просвіту ацинусів і кінцевих відділів проток

проліферуючими клітинами із збільшеними поліморфними ядрами. На рисунку 3.3 В наведена мікрофотографія епітеліальної часточкової проліферації (мазоплазія). Показано легку дисплазію – невелику проліферацію епітелію часточок та проток із двошаровим розподілом. Просвіти ацинусів при цьому збережені, немає глибоких структурних змін ядра та цитоплазми. Наявні осередки помірної дисплазії – збільшення розмірів ацинусів за рахунок проліферувальних клітин епітелію із заповненням просвіту, однак більша частина просвітів ацинусів збережена.

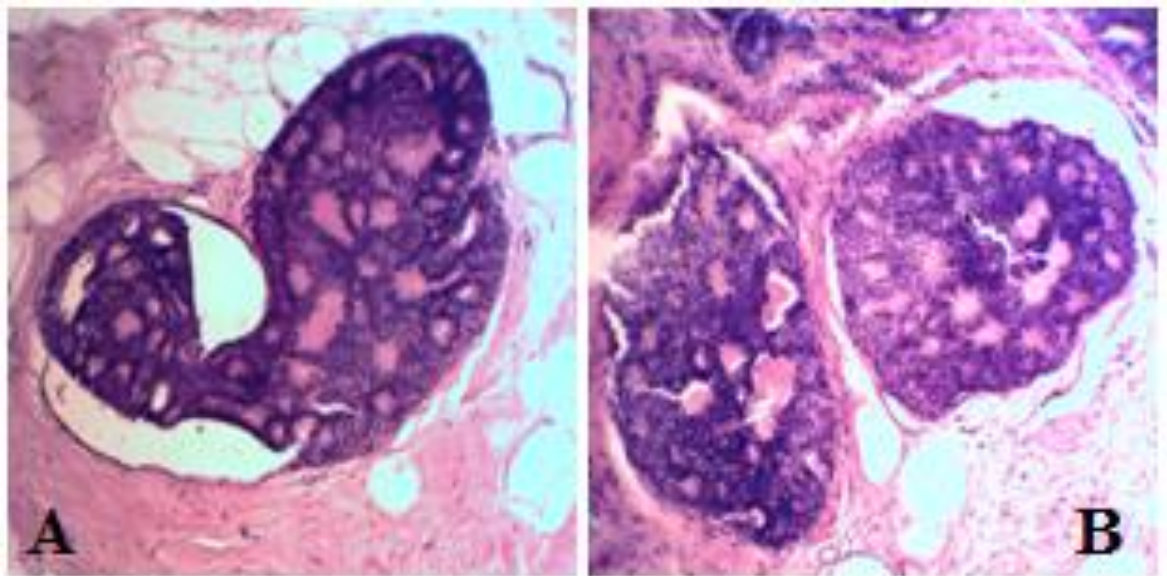


Рисунок. 3.4 – (А, В) Мікрофотографія епітеліальної протокової проліферації. Забарвлення гематоксиліном та еозином, зб.  $\times 100$

На рисунку 3.4 (А) зображена епітеліальна проліферація, що супроводжується утворенням сосочкових структур у просвіті протоки. Вони представлені епітеліальними та міоепітеліальними клітинами, що утворюють фіброваскулярну ніжку. Протокова папілярна проліферація поділяється на центральну з ураженням великих проток і периферійну, що виникає у протоково-часточковій одиниці. Можуть траплятися вогнища запалення, некрозу, апокринової, плоскоклітинної, жирової, муцинозної, кісткової, хрящової метаплазії.

На рисунку 3.4 (В) зображена епітеліальна атипова протокова проліферація, у основі якої лежить проліферація мономорфних атипових

клітин. Ризик прогресії цієї метаплазії в інвазійний рак значно збільшується порівняно з типовими формами. Відмічається розростання у просвітах проток мноморфних клітин з овальними чи круглими ядрами. Клітини можуть розростатися у вигляді мікропапілярних структур.

У вивчених препаратах переважали зразки ДДМЗ із значною проліферативною активністю (3–4-го ступенів), метаплазією в окремих ділянках та зразки із тенденцією до атипових змін – 86 (64,2 %). Менша кількість вивчених препаратів – 48 (35,8 %) – були представлені новоутвореннями із невираженою проліферативною активністю (1–2-го ступенів).

Оскільки існують думки щодо впливу тривалості проліферативних змін та їх кількості на розвиток РМЗ, у дослідженні ми їх врахували і проаналізували, порівнюючи із генетичним розподілом за поліморфізмом RvuII гена EsRα (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

**Розвиток ДДМЗ у часі та кількості осередків у пацієнтів залежно від варіанта генотипу за RvuII-поліморфізмом гена EsRα (M ± m)**

Показник	T/T	T/C	C/C	F	P
	(n = 23)	(n = 43)	(n = 18)		
Тривалість перебігу ДДМЗ, років	2,35 ± 0,33	2,65 ± 0,30	3,06 ± 0,42	0,765	0,469
Кількість видалених новоутворень	1,57 ± 0,12	1,53 ± 0,10	1,56 ± 0,15	0,019	0,981

Примітка: n – кількість осіб

За період спостереження досліджених із ДДМЗ було враховано час від встановлення діагнозу до моменту хірургічного втручання. Застосувавши однофакторний дисперсійний аналіз, ми дослідили, що період спостереження за пацієнтами із ДДМЗ та кількість осередків проліферативного процесу не мали достовірної різниці залежно від варіанта генотипу за поліморфізмом

RvuII ( $P = 0,469$ ,  $P = 0,981$  відповідно). Таким чином, наявність мінорного чи іншого алеля у групі досліджених хворих не мала впливу на тривалість розвитку та перебігу новоутворень та їх кількості.

Проведено аналіз тривалості розвитку кожного новоутворення від часу виявлення до відповідної стадії при хірургічному втручанні. За допомогою критерію Фішера проаналізовано зв'язок між розміром новоутворень та відповідним генотипом досліджуваних хворих (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

**Вплив варіантів генотипу за RvuII-поліморфізмом гена EsR $\alpha$  на тривалість перебігу ДДМЗ та розмір патологічних осередків ( $M \pm m$ )**

Показник	T/T	T/C	C/C	F	P
	(n = 36)	(n = 71)	(n = 27)		
Тривалість (роки) спостереження за новоутворенням	2,45 $\pm$ 0,28	2,76 $\pm$ 0,24	3,4 $\pm$ 0,34	1,642	0,198
Розмір утвору, мм	25,00 $\pm$ 2,24	21,1 $\pm$ 1,28	21,90 $\pm$ 2,31	1,341	0,265

Примітка: n – кількість досліджених морфологічних зразків

Із таблиці 3.16 можна побачити, що розмір новоутворень був дещо більшим при генотипі T/T, але не існує зв'язку між тривалістю спостереження за новоутвореннями та розподілом алельних варіантів за вивченим поліморфізмом ( $F = 1,1642$ ;  $P = 0,198$ ), а також між алельним розподілом за поліморфізмом RvuII залежно від розміру новоутворень ( $F = 1,1341$ ;  $P = 0,256$ ).

Оскільки залишається спірним питання щодо впливу експресії стероїдних рецепторів у період розвитку проліферативного осередку, було вивчено зв'язок між розміром і терміном перебігу осередку проліферації залежно від рецепторного статусу кожного новоутворення EsR $\alpha$  (табл. 3.17).

Застосувавши статистичний t-критерій Стьюдента щодо результатів, наведених у таблиці 3.17, ми отримали такі дані. Хворі на ДДМЗ із

позитивним рецепторним статусом видаленої тканини на етапі доопераційного нагляду і лікування перебували у середньому ( $3,08 \pm 0,22$ ) року. Це достовірно більше, ніж у хворих, оперованих з приводу рецепторнегативних новоутворень – у середньому через ( $2,40 \pm 0,23$ ) роки від встановленого діагнозу ( $t = 0,844$ ;  $P < 0,035$ ).

Таблиця 3.17

**Розвиток новоутворень у часі та їх кількість при ДДМЗ залежно від рецепторного статусу за експресією EsR $\alpha$**

Показник	EsR $\alpha$ -	EsR $\alpha$ +	t	P
	(n = 60)	(n = 74)		
Термін від діагностики до видалення новоутворення, років	$2,40 \pm 0,23$	$3,08 \pm 0,22$	0,844	0,035
Розмір ураженої ділянки, мм	$21,58 \pm 1,53$	$22,86 \pm 1,4$	0,006	0,535

Примітки: n – кількість досліджених морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$

На нашу думку, такий розподіл може бути зумовлений саме впливом експресії досліджуваного рецептора EsR $\alpha$  на темпи проліферації, що потребує подальших досліджень. На розмір видаленого осередку експресія дослідженого рецептора впливала недостовірно, хоча ділянки видаленого утвору за позитивною експресією EsR $\alpha$  були дещо більшими.

За результатами морфологічного дослідження було відібрано 134 зразки з метою проведення ІГХ-реакції і визначення експресії EsR $\alpha$ . Так, до першої групи віднесено 74 (55,2 %) естрогенпозитивних зразки, до другої – 60 (44,8 %) зразків з естрогеннегативною ІГХ реакцією.

Маркер визначався коричневим забарвленням ядер епітеліальних клітин (рис. 3.5 – 3.8).

Аналіз результатів розподілу морфологічних зразків за рівнем експресії EsR $\alpha$  при ДДМЗ виявив значну неоднорідність. Серед варіантів різного

ступеня експресії виділялися: А) негативна; В) слабкопозитивна; С) помірнопозитивна; D) сильнопозитивна.

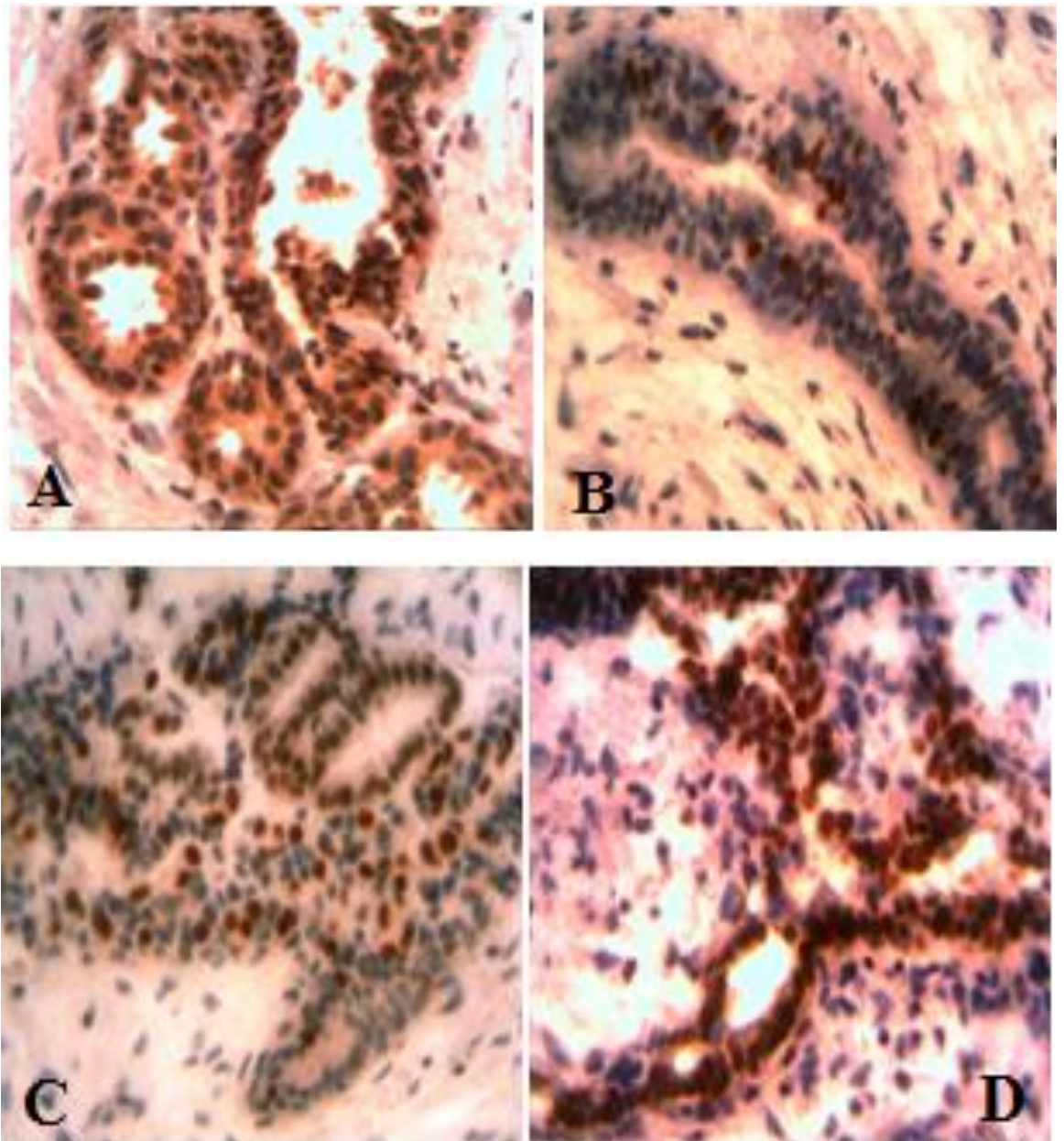


Рисунок 3.5 – (А, В, С, D) Мікрофотографія ІГХ-реакції експресії EsR $\alpha$  у препаратах фіброепітеліального типу проліферації (інтрапериканалікулярна фіброаденома), зб.  $\times$  400:

- А) негативна експресія EsR $\alpha$ ;
- В) слабкопозитивна експресія EsR $\alpha$ ;
- С) помірнопозитивна експресія EsR $\alpha$ ;
- Д) сильнопозитивна експресія EsR $\alpha$



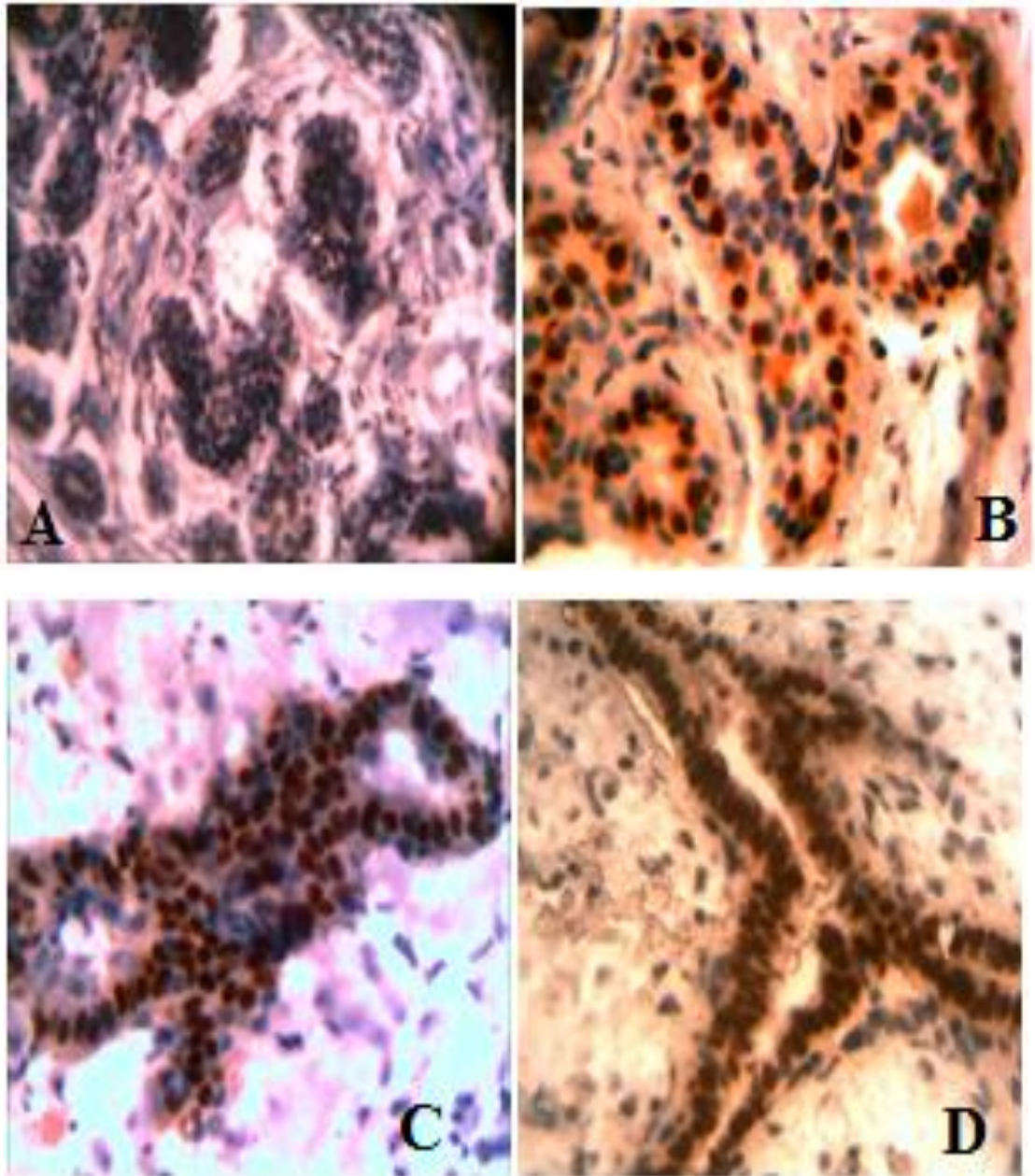


Рисунок 3.6 – (A, B, C, D) Мікрофотографія ІГХ-реакції експресії EsR $\alpha$  у препаратах міоепітеліальної проліферації (склерозивний аденоз), зб.  $\times$  400:

- A) негативна експресія EsR $\alpha$ ;
- B) слабкопозитивна експресія EsR $\alpha$ ;
- C) помірнопозитивна експресія EsR $\alpha$ ;
- D) сильнопозитивна експресія EsR $\alpha$

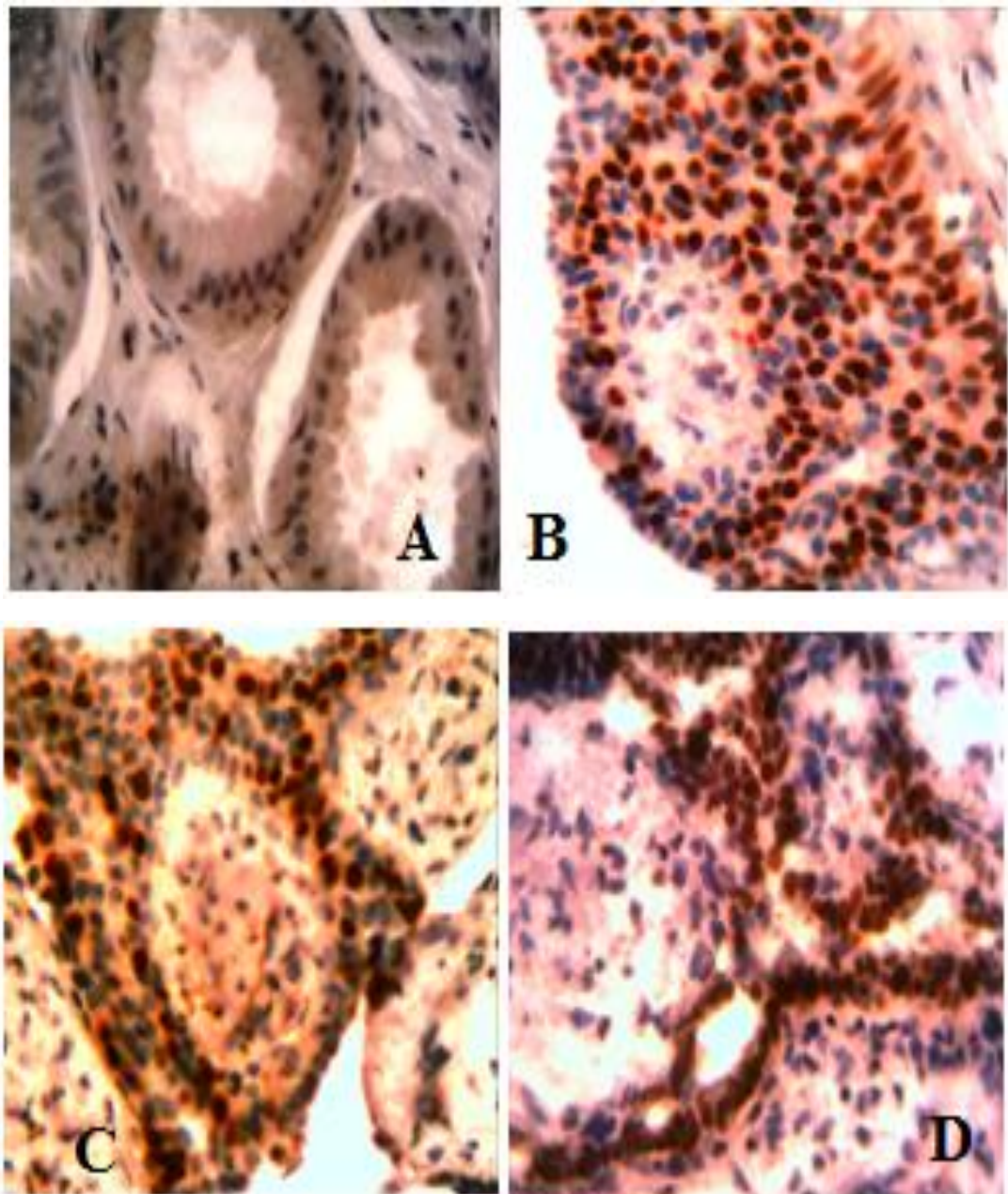


Рисунок 3.7 – (A, B, C, D) Мікрофотографія ІГХ-реакції експресії EsR $\alpha$  у препаратах епітеліальної часточкової проліферації (мазоплазія), зб.  $\times$  400:

- A) негативна експресія EsR $\alpha$ ;
- B) слабкопозитивна експресія EsR $\alpha$ ;
- C) помірнопозитивна експресія EsR $\alpha$ ;
- D) сильнопозитивна експресія EsR $\alpha$ .

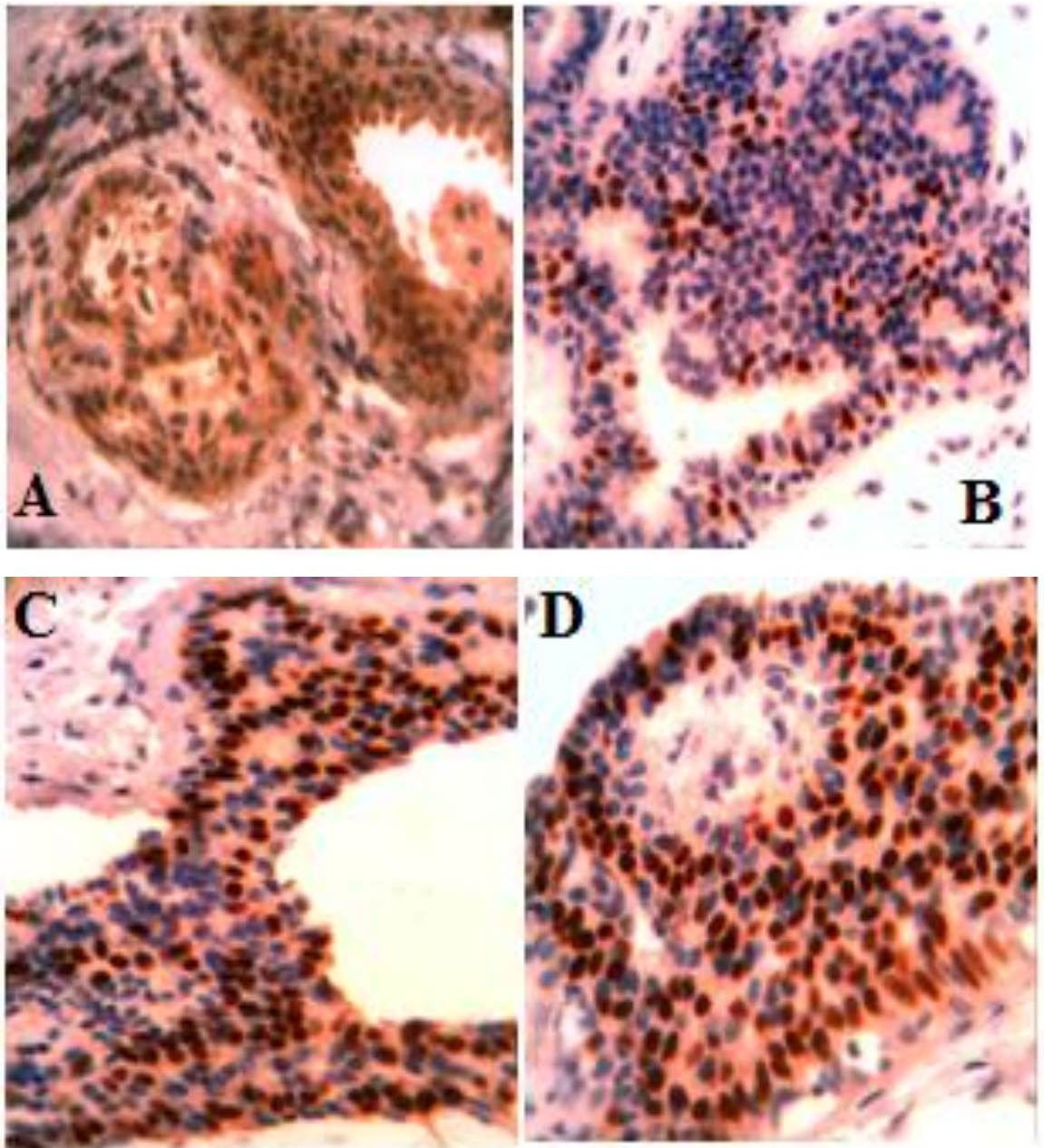


Рисунок 3.8 – (A, B, C, D) Мікрофотографія ІГХ-реакції експресії EsR $\alpha$  у препаратах епітеліальної протокової проліферації, зб.  $\times$  400:  
A) негативна експресія EsR $\alpha$ ;  
B) слабкопозитивна експресія EsR $\alpha$ ;  
C) помірнопозитивна експресія EsR $\alpha$ ;  
D) сильнопозитивна експресія EsR $\alpha$

Незважаючи на типову гістологічну структуру новоутворень різного типу проліферації при ДДМЗ, встановлено різний рівень експресії EsR $\alpha$  в усіх без винятку варіантах вивчених зразків (табл. 3.18).

Як бачимо, частота епітеліальної часточкової проліферації виявилася більшою за рецепторпозитивну EsR $\alpha$  експресію, ніж за рецептор негативну, у 1,5 раза; епітеліальна протокова проліферація – відповідно у 1,6 раза, фіброепітеліальна проліферація була частішою у 1,2 раза. Лише міоепітеліальна проліферація була частішою в оперованих із рецепторнегативною експресією у 1,5 раза. Разом із тим із наведених у таблиці 3.18 даних показник P за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона дорівнює 0,525, це свідчить, що розподіл пацієнтів із різним рецепторним статусом у новоутвореннях при різних типах проліферації достовірно не відрізняється при ДДМЗ. Отже, треба вважати, що серед вивчених зразків новоутворень ДДМЗ тип проліферації не залежав від рецепторного статусу за експресією EsR $\alpha$ .

Таблиця 3.18

**Частота експресії EsR $\alpha$  у оперованих із різним типом проліферативних змін при ДДМЗ**

Експресія EsR $\alpha$	Тип проліферативних змін, n (%)			
	Епітеліальна часточкова проліферація	Епітеліальна протокова проліферація	Міоепітеліальна проліферація	Фіброепітеліальна проліферація
EsR $\alpha$ -	10 (40,0)	11 (37,9)	9 (60,0)	30 (46,2)
EsR $\alpha$ +	15 (60,0)	18 (62,1)	6 (40,0)	35 (53,8)
Разом	25 (100)	29 (100)	15 (100)	65 (100)
$\chi^2 = 2,236; P = 0,525$				

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$ .

Аналогічний аналіз було проведено при порівнянні досліджуваних типів проліферації із різними генетичними варіантами поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  (табл. 3.19).

Із таблиці 3.19 можна побачити, що серед гомозигот за мінорним алелем (C/C) та гомозигот за основним алелем (T/T) поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  частота різних типів проліферації не мала статистичної відмінності ( $\chi^2 = 9,123$ ; P = 0,167). Отже, можна стверджувати, що серед вивчених новоутворень наявність поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  не зумовлювала типу проліферації при ДДМЗ.

Таблиця 3.19

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII у оперованих з різним типом проліферативних змін при ДДМЗ**

Генотип	Тип проліферативних змін, n (%)			
	Епітеліальна часточкова проліферація	Епітеліальна протокова проліферація	Міоепітеліальна проліферація	Фіброепітеліальна проліферація
T/T	7 (28,0)	10 (34,5)	2 (13,3)	17 (26,2)
T/C	10 (40,0)	12 (41,4)	12 (80,0)	37 (56,9)
C/C	8 (32,0)	7 (24,1)	1 (6,7)	11 (16,9)
Разом	25 (100)	29 (100)	15 (100)	65 (100)
$\chi^2 = 9,123$ ; P = 0,167				

Примітка: n – кількість морфологічних зразків

Оскільки основні шляхи онкогенезу модулюються через механізми проліферації та диференціювання тканин, різноманітність морфологічних структур, властивих ДДЗМ, залежить від ступеня проліферативних змін. Був вивчений і ступінь трансформації гістологічних структур у зоні ДДМЗ та проведено їх порівняння з рецепторним статусом тканини (табл. 3.20) та алельним розподілом поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  (табл. 3.21).

**Зв'язок експресії EsR $\alpha$  зі ступенем проліферативних змін при ДДМЗ**

Експресія EsR $\alpha$	Ступінь проліферації	
	Значна проліферативна активність із тенденцією до атипових змін (3–4-го ступенів), n (%)	Невиражена проліферація без атипії (1–2-го ступенів), n (%)
EsR $\alpha$ -	14 (29,2)	46 (53,5)
EsR $\alpha$ +	34 (70,8)	40 (46,5)
Разом	48 (100)	86 (100)
$\chi^2 = 7,370; P = 0,007$		

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$

Із таблиці 3.20 видно, що у оперованих осіб із EsR $\alpha$ - новоутвореннями переважали зразки із незначною проліферацією без атипії, що було частіше, ніж кількість зразків із значною проліферативною активністю, у 1,8 раза, а у оперованих із EsR $\alpha$ + новоутвореннями переважали зразки із значною проліферативною активністю і схильністю до атипових порівняно із кількістю зразків з невираженою проліферацією та без атипії у 1,5 раза. При порівнянні кількості зразків із значною проліферативною активністю та метаплазією в окремих ділянках із тенденцією до атипових змін у оперованих із EsR $\alpha$ - статусом і EsR $\alpha$ + встановлено переважання у групі останніх у 2,4 раза.

Обчислення за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона показало, що гістологічні препарати ДДМЗ із проліферацією 3 – 4-го ступенів траплялися достовірно частіше серед осіб із рецепторпозитивним статусом, ніж серед зразків із рецепторнегативним статусом – 14 (29,2 %) ( $\chi^2 = 7,370; P = 0,007$ ).

Таким чином, можна припустити, що проліферативна активність при ДДМЗ залежить від рівня експресії EsR $\alpha$  і зростає при її збільшенні у тканині молочної залози.

Оскільки статистичний зв'язок між ступенем проліферативних змін та рецепторним статусом визначений, то цікавим є визначення зв'язку між генотипами за поліморфізмом PvuII та ступенем проліферації (табл. 3.21).

Таблиця 3.21

**Зв'язок алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII зі ступенем проліферативних змін при ДДМЗ**

Генотип	Ступінь проліферації	
	Значна проліферативна активність із тенденцією до атипових змін (3–4-го ступенів), n (%)	Невиражена проліферація без атипії (1–2-го ступенів), n (%)
T/T	5 (10,4)	31 (36,0)
T/C	19 (39,6)	52 (60,5)
C/C	24 (50,0)	3 (3,5)
Разом	48 (100)	86 (100)
$\chi^2 = 43,142; P < 0,0001$		

Примітка: n – кількість морфологічних зразків

З таблиці 3.21 бачимо, що у гомозигот за основним алелем (T/T) невиражена проліферація без атипії переважала над значною проліферативною активністю у 3,5 раза, а серед гетерозигот (T/C) – у 1,5 раза. При цьому при генотипі C/C спостерігалось протилежне: значна проліферативна активність із тенденцією до проліферативних змін превалювала над кількістю зразків із невираженою проліферацією у 14,3 раза. Разом із тим у зразках 3 – 4-го ступенів проліферації співвідношення гомозигот за основним алелем (T/T – 10,4 %), гетерозигот (T/C – 39,6 %) і гомозигот за мінорним алелем (C/C – 50,0 %) було меншим на користь генотипу T/T у 4,8 раза. Показник P, визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, був меншим від 0,0001, що свідчить про достовірну різницю у розподілі алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII у оперованих із різним ступенем проліферації.

Таким чином, можемо стверджувати, що серед зразків видалених препаратів у осіб із ДДМЗ існує зв'язок між поліморфізмом PvuII гена EsRα і ступенем проліферативних змін новоутворення: при генотипі Т/Т у осередках ДДМЗ переважає проліферація 1 – 2 - го ступенів, а при генотипі С/С – проліферація із змінами 3 – 4- го ступенів.

З огляду на можливий вплив поліморфізму PvuII гена EsRα, а саме зміни якісного і/або кількісного рівня EsRα у клітині, логічно припустити, що різні алельні варіанти поліморфізму PvuII можуть впливати на рівень експресії EsRα в осередках проліферації при ДДМЗ. Результати статистичного аналізу, наведені в таблицях 3.22 – 3.24, підтверджують таку думку.

Таблиця 3.22

**Зв'язок алельних варіантів гена EsRα за поліморфізмом PvuII у оперованих із різним рівнем експресії EsRα**

Генотип	Експресія EsRα у балах, n (%)								
	0 балів	1 бал	2 бали	3 бали	4 бали	5 балів	6 балів	7 балів	8 балів
Т/Т	3 (100)	1 (100)	14 (100)	14 (37,8)	4 (9,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Т/С	0 (0)	0 (0)	0 (0)	23 (62,2)	38 (90,5)	9 (90,0)	1 (5,3)	0 (0)	0 (0)
С/С	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10,0)	18 (94,7)	6 (100)	2 (100)
Разом	3 (100)	1 (100)	14 (100)	37 (100)	42 (100)	10 (100)	19 (100)	6 (100)	2 (100)
$\chi^2 = 186,226; P < 0,0001$									

Примітка: n – кількість морфологічних зразків

Через те, що показник експресії EsRα є якісною одиницею і залежить від пропорційної оцінки забарвлення та інтенсивності, ми аналізували як фактичний розподіл за балами, так і клінічний розподіл позитивної і негативної реакцій.

Аналіз розподілу, наведений у табл. 3.22 та 3.23, доводить, що гомозиготний стан за мінорним алелем (С/С) за поліморфізмом PvuII гена



EsR $\alpha$  асоційований із більшою інтенсивністю та пропорційним розподілом EsR $\alpha$  у препаратах проліферативної форми ДДМЗ. Показник P, визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, був меншим від 0,0001, що свідчить про достовірну різницю вивчених показників.

Таблиця 3.23

**Зв'язок алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII залежно від рецепторного статусу при ДДМЗ**

Генотип	EsR $\alpha$ -, n (%)	EsR $\alpha$ +, n (%)
T/T	32 (53,3)	4 (5,4)
T/C	28 (46,7)	43 (58,1)
C/C	0 (0)	27 (36,5)
Разом	60 (100)	74 (100)
$\chi^2 = 51,041; P < 0,0001$		

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$

Такий зв'язок можна спостерігати під час аналізу розподілу генотипів алельного поліморфізму RvuII залежно від ступеня експресії EsR $\alpha$  в новоутвореннях при ДДМЗ (табл. 3.24).

У зразках із негативним рівнем експресії співвідношення гомозигот за основним алелем (T/T), гетерозигот (T/C) і гомозигот за мінорним алелем (C/C) становило 100, 0 і 0 %, зі слабкопозитивним відповідні показники дорівнювали 21,8, 78,2 і 0 %, з помірнопозитивним – 0, 34,5, 65,5 %, із сильнопозитивним – 0, 0, 100 %. Показник P, визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, був меншим від 0,0001, що свідчить про достовірну різницю у розподілі алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII у пацієнтів із різним рівнем експресії рецептора.

Таким чином, існує зв'язок між поліморфізмом RvuII і рівнем експресії EsR $\alpha$ : генотип T/T характеризується низьким рівнем експресії, а генотип C/C – високим.

**Зв'язок алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII у оперованих із різним ступенем експресії EsR $\alpha$  при ДДМЗ**

Генотип	Ступінь експресії EsR $\alpha$ , n (%)			
	негативний	слабко- позитивний	помірно- позитивний	сильно- позитивний
T/T	19 (100)	17 (21,8)	0 (0)	0 (0)
T/C	0 (0)	61 (78,2)	10 (34,5)	0 (0)
C/C	(0)	0 (0)	19 (65,5)	8 (100)
Разом	19 (100)	78 (100)	29 (100)	8 (100)
$\chi^2 = 148,541; P < 0,0001$				

Примітка: n – кількість морфологічних зразків

Застосувавши критерій Фішера, вдалося обчислити статистичний зв'язок середніх показників рівня експресії EsR $\alpha$  залежно від варіантів алельного поліморфізму PvuII (табл. 3.25).

Таблиця 3.25

**Характеристики новоутворень у хворих на ДДМЗ залежно від варіанта генотипу за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$**

Показник	T/T	T/C	C/C	F	P
	(n = 36)	(n = 71)	(n = 27)		
Експресія EsR $\alpha$ , балів	2,42 $\pm$ 0,17	2,83 $\pm$ 0,08	6,33 $\pm$ 0,13	189,250	< 0,001

Примітка: n – кількість досліджених морфологічних зразків

Серед гомозигот за основним алелем (T/T) середній рівень експресії становив (2,42  $\pm$  0,17) бала, у гетерозигот (T/C) – (2,83  $\pm$  0,08) бала і гомозигот за мінорним алелем (C/C) (6,33  $\pm$  0,13) бала. Однофакторний дисперсійний аналіз (показник P менший від 0,0001) свідчить про достовірну

різницю у розподілі алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII у пацієнтів із різним рівнем експресії EsR $\alpha$ .

Застосувавши критерій Дункана, підтверджено, що пацієнти-гомозиготи за основним алелем (T/T) мали новоутворення із меншим ступенем експресії EsR $\alpha$  ( $2,42 \pm 0,17$ ), ніж пацієнти-гетерозиготи (T/C –  $2,83 \pm 0,08$ ). У пацієнтів-гомозигот за мінорним алелем (C/C) рівень експресії EsR $\alpha$  у проліфератах при ДДМЗ був найбільшим ( $6,33 \pm 0,13$ ) і достовірно відрізнявся від носіїв генотипів T/T і T/C ( $P < 0,001$ ).

Оскільки мультифокальне ураження і/або виникнення пухлин у парних органах – це один із критеріїв генетичної схильності до захворювань у пацієнтів з однобічною та двобічною локалізаціями новоутворень молочної залози, ми провели статистичний аналіз на зв'язок показників експресії EsR $\alpha$  при проліферативній формі ДДМЗ та алельних варіантів поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  (табл. 3.26 та 3.27).

Таблиця 3.26

**Частота експресії EsR $\alpha$  у оперованих з однобічною та двобічною локалізаціями проліферативної форми ДДМЗ**

Експресія EsR $\alpha$	Однобічне ураження, n (%)	Двобічне ураження, n (%)
EsR $\alpha$ -	33 (45,8)	27 (43,5)
EsR $\alpha$ +	39 (54,2)	35 (56,5)
Разом	72 (100)	62 (100)
$\chi^2 = 0,070$ ; $P = 0,791$		
Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$ .		

Із таблиці 3.26 видно, що при EsR $\alpha$ - експресії, як і при EsR $\alpha$ +, частота двобічного ураження грудей не відрізняється від такої при однобічній локалізації ДДМЗ.

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII із  
однобічною та двобічною локалізаціями осередків ДДМЗ**

Генотип	Однобічне ураження, n (%)	Двобічне ураження, n (%)
T/T	25 (34,7)	11 (17,7)
T/C	34 (47,2)	37 (59,7)
C/C	13 (18,1)	14 (22,6)
Разом	72 (100)	62 (100)
$\chi^2 = 4,889; P = 0,087$		

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$

З таблиці 3,27 бачимо, що при генотипі T/T однобічне ураження молочних залоз було частішим від двобічного у 2 рази. При генотипі T/C двобічне ураження мало місце частіше, а саме у 1,3 рази. При генотипі C/C частота однобічних і двобічних уражень практично не відрізняється. Проте показник P визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, був більшим від 0,05 у розподілі алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII серед гістологічних зразків залежно від локалізації ураження. Це свідчить за відсутність достовірної різниці між наявністю вивченого поліморфізму та характером ураження молочної залози. Аналогічний розподіл ми отримали під час аналізу вивчених показників і рецепторного статусу новоутворень ДДМЗ (табл. 3.5).

Отже, множинність ураження та білатеральне виникнення новоутворень у парному органі не залежали від наявності патологічного алеля RvuII гена EsR $\alpha$  та не пов'язані з рівнем експресії EsR $\alpha$  в новоутвореннях серед оперованих хворих на ДДМЗ.

У клінічній практиці «золотим» стандартом діагностики пошуку ДДМЗ є цитологічне дослідження. Ми у своїй роботі застосували пункційну

та ексцизійну біопсію. Оскільки стратегія діагностики таких захворювань ґрунтується в основному на проведенні пункційної біопсії, було проведене порівняння цитоморфологічних показників у оперованих з різними генотипами.

У таблиці 3.28 наведено аналіз показників цитологічного дослідження пунктатів новоутворень у досліджених із проліферативною формою ДДМЗ, що мали різний генотип за поліморфізмом PvuII.

Таблиця 3.28

**Частота алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом PvuII  
у пацієнтів із різними характеристиками  
цитоморфологічного дослідження при ДДМЗ**

Генотип	Цитоморфологічна характеристика, n (%)			
	C1	C2	C3	C4
T/T	3 (25,0)	24 (23,8)	9 (47,4)	0 (0)
T/C	4 (33,3)	57 (56,4)	8 (42,1)	2 (100)
C/C	5 (41,7)	20 (19,8)	2 (10,5)	0 (0)
Разом	12 (100)	101 (100)	19 (100)	2 (100)
$\chi^2 = 10,228; P = 0,113$				

Примітка: n – кількість морфологічних зразків

При генотипі T/T частота категорій цитоморфологічного дослідження C3 була частішою у 1,9 раза від категорії C1 і у 2,0 раза – від категорії C2. При генотипі T/C превалювала частота цитоморфологічних досліджень категорії C2 над категорією C1 у 1,7 раза, а над категорією C3 – у 1,3 раза. При генотипі C/C спостерігалася численна перевага зразків категорії C1 над категоріями C2 і C3 у 2,1 і 4,0 раза відповідно. Але за показником P, визначеним за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона показники не відрізнялися у носіїв із різними варіантами генотипів ( $\chi^2 = 10,228; P = 0,113$ ).

Зв'язок цитоморфологічних характеристик за категоріями C (1, 2, 3, 4) видалених новоутворень із рівнем експресії EsR $\alpha$  наведено у табл. 3.29.

Із наведеного порівняння бачимо, що статистичної відмінності між наведеними чинниками не встановлено ( $\chi^2 = 2,228$ ;  $P = 0,515$ ).

При порівнянні цитоморфологічних змін у досліджених зразках ДДМЗ із експресією EsR достовірної залежності не встановлено (табл. 3.29).

Таблиця 3.29

### Залежність цитоморфологічних змін при ДДМЗ від експресії EsR $\alpha$

Експресія EsR $\alpha$	Цитоморфологічна характеристика, n (%)			
	C1	C2	C3	C4
EsR $\alpha$ -	6 (50,0)	44 (43,6)	10 (52,6)	0 (0)
EsR $\alpha$ +	6 (50,0)	57 (56,4)	9 (47,4)	2 (100)
Разом	12 (9,0)	101 (100)	19 (100)	2 (100)
$\chi^2 = 2,228$ ; $P = 0,515$				

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$ .

Сучасні діагностичні можливості УЗД не викликають сумнівів. З огляду на це ми провели порівняльний аналіз отриманих даних шляхом УЗД із різним рецепторним статусом новоутворень за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона (табл. 3.30). Статистичної різниці виявлено не було ( $\chi^2 = 0,856$ ;  $P = 0,836$ ).

Таблиця 3.30

### Частота експресії EsR $\alpha$ у пацієнтів із різними УЗД-характеристиками новоутворень при проліферативній формі ДДМЗ

Експресія EsR $\alpha$	Категорія УЗД BIRADS, n (%)			
	BIRADS 1	BIRADS 2	BIRADS 3	BIRADS 4
EsR $\alpha$ -	3 (42,9)	17 (39,5)	32 (48,5)	8 (44,4)
EsR $\alpha$ +	4 (57,1)	26 (60,5)	34 (51,5)	10 (55,6)
Разом	7 (100)	43 (100)	66 (100)	18 (100)
$\chi^2 = 0,856$ ; $P = 0,836$				

Примітка: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$ .

Таким чином, одержані ультразвукові характеристики при обстеженні хворих на ДДМЗ не відрізняються від оперованих із новоутвореннями із сильновираженою та слабовираженою експресією EsR $\alpha$ .

З огляду на вікові обмеження для мамографії остання була застосована у меншій кількості – у 30 пацієнтів. Під час статистичного аналізу одержаних даних та рецепторного статусу ми отримали аналогічний розподіл (табл. 3.31). Показник P, визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, був більшим за 0,05 ( $\chi^2 = 3,862$ ; P = 0,277), що свідчить про відсутність достовірної різниці у досліджуваних групах.

Таблиця 3.31

**Частота експресії EsR $\alpha$  у оперованих при різних характеристиках мамографії**

Експресія EsR $\alpha$	Категорія мамографії BIRADS, n (%)			
	BIRADS 1	BIRADS 2	BIRADS 3	BIRADS 4
EsR $\alpha$ -	1 (20,0)	8 (61,5)	2 (28,6)	3 (60,0)
EsR $\alpha$ +	4 (80,0)	5 (38,5)	5 (71,4)	2 (40,0)
Разом	5 (100)	13 (100)	7 (100)	5 (100)
$\chi^2 = 3,862$ ; P = 0,277				

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$ .

Під час вивчення УЗД-характеристик та результатів мамографії за BIRADS серед новоутворів із різним рецепторним статусом ми встановили, що поміж оперованих показник P дорівнював 0,577 та 0,606 відповідно, що свідчить про відсутність статистичного зв'язку цих показників з експресією EsR $\alpha$  (табл. 3.32). Отже, наведені інструментальні дослідження (УЗД та мамографія) не дозволяють визначити гормональні особливості новоутворення у молочній залозі.

**Порівняння показників УЗД та мамографії залежно від рецепторного статусу новоутворень за експресією EsR $\alpha$**

Показник за BIRADS	EsR $\alpha$ -	EsR $\alpha$ +	t	P
	(n = 60)	(n = 74)		
При УЗД	2,75 $\pm$ 0,10	2,68 $\pm$ 0,09	0,570	0,577
При мамографії	2,50 $\pm$ 0,25	2,31 $\pm$ 0,25	0,135	0,606

Примітки: n – кількість досліджених морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$

Що стосується порівняння між діагностичними класами УЗД і мамографії та алельним розподілом за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$  (табл. 3.33, 3.34), то обчислення за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона не виявило статистично достовірного зв'язку між гомозиготами за мінорним (C/C) та основним (T/T) алелями ( $\chi^2 = 1,672$ ; P = 0,947 та  $\chi^2 = 10,179$ ; P = 0,117 відповідно). З огляду на це можна стверджувати, що різні генотипи вивченого поліморфізму не зумовлювали різниці у висновках УЗД та мамографії.

Таблиця 3.33

**Частота генотипів у оперованих при різних УЗД-характеристиках**

Генотип	Категорія УЗД BIRADS, n (%)			
	BIRADS 1	BIRADS 2	BIRADS 3	BIRADS 4
T/T	1 (14,3)	12 (27,9)	17 (25,8)	6 (33,3)
T/C	5 (71,4)	22 (51,2)	36 (54,5)	8 (44,4)
C/C	1 (14,3)	9 (20,9)	13 (19,7)	4 (22,3)
Разом	7 (100)	43 (100)	66 (100)	18 (100)
$\chi^2 = 1,672$ ; P = 0,947				

Примітка: n – кількість морфологічних зразків



Таблиця 3.34

**Частота генотипів пацієнтів, оперованих при різних даних мамографії**

Генотип	Категорія мамографії BIRADS, n (%)			
	BIRADS 1	BIRADS 2	BIRADS 3	BIRADS 4
T/T	1 (20,0)	2 (15,4)	3 (42,8)	3 (60,0)
T/C	1 (20,0)	9 (69,2)	2 (28,6)	2 (40,0)
C/C	3 (60,0)	2 (15,4)	2 (28,6)	0 (0)
Разом	5 (100)	13 (100)	7 (100)	5 (100)
$\chi^2 = 10,179; P = 0,117$				

Примітка. n – кількість морфологічних зразків

Фенотипові зміни індивідуума прямо залежать від впливу факторів зовнішнього середовища. Серед основних факторів впливу на розвиток ДДМЗ ми дослідили зв'язки між їх рецепторним статусом і такими критеріями, як наявність пологів, абортів і/або гормонотерапія (табл. 3.35).

Таблиця 3.35

**Частота експресії EsR $\alpha$  у морфологічних препаратах залежно від пологів та лактації в анамнезі**

Експресія EsR $\alpha$	Наявні пологи та лактація, n (%)	Не народжували, n (%)
EsR $\alpha$ -	33 (50,8)	27 (39,1)
EsR $\alpha$ +	32 (49,2)	42 (60,9)
Разом	65 (100)	69 (100)
$\chi^2 = 1,834; P = 0,176$		

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$

З'ясувалося, що розподіл новоутворень на рецепторнегативні та рецепторпозитивні (за експресією EsR $\alpha$ ) зразки не залежав від наявності пологів та лактації у пацієток ( $\chi^2 = 1,834$ ; P = 0,176).

Із таблиці 3.36 можна побачити, що аналіз розподілу морфологічних зразків ДДМЗ за рецепторним статусом експресії EsR $\alpha$  серед пацієнтів, які одержували ЗГТ, та таких, де гормонотерапія не проводилася, не виявив статистично значущої достовірності (P = 0,346). На особливості рецепторного статусу ДДМЗ приймання КОК у минулому не впливало.

Таблиця 3.36

**Частота експресії EsR $\alpha$  у морфологічних препаратах  
залежно від гормонотерапії в анамнезі**

Експресія EsR $\alpha$	Наявна гормонотерапія, n (%)	Гормонотерапія не проводилася, n (%)
EsR $\alpha$ -	15 (38,5)	45 (47,4)
EsR $\alpha$ +	24 (61,5)	50 (52,6)
Разом	39 (100)	95 (100)
$\chi^2 = 0,887$ ; P = 0,346		

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$ .

Також між абортами та перериванням вагітності статистичної достовірності не виявлено залежно від рівня експресії EsR $\alpha$  при ДДМЗ (табл. 3.37) ( $\chi^2 = 2,529$ ; P = 0,112).

Таким чином, можна припустити, що наявність в анамнезі обстежених такого стресового фактора, як аборт чи переривання вагітності, не вплинуло на особливості експресії EsR $\alpha$  у морфологічних зразках проліферативної форми ДДМЗ.

**Частота експресії EsR $\alpha$  у морфологічних препаратах  
залежно від наявності абортів у анамнезі**

Експресія EsR $\alpha$	Аборти в анамнезі, n (%)	Абортів не було, n (%)
EsR $\alpha$ -	24 (54,5)	36 (40,0)
EsR $\alpha$ +	20 (45,5)	54 (60,0)
Разом	44 (100)	90 (100)
$\chi^2 = 2,529; P = 0,112$		

Примітки: n – кількість морфологічних зразків; EsR $\alpha$ - – рецепторнегативні зразки за експресією EsR $\alpha$ ; EsR $\alpha$ + – рецепторпозитивні зразки за експресією EsR $\alpha$

**Резюме.** Різні проліферативні варіанти ДДМЗ при практично однаковій гістологічній будові значно відрізняються за експресією EsR $\alpha$  та ступенем проліферації. Це може відображати особливості гормонального статусу, а також бути проявом пухлинних хвороб молочної залози та індикатором схильності до них. Інформація про існування ІГХ-особливостей різного ступеня проліферації у морфологічних зразках ДДМЗ у пацієнтів-носіїв поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  важлива щодо даних про зв'язок вивченого поліморфізму із РМЗ. Це наводить на думку про перспективність вивчення RvuII-поліморфізму у пацієнтів із передпухлинною патологією грудей. Таким чином, додаткові дослідження експресії EsR $\alpha$  та наявності патологічного С-алеля за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  можуть відігравати роль діагностичних критеріїв у виявленні пацієток із ризиками до раку, в той час як ДДМЗ – постійний об'єкт у спектрі операційного матеріалу багатьох патоморфологічних відділень, причому основну групу становлять жінки молодого та юного віку.

### **3.3. Алгоритм діагностики та лікування проліферативних форм дисплазії молочної залози з урахуванням генотипів за поліморфізмом RvuII гена EsRa**

Відомо, що діагностикою і лікуванням ДДМЗ займаються лікарі різних спеціальностей: хірурги, гінекологи, онкологи, ендокринологи тощо. З одного боку, це ускладнює вирішення багатьох організаційних питань, з іншого – показує, наскільки різноманітний вплив різних органів і систем на молочну залозу. Саме цей факт ми враховували під час розроблення системи обстеження, у якій з метою активної профілактики зроблено акцент на виявленні факторів ризику, пов'язаних з порушенням різних фізіологічних процесів, що впливають на розвиток проліферативної дисплазії. Наявність факторів ризику визначає подальшу програму профілактичних дій. Ми подали варіанти проходження діагностичного маршруту, який відрізняється у жінок різного віку, що зумовлено різними можливостями методів діагностики залежно від вікових структурних особливостей молочної залози, а також алгоритм обстеження жінок залежно від наявності факторів ризику, генетичних особливостей індивідууму та рецепторного стану тканини молочної залози.

На рисунку 3.9 зображено запропонований нами алгоритм обстеження пацієнтів із захворюваннями молочних залоз, що доповнює Накази МОЗ України № 624 від 03.11.2008 р. та № 645 від 30.07.2010 р. [43]. Жінки будь-якого віку повинні проходити самообстеження щомісяця і при змінах в молочній залозі звертатися до спеціаліста. Жінки віком 20–40 років 1 раз на рік повинні обстежуватися у спеціаліста мамолога, що передбачає огляд, пальпацію грудей та обов'язкове анкетування на предмет виявлення факторів ризику атипії молочної залози, а також інструментальні скринінгові методи дослідження (УЗД, мамографія). Жінкам будь-якого віку з виявленою хворобою молочної залози для проведення диференціальної діагностики показана мамографія з використанням ультразвукових, патоморфологічних

методик, зокрема інтервенційної радіології. Залежно від результатів проведеного обстеження формується подальший маршрут пацієнта.

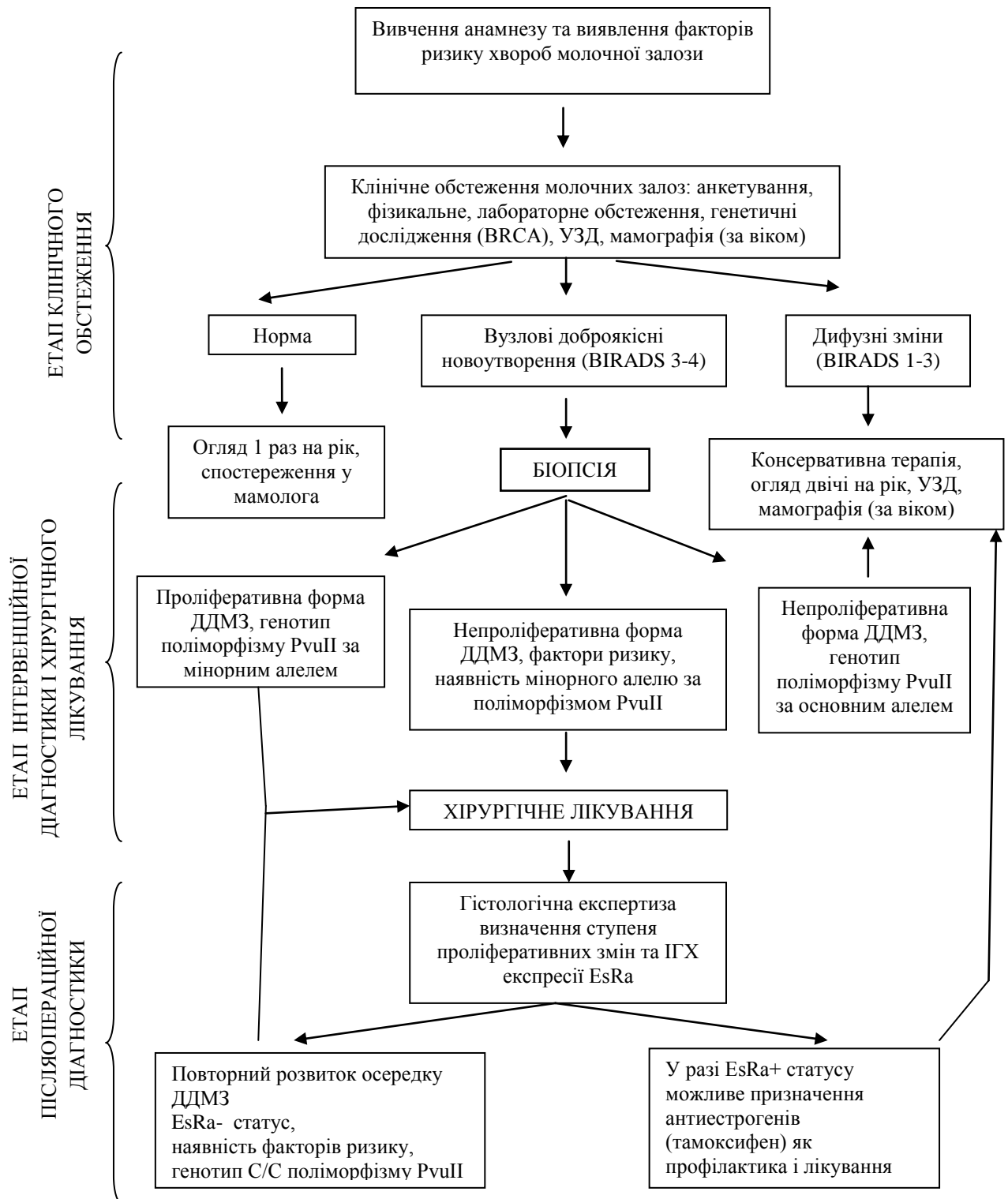


Рисунок 3.9 – Алгоритм діагностики проліферативних форм ДДМЗ з урахуванням генотипів за поліморфізмом RvuII та експресії EsRa

Ми вважаємо, що УЗД молочної залози доцільно проводити лікарю-мамологу, що володіє методикою сонографічної діагностики. Це забезпечить належну якість діагностики, скоротить час обстеження, виключить дублювання процедур і заощадить фінансові й кадрові ресурси.

На першому (клінічному) етапі діагностичного пошуку спеціаліст проводить комплекс обстеження: збирає анамнез з урахуванням факторів ризику, проводить огляд, пальпацію молочних залоз і регіональних зон лімфатичного відтоку, УЗД, призначає мамографію.

Залежно від результатів на тому чи іншому етапі дослідження використовують найбільш інформативну методику обстеження відповідно до наведеного алгоритму.

При синдромі вузлоутворення молочної залози проводять:

- клінічне обстеження (анамнез, огляд, пальпація);
- рентгенографію молочних залоз;
- ультразвукове дослідження;
- аспіраційну біопсію новоутворення, цитологічне, гістологічне, імуногістологічне дослідження, залежно від знахідки.

За наявності синдрому сецернації доцільно забирати субстрат із молочної залози на цитологічне дослідження. Також можливе проведення дуктографії.

Додатково пропонуємо визначати поліморфізм PvuII гена EsR $\alpha$  у пацієток з факторами ризику, якими є: молодий (до 21 року) вік; зменшення ІМТ, подовження menses; первинна множинність ураження; рецидив хвороби; обтяжений сімейний анамнез; гіперекспресія EsR $\alpha$ ; непроліферативна форма ДДМЗ за результатами аспіраційної біопсії за наявності осередку за результатами УЗД і/або мамографії. Гомозиготний стан за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$  підвищує ризики проліферативного процесу у молочній залозі та асоційований зі збільшенням експресії EsR $\alpha$ , що є додатковим критерієм необхідності проведення хірургічного лікування хворим на ДДМЗ.

На етапі хірургічного лікування і видалення новоутворень молочної залози ми пропонуємо використовувати принципи пластичної, естетичної та реконструктивної хірургії. Ми розробили та запропонували в практику методики хірургічного лікування проліферативної форми доброякісної дисплазії молочної залози. Це відображено в нижченаведених патентах України.

*Спосіб профілактики лактаційної дисфункції в хірургічному лікуванні доброякісних новоутворень молочних залоз* (патент України №84896). Суть заявленої корисної моделі (рис. 3.10) полягає у розробленні оптимального доступу до вузлового осередку ДДМЗ.

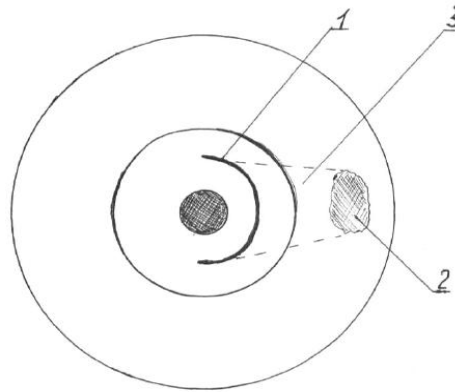


Рисунок 3.10 – Схематичне зображення хірургічного доступу до вузлового осередку ДДМЗ. 1 – розтин ареоли; 2 – осередок ДДМЗ; 3 – тунель у підшкірній клітковині

Після проведення гідродермотензії доступ здійснюється шляхом розтину ареоли в анатомічній зоні між шкірою та соском, загальною довжиною не більше ніж півкола ареоли. Потім м'язовий шар розводять гачками до необхідної довжини. У зоні, вільній від проток (підшкірно), формують тунель до осередку ДДМЗ і видаляють його. Серед осіб, яких ми оперували у 59 (70,23 %) використано цей доступ при видаленні осередків ДДМЗ. Упродовж періоду спостереження (2 роки) у 11 (18,64 %) відбулися

пологи та фізіологічна лактація більше ніж 6 місяців. Решта 48 (81,35 %) не народжували. У післяопераційний період Усі пацієнтки задоволені естетичним виглядом зони оперативного лікування.

*Спосіб оперативного лікування доброякісних захворювань протокової системи молочної залози* (патент України № 83922). Завданням заявленої корисної моделі (рис. 3.11) є вибір адекватного доступу з видаленням ураженої протокової системи молочної залози в необхідному обсязі і маскуванню післяопераційного рубця.

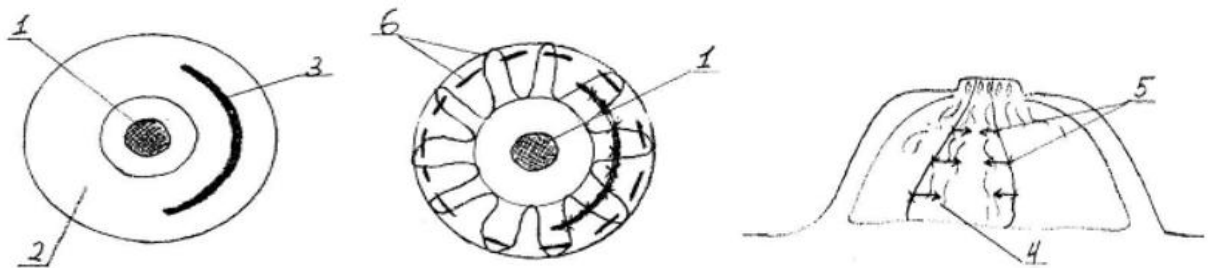


Рисунок 3.11 – Схематичне зображення способу резекції молочної залози при ураженні протокової системи молочної залози: 1 – сосок молочної залози; 2 – ареола; 3 – лінія розтину ареоли; 4 – видалений сектор молочної залози; 5 – напрямок адаптації тканини молочної залози; 6 – кисетний шов на деєпідермізовану ділянку.

Застосування цієї методики дозволяє виконати хірургічне лікування через невеликий розріз на поверхні молочної залози, при цьому видалити необхідний об'єм залозистої паренхіми.

Серед оперованих нами осіб у 8 (9,52 %) застосовано цей спосіб резекції молочної залози з приводу протокової проліферативної хвороби. Перед хірургічним втручанням протоки молочної залози заповнювали контрастним розчином діамантового зеленого.

У однієї пацієнтки впродовж першого року спостереження завагітніла і в неї відбулася лактація. В оперованій молочній залозі зберігалася лактація упродовж 6 місяців, однак потім розвинувся гострий мастит і жінка



відмовилася від подальшого годування грудьми. У післяопераційний період усі пацієнтки задоволені естетичним виглядом зони оперативного лікування.

*Спосіб підшкірної мастектомії з одномоментним субмускулярним ендопротезуванням молочних залоз силіконовими імплантатами* (патент України №83954). Завданням заявленої корисної моделі (рис. 3.12) є виконання радикального хірургічного лікування при тотальній ДДМЗ 3–4-го ступенів проліферації при одночасному збереженні природної форми органа.

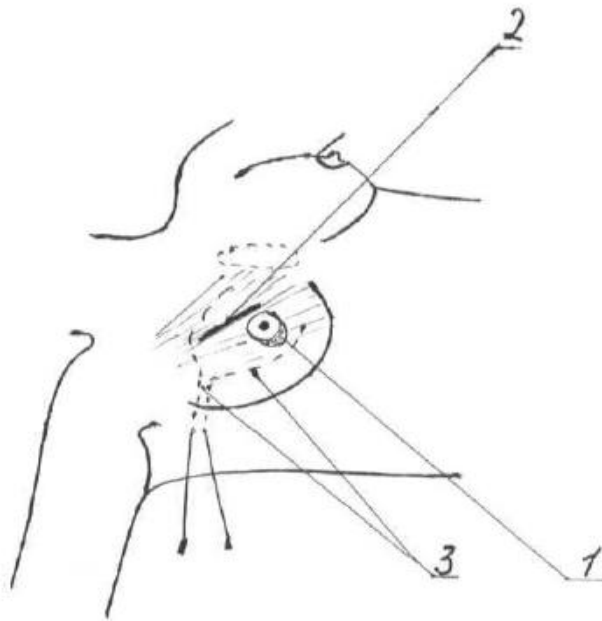


Рисунок. 3.12 – Схематичне зображення способу підшкірної мастектомії при тотальній ДДМЗ 3–4-го ступенів проліферації: 1 – сосок молочної залози з трансареолярним доступом; 2 – проекція фомування субмускулярного кармана для імплантанта; 3 – дренажі в субмускулярному просторі

Технічний результат полягає у виконанні підшкірної мастектомії з двох доступів зі збереженням сосково-ареолярного комплексу та форми молочної залози, що дозволяють прооперованим жінкам запобігти виникненню психологічних розладів, пов'язаних із втратою органа. Збереження цілісності великого грудного м'яза не порушує функції верхньої кінцівки, а також

зменшує ймовірність виникнення контрактур, що полегшує соціальну та психологічну реабілітацію пацієнток.

Серед оперованих у 2 (2,38 %) осіб ми застосували спосіб підшкірної мастектомії для лікування тотального ураження молочної залози ДДМЗ із проліферацією 3–4-го ступенів.

У першому випадку у пацієнтки Ф. 1962 року народження підшкірна мастектомія з одномоментним ендопротезуванням виконана після перенесених 13 секторальних резекцій з приводу полікістозу молочних залоз. Попередні хірургічні втручання призвели до значних деформацій органа та не були радикальними. Після проведеного хірургічного лікування за запропонованою методикою рецидиву хвороби не спостерігається упродовж усього періоду спостереження (2 роки), пацієнтка задоволена естетичним виглядом молочних залоз.

У другому випадку у пацієнтки П. 1969 року народження підшкірна мастектомія з одномоментним ендопротезуванням виконана з приводу фіброаденоматозу обох молочних залоз. Обстеження виявило тотальне ураження обох молочних залоз осередками ДДМЗ із вираженою проліферацією та тенденцією до атипових змін і ділянки метаплазії. У пацієнтки впродовж останніх п'яти років розвинулася канцерофобія з огляду на РМЗ у близьких родичів. Хвора виявила бажання щодо радикального лікування із вимогою зберегти естетичний вигляд молочних залоз. Упродовж усього періоду спостереження (2 роки) пацієнтка задоволена естетичним виглядом молочних залоз.

Розроблено та впроваджено в практику хірургічний інструмент (рис. 3.13) для фіксації і утримання доброякісного новоутворення молочної залози (патент України № 83923 «Хірургічний інструмент для фіксації і утримання тканини молочної залози»). Пристрій працює таким чином. Під час оперативного втручання після візуалізації солідного осередку ДДМЗ у сформованому операційному просторі встановлюють інструмент браншами до об'єкта утримання.

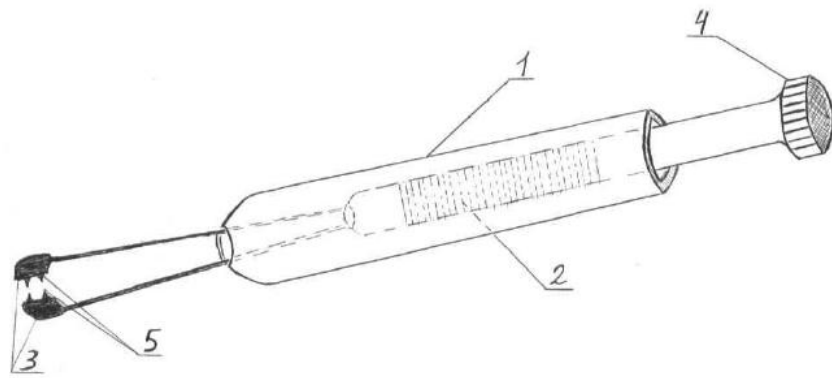


Рисунок 3.13 – Схематичне зображення хірургічного інструменту для фіксації й утримання доброякісного новоутворення молочної залози: 1 – корпус із внутрішньою різьбою; 2 – нарізний шток; 3 – бранші; 4 – головка з насічками; 5 – зубці браншів

Шляхом обертання рухомого корпусу проти годинникової стрілки розводять бранші таким чином, щоб захопити об'єкт. Хірург утримує робочий інструмент за головку з насічками. Далі інструмент фіксують шляхом стиснення браншів при обертанні рухомого корпусу інструмента за годинниковою стрілкою. При цьому зубці на браншах щільно входять вглиб новоутворення молочної залози і не дають можливості вислизнути з робочої частини інструмента. Після регуляції сили затискання хірург поетапно видаляє фіксований об'єкт молочної залози. Таким чином, інструмент дозволяє працювати в умовах обмеженого простору і не порушити при цьому макроскопічної будови осередку ДДМЗ, що важливо під час проведення гістологічного дослідження.

За наявності новоутворення, що не пальпується, тактика лікування залежить від можливостей візуалізації при УЗД і рентгенологічного дослідження. Ми рекомендуємо на передопераційному етапі проводити внутрішньотканинне маркування за допомогою Mammoprep N усіх новоутворень, що не пальпуються чи локалізовані в середній або задній третині молочної залози (рис. 3.14).

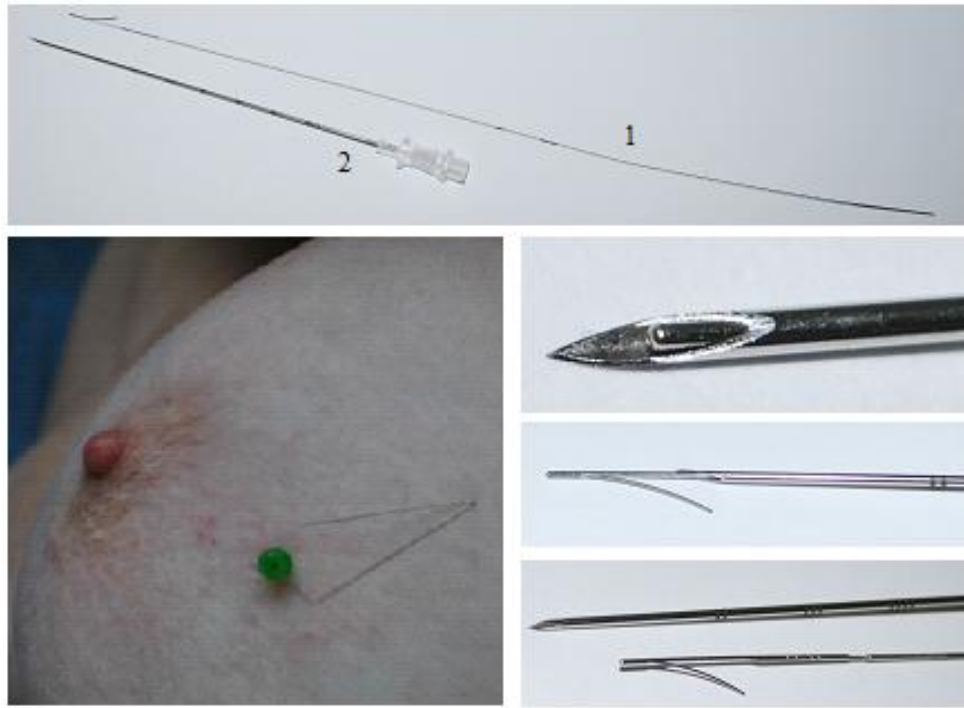


Рисунок 3.14 – Фотографія Матмогер N для маркування новоутворень молочної залози, що не пальпуються: 1 – маркер, що встановлюють під УЗД-контролем у зону пошуку через пункційну голку; 2 – пункційна голка

Це дозволяє проводити радикальне видалення осередку ДДМЗ без зайвого травмування неураженої тканини молочної залози.

**Резюме.** Ми вважаємо, що доля кожного новоутворення повинна вирішуватися окремо з урахування усіх факторів після повного і вичерпного поетапного процесу діагностичного пошуку. Аргументованим і сучасним критерієм необхідності хірургічного втручання може слугувати генетичний тест. Ми довели, що гомозиготний стан за поліморфізмом PvuII гена EsRα асоційований із вираженою проліферацією і потенційною атипією в молочній залозі, а отже, є додатковим критерієм необхідності проведення хірургічного лікування хворим на ДДМЗ. Це доводить, що вивчення генетичних особливостей алельного розподілу за поліморфізмом PvuII гена EsRα дає можливість обґрунтувати необхідність хірургічного лікування. Це дозволяє своєчасно провести хірургічне лікування дисплазії молочної залози, а отже і здійснити дієву профілактику РМЗ.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Проліферативні форми доброякісної дисплазії молочної залози є поширеним патологічним процесом, що має як самостійне значення, так і підґрунтям для можливого розвитку раку [5, 25, 40, 58, 136]. З огляду на це вивчення факторів, що провокують механізми дисплазії і проліферації у молочній залозі, викликає сьогодні підвищений інтерес, про що свідчить значна кількість публікацій за цією проблематикою [13, 15, 28, 31, 33, 40, 54, 79, 89, 121, 122, 135, 138, 150, 120].

У 20–60 % жінок ДДМЗ трапляється частіше у віці 30–50 років і є найпоширенішим патологічним процесом молочної залози. Інтерес клініцистів до різних форм доброякісної дисплазії пояснюється перш за все тим, що вона належить до передпухлинних хвороб, на фоні яких може розвиватися рак. Частота виникнення раку у цієї категорії хворих у 3–5 разів частіша, ніж у загальній популяції, а при проліферативних формах ДДМЗ ризик збільшується у 25–30 разів [48].

Скринінг залишається основним напрямком ранньої діагностики ДДМЗ, особливо у ситуаціях низького та середнього рівнів достатку, коли захворювання виявляється на пізніх стадіях, а ресурси для забезпечення лікування обмежені. Удосконалення діагностики ДДМЗ сприятиме ранньому оперативному втручанню на стадіях, коли лікування ефективніше [119].

На етапі первинного контакту хворих на ДДМЗ із сімейним лікарем чи хірургом часто виникають значні труднощі диференціальної діагностики вузлових новоутворень молочних залоз, особливо у ситуаціях, коли має місце мультифокальність ураження, підозра передпухлинних захворювань у юному і молодому віці, під час вагітності, у період лактації та при повторному розвитку вогнища дисплазії після проведеного хірургічного втручання. Ситуація значно ускладнюється при відмові пацієнтів від інвазійних методів діагностики, а також при окремих формах ДДМЗ, що мають перебіг без

формування вузлів (протокова проліферативна хвороба, папіломатоз). Сучасні методи дослідження молочної залози орієнтовані здебільшого на вогнищеві утвори, що виявляються на підставі клінічного, ехографічного чи рентгенологічного методів дослідження. Однак відомо, що близько 56 % випадків атипової гіперплазії відбувається без локальних вузлів [5]. Вище перелічене обумовлює актуальність проблеми.

Ми спостерігали 84 хворих на ДДМЗ, які лікувалися із застосуванням хірургічних методів. Критеріями відбору для дослідження були симптоми, які, на думку більшості науковців [8, 39], є показаннями для генетичних досліджень. Серед них були: множинні первинні пухлини в одному органі; множинні первинні пухлини у різних органах; білатеральні первинні пухлини у парних органах; мультифокальність усередині одного органа; поява пухлини у ранньому віці; один і більше близьких родичів із тим самим типом пухлин; два родичі і більше з тим самим типом пухлини; два родичі і більше з пухлинами однієї локалізації; два родичі і більше з пухлиною, що належать до раку сімейного типу; два родичі і більше з рідкісною формою раку; три родичі і більше у двох поколіннях із пухлинами однієї локалізації. Критеріями винятку були: непроліферативні зміни у молочних залозах; відсутність ознак генетичної схильності до хвороб грудей; відмова пацієнта брати участь у дослідженні.

Завданнями дослідження були:

1. Визначити частоту алельних варіантів поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  у хворих на доброякісну дисплазію молочної залози.
2. Визначити провідні клінічні предиктори формування доброякісної дисплазії молочної залози у жінок із факторами ризику патології грудей.
3. Установити морфологічні та імуногістохімічні (експресія EsR $\alpha$ ) особливості при різних типах проліферативних змін молочної залози.
4. Вивчити вплив поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  на експресію EsR $\alpha$  у молочній залозі та визначити їх діагностичну значущість у хворих на доброякісну дисплазію молочної залози.

5. Визначити доцільність генетичних досліджень за вивченим поліморфізмом із метою обґрунтування хірургічного лікування хворих на доброякісну дисплазію молочної залози на підставі статистичного математичного аналізу.

6. Вивчити можливості розроблення та практичного застосування алгоритму діагностичної та лікувальної тактик у хворих на проліферативні форми доброякісної дисплазії молочної залози.

Результати нашого дослідження показали, що за однакової гістологічної будови проліферативні форми ДДМЗ відрізняються за рівнем експресії EsR $\alpha$ . Підвищення останньої поєднується зі збільшенням ступеня проліферації [172, 174]. Під час виконання роботи ми вивчили клінічні та анамнестичні фактори, що стосуються проліферації тканини молочної залози і можливі причини, через які реалізується проліферативна дисплазія, а саме – вплив поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  на розвиток ДДМЗ.

Одним із основних завдань, які ми поставили перед собою, стало вивчення зв'язку поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  із факторами ризику ДДМЗ. Відповідні молекулярно-генетичні дослідження були проведені на матеріалі, одержаному від хворих на ДДМЗ під час хірургічного лікування. Нас цікавила не лише можлива асоціація генетичного поліморфізму із цим захворюванням, а і його зв'язок із різними зовнішніми факторами ризику патологічного процесу, особливостями морфологічної будови та рівнем експресії EsR $\alpha$  в осередках проліферації молочної залози.

Дослідження проводили в кількох основних напрямках. З одного боку, досліджували молекулярно-генетичні аспекти впливу одонуклеотидного поліморфізму RvuII в гені EsR $\alpha$  на ефективність транскрипції, з іншого – шукали функціональне значення поліморфізму на клінічному матеріалі, вивчаючи зв'язок між рівнем білків у тканинах та розвитком ДДМЗ. Такий науковий підхід до вивчення впливу поодинокого поліморфізму RvuII на різні патологічні стани молочної залози підтримують низка авторів [76, 107, 109, 115, 128, 152, 176, 177].

Відповідно до поставлених завдань ми провели аналіз рецепторного статусу новоутворень та алельних варіантів гена  $EsR\alpha$  за поліморфізмом  $RvuII$  залежно від віку. Більшість хворих, яких ми оперували (69 %) були особи молодого віку: до 21 років – 15 (17,8 %), від 22 до 39 років – 43 (51,2 %) оперованих. Наведене певною мірою не збігається з даними літератури, за якими прояви ДДМЗ притаманні здебільшого жінкам середньої вікової групи [14, 15]. За даними деяких авторів, на доброякісну патологію молочної залози страждають до 92 % жінок середнього віку [28]. З огляду на пухлинний потенціал проліферативної мастопатії та піки захворюваності на РМЗ дані, які ми отримали насторожують і вимагають уважніше ставитися до обстеження молодих осіб.

Поширеність РМЗ та збільшення смертності від нього зумовлюють актуальність проблеми передпухлинних станів молочної залози [40]. Беручи до уваги одержані дані, ми вважаємо, що скринінг захворювань варто починати з огляду юних осіб у періоди становлення і розвитку молочної залози, тобто з моменту статевого дозрівання. Така думка не випадкова і ґрунтується на поширеності проліферативної дисплазії у юних пацієнтів, яких ми оперували (17,85 % – пацієнти до 21 року). Це підтверджують спостереження інших авторів [66], які у кожній десятій школярки (14–18 років) виявили прояви доброякісної дисплазії на етапі формування молочної залози [66].

Патологічні зміни молочних залоз різноманітні і часто зумовлені відхиленнями від нормального процесу їх формування у дитячому та юнацькому віці. На нашу думку, це може свідчити про генетичну схильність до хвороб грудей. Наведене підтверджує актуальність вивченого питання і спонукає до вдосконалення діагностики у цієї категорії пацієнтів, зокрема генодіагностики.

Серед антропометричних факторів, що можуть корелювати із захворюваннями грудей, є зріст, вага та ІМТ [31, 121]. Деякі автори [37, 55, 98] висловлюють думку, що високий зріст та ожиріння корелюють з



розвитком ДДМЗ. У нашій роботі ми одержали неоднозначні результати. Статистичний аналіз за критерієм Фішера свідчить про те, що маса тіла та ІМТ у хворих на проліферативні форми ДДМЗ має зв'язок із різним генотипом вивченого поліморфізму. Ми довели, що у пацієнтів – гомозигот за мінорним алелем (C/C) – маса тіла і ІМТ достовірно менші, ніж у пацієнтів – носіїв основного алеля (T/T) і гетерозиготних носіїв T/C.

Серед оперованих осіб до проліферативних змін у молочній залозі були схильні худорляві жінки з розміром ступні, більшим за 38, за європейською системою вимірювання, що, власне, відповідало і зросту, вищому за середній. Наведене не суперечить загальним поглядам на зв'язок високого зросту зі схильністю до ДДМЗ, але суперечить думці щодо ожиріння як фактор розвитку дисплазії [31, 37, 55, 98, 121].

У своїй роботі ми дослідили зв'язок вивченого поліморфізму з онкологічною патологією молочної залози у сімейному анамнезі. Усі обстежені пацієнти були поділені на дві групи відповідно до наявності чи відсутності РМЗ у близьких родичів. При цьому встановлено, що необтяжений сімейний анамнез мав місце у 51 (60,7 %) з оперованих, а обтяжений – у 33 (39,3 %). Необтяжений сімейний анамнез трапився при генотипі гетерозигот T/C у 1,5 раза частіше, ніж при гомозиготах T/T, і частіше у 1,8 раза, ніж при генотипі C/C. Обтяжений анамнез зафіксували у 4 рази частіше серед оперованих із генотипом T/C порівняно із генотипом C/C, а із T/T варіантом – у 1,6 раза відповідно. Проте, за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона різниця у розподілі осіб із різними алельними варіантами PvuII гена EsR $\alpha$  була недостовірною ( $\chi^2 = 2,136$ ; P = 0,344).

У дослідженні ми порівняли кількість видалених новоутворень, а також моно- та білатеральність ураження молочної залози, залежно від генотипу за поліморфізмом PvuII. Видалення двох пухлин трапилося частіше у 1,9 раза в оперованих гетерозигот T/C, ніж у гомозигот C/C, і у 1,4 раза частіше, ніж у гомозигот T/T. При видаленні трьох пухлин різниця була такою: в осіб T/C генотипу така кількість утворів була частішою у 4 раза, ніж при генотипі,

C/C і у стільки само разів (4 рази), ніж за генотипом T/T. Перелічене, на нашу думку, свідчить про зв'язок множинності ураження молочної залози із генотипом за вивченим поліморфізмом. Проте обчислення за  $\chi^2$  –критерієм Пірсона показали, що різна кількість новоутворень, а також особливості ураження однієї чи двох залоз не залежали від розподілу за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$ .

Під час дослідження усі пацієнти обстежені на рівень естрадіолу крові. При цьому виявилось, що у більшості оперованих (74–88,1 %) рівень естрадіолу крові був на фізіологічному рівні, а підвищений його рівень – лише у 10 (11,9 %) осіб. При цьому при нормальному його рівні у 50 % зафіксовано генотип T/C, що було частіше, ніж генотип C/C, у 2,3 раза і частіше, ніж генотип T/T, у 1,8 раза. Статистична обробка за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона засвідчила, що розподіл алельних варіантів за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$  статистично не відрізнявся в оперованих із фізіологічним рівнем естрадіолу крові і при гіперестрогенемії ( $\chi^2 = 0,409$ ;  $P = 0,815$ ).

Крім того, ми не виявили зв'язку між тривалістю менструального циклу і початком менархе у пацієнтів із проліферативними формами ДДМЗ залежно від варіанта генотипу за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$ . Однак, було доведено, що у пацієток із різним генотипом за дослідженим поліморфізмом показник тривалості *mensis* достовірно різний ( $F = 3,017$ ;  $P = 0,055$ ). За критерієм Дункана ми дослідили, що жінки-гомозиготи за мінорним алелем (C/C) мали триваліший час *mensis*, ніж гетерозиготи (T/C) та гомозиготи за основним алелем (T/T) – ( $5,67 \pm 0,30$ ) днів проти ( $5,47 \pm 0,30$ ) та ( $4,88 \pm 0,19$ ) днів.

На нашу думку, такий розрахунок доводить, що наявність поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  хоч і не призводить до зміни рівня естрадіолу крові, але впливає на метаболізм естрогену, ймовірно, через зміну якісних або кількісних характеристик EsR $\alpha$ . Клінічним відображенням цього явища може бути тривалість *mensis*, про що свідчать й інші дослідники [53, 164].

За наявною гінекологічною патологією чи без неї оперовані пацієнтки поділені майже порівну: 41 (48,8 %) і 43 (51,2 %) відповідно. Отже, за відсутності гінекологічних захворювань ДДМЗ трапилися частіше, хоча і недостовірно. Ми порівняли кожену групу пацієнтів за генотипами вивченого поліморфізму. Статистичної різниці не знайдено ( $\chi^2 = 2,368$ ;  $P = 0,306$ ). Хоча, за даними літератури, у 93,7 % хворих на ДДМЗ виявляють гінекологічні захворювання. Наші дані налаштовують на інше. Навіть за відсутності гінекологічних захворювань потрібно мати на увазі можливість розвитку ДДМЗ. Отже, для її діагностики потрібно застосовувати не лише морфометричні методики та анамнез, а й імуногістохімічні та генетичні.

Необхідно зазначити, що у випадках, коли ДДМЗ не супроводжується гіперестрогенемією, або гінекологічною патологією вплив естрадіолу на молочну залозу зберігається, що свідчить про існування інших, не пов'язаних з гіперестрогенемією, механізмів впливу. Спостереження багатьох дослідників [52, 86, 141, 175] доводять, що проліферативні форми ДДМЗ можуть проявляти себе без підвищення рівня естрадіолу. Це дає підстави шукати інші причини проліферативних змін. Ми встановили, що естрогенпозитивні зразки ДДМЗ мали місце за наявних гінекологічних захворювань у 54,0 % оперованих, а за відсутності цих захворювань – у 56,3 %. Абсолютне порушення гормонального балансу відмічається не часто, ще рідше цей стан підтверджується даними гормонального обстеження, тому особливе значення надається об'єктивним критеріям гормональної чутливості тканини молочної залози [6, 34, 63, 95]. Отже, навіть за фізіологічного рівня естрадіолу гіперекспресія EsR $\alpha$  може приводити до проліферативних змін (ДДМЗ) і може бути маркером можливої анаплазії (метаплазії).

Таку думку підтримують дослідники Holst F et al. [105], які також відмічали посилення експресії EsR $\alpha$  при доброякісних та передпухлинних хворобах молочної залози і роблять висновки, що це може бути загальним

механізмом при проліферативних захворюваннях та ранніми ознаками генетичних змін у хворих на РМЗ.

Разом із тим існують і протилежні дані. У незміненій тканині молочної залози рецепторний статус був позитивним у 58 % випадків і експресія EsR $\alpha$  була достовірно вищою у незміненій тканині, ніж у пухлині [60].

Виконані нами статистичні обчислення свідчать про відсутність зв'язку між рецепторним статусом EsR $\alpha$  новоутворень молочної залози та захворюваннями органів малого тазу ( $\chi^2 = 0,076$ ; P = 0,783).

Відомо, що біль у грудях (мастодинія) – основна причина, яка спрямовує жінку до лікаря. Понад 69 % оперованих нами пацієнтів ствердно відповідали на запитання, чи турбує їх мастодинія на момент огляду. Отже, ми поділяємо думку авторів [13, 135] про високу діагностичну значущість цієї скарги.

При вивченні наявності мастодинії у пацієток із ДДМЗ залежно від алельних варіантів поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  ми довели, що генотип T/T характерний для жінок, які не скаржаться на біль та набряк молочної залози, а генотип C/C пов'язаний з існуванням мастодинії. Ці дані потрібно враховувати як при скринінговому обстеженні, так і при обстеженні пацієток під час їх звернення. Показник P, визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, дорівнював 0,003, що свідчить за достовірну різницю у розподілі алельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII у пацієнтів залежно від наявності мастодинії.

Серед оперованих нами пацієнтів явище сецернації відмічали понад 20 %. Проте ця клінічна ознака не мала статистичного зв'язку з досліджуваними критеріями та не пов'язана з генотиповими особливостями за вивченим поліморфізмом гена EsR $\alpha$  ( $\chi^2 = 2,173$ ; P = 0,337).

Відомо, що у ряді випадків проліферативні зміни поширюються не на всю молочну залозу, а лише на її окремі ділянки. З огляду на це у дослідженні були порівняні особливості патоморфології тканини ДДМЗ (тип,

ступінь проліферації) та поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  з рецепторним статусом за експресією EsR $\alpha$ .

Ми дослідили зв'язок кількості новоутворень, їх розмірів та терміну спостереження (від часу діагностування ДДМЗ до хірургічного втручання) з рецепторним статусом за експресією EsR $\alpha$  (рецепторпозитивні, рецепторнегативні новоутворення) та досліджуваним поліморфізмом. Незважаючи на типову гістологічну структуру новоутворень різного типу проліферації при ДДМЗ, встановлено різний рівень експресії EsR $\alpha$  в усіх без винятку варіантах вивченої патології. Але аналіз одержаних результатів довів, що рецепторний статус та генотипу поліморфізму PvuII не вплинув на тип проліферації.

Аналіз одержаних даних доводить, що хворі на ДДМЗ із позитивним рецепторним статусом видаленої тканини перебували більше часу на етапі доопераційного нагляду і лікування, ніж пацієнти, які оперовані з приводу рецепторнегативних новоутворень. Різниця у терміні спостереження становила 0,68 року ( $t = 0,844$ ;  $P = 0,035$ ). Розмір ураженої ділянки при рецепторпозитивних до естрадіолу тканинах був більшим, ніж при рецепторнегативних тканинах на 1,3 мм ( $t = 0,006$ ;  $P = 0,535$ ). Отже, ці показники можуть бути деякою мірою маркерами щодо можливої метаплазії ДДМЗ, що обумовлює показання до хірургічного лікування останньої.

Для оцінювання морфологічних змін у оперованих пацієнток на ДДМЗ після хірургічного втручання виконували гістологічне дослідження видалених новоутворень. Залежно від переважаючого типу проліферації ми встановили такі гістологічні варіанти: фіброепітеліальний, міоепітеліальний, епітеліальний часточковий і протоковий. У 86 (64,2 %) вивчених препаратах переважали зразки ДДМЗ із значною проліферативною активністю (3–4-го ступенів) та метаплазією в окремих ділянках із тенденцією до атипових змін. Меншість вивчених препаратів – 48 (35,8 %) – були представлені новоутвореннями із незначною проліферативною активністю (1–2-го ступенів).

З огляду на існуючі думки щодо впливу тривалості проліферативних змін та їх кількості на розвиток РМЗ ми порівняли їх із генетичним станом за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$ . На підставі дисперсійного аналізу встановили, що тривалість перебігу ДДМЗ при генотипі T/T становила ( $2,35 \pm 0,33$ ) року, при генотипі T/C – ( $2,65 \pm 0,30$ ), при генотипі C/C – ( $3,06 \pm 0,42$ ). Максимальна різниця між цими показниками становила 0,71 року. Проте між цими показниками і варіантами генотипу за поліморфізмом RvuII різниці не встановлено ( $P = 0,469$ ). Те саме стосується і залежності видалених новоутворень і вивченого поліморфізму – достовірної різниці не встановлено ( $P = 0,981$ ).

Розмір ділянок видаленого утвору при EsR $\alpha$ + був більшим, ніж при EsR $\alpha$ - на 1,28 мм, проте ця різниця не була достовірною.

Вивчивши вплив експресії стероїдних гормонів на розвиток проліферативного осередку при ДДМЗ, ми встановили, що оперовані з позитивним рецепторним статусом у доопераційний період перебували під нашим наглядом ( $3,08 \pm 0,22$ ) року, з негативним рецепторним статусом – ( $2,40 \pm 0,23$ ) року, що триваліше на 0,68 року ( $t = 0,844$ ;  $P = 0,035$ ).

Ми дослідили, крім типу проліферації, ще й ступінь трансформації типових гістологічних структур, і порівняли ці показники з рецепторним статусом тканини та алельним розподілом поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$ . А також довели, що проліферативна активність при ДДМЗ залежить від рівня EsR $\alpha$  і зростає при збільшенні експресії у тканині молочної залози. Крім того, можемо стверджувати, що серед вивчених зразків існує зв'язок між поліморфізмом RvuII і ступенем проліферативних змін новоутворень: генотип T/T характерний для осередків дисплазії з проліферацією 1–2-го ступенів, а генотип C/C – для дисплазії з вираженими проліферативними змінами 3–4-го ступенів.

Результати наших досліджень збігаються з даними Cericatto et al. (2005) та демонструють поєднання підвищеної проліферативної активності з високим рівнем експресії EsR $\alpha$  при ДДМЗ [113]. З іншого боку, автори [111,

164] не виявили статистично значущої різниці в експресії EsR $\alpha$  у хворих на ДДМЗ.

Вивчення зв'язку між морфологічними та ІГХ характеристиками тканини у зоні ДДМЗ показало, що при практично однаковій гістологічній будові осередки дисплазії відрізняються за рівнем експресії EsR $\alpha$ . Так, при епітеліальній часточковій проліферації кількість зразків із рецепторпозитивною експресією EsR $\alpha$  була частішою у 1,6 раза, ніж із рецепторнегативною. Те саме стосувалося й епітеліальної протокової проліферації – у 1,6 раза. При міоепітеліальній проліферації віднесення було зворотним: кількість рецепторнегативних зразків перевершувала таку із рецепторпозитивними зразками. Фіброепітеліальна проліферація виявилася частішою з рецепторпозитивною експресією у 1,2 раза. Вважаємо, це співвідношення може мати практичне застосування при визначенні показань при оперативному лікуванні осіб на ДДМЗ. Хоча показник P за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона дорівнює 0,525 і не свідчить про достовірну відмінність частоти експресії EsR $\alpha$  при різних типах проліферації. Проте він може свідчити про вплив експресії EsR $\alpha$  на інтенсивність проліферації, що можна використовувати як індикатор проліферативної активності ДДМЗ для аргументації консервативної чи хірургічної тактики.

Аналіз частоти алельних варіантів за RvuII-поліморфізмом гена EsR $\alpha$  в оперованих із різними типами проліферативних змін при ДДМЗ підтвердив, що серед гомозигот за мінорним алелем (C/C) та гомозигот за основним алелем (T/T) поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  частота різних типів проліферації не мала статистичної відмінності ( $\chi^2 = 9,123$ ; P = 0,167). Отже, можна стверджувати, що серед вивчених новоутворень наявність поліморфізму RvuII гена EsR $\alpha$  не зумовлювала типу проліферації при ДДМЗ.

Разом із тим порівняння супеня проліферативних змін, які умовно поділяють на незначні (1–2-го ступені) і значні (3–4-го ступенів), в осіб з осередками ДДМЗ EsR $\alpha$ – встановлено переважання незначної проліферації над значною у 1,8 раза. В осіб з EsR $\alpha$ + експресією виявилася протилежна

тенденція: превалювали значні проліферативні зміни над незначними у 1,5 рази. В осіб зі значною проліферативною активністю превалювали зразки EsR $\alpha$ <sup>+</sup> над зразками EsR $\alpha$ <sup>-</sup> у 2,4 рази. Одержані результати аналізу зв'язку цих показників за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона підтверджують їх достовірність ( $\chi^2 = 7,370$ ; P = 0,007).

Наші дані доводять, що визначення експресії EsR $\alpha$  – об'єктивний критерій для призначення антиестрогенів з метою профілактики і лікування проліферативної дисплазії молочної залози. Ми довели, що у пацієток цієї категорії існує зв'язок між ступенем експресії EsR $\alpha$  і проліферативною активністю при ДДМЗ із гомозиготним станом за мінорним алелем поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$ .

У рамках досліджень NSABP (National Surgical Adjuvant Breast Project Chemoprevention Trail) виявлено, що приймання антиестрогенів (тамоксифен) у групі високого ризику достовірно зменшує частоту виникнення гормонозалежних пухлин молочної залози на 49 % (p < 0,00001) [178].

Незважаючи на те що в більшості досліджень [173, 178, 93, 94] доведена профілактична ефективність антиестрогенів щодо розвитку РМЗ у жінок із передпухлинною патологією грудей [163], широке призначення обмежене у зв'язку з багаточисельними ускладненнями, що виникають на фоні приймання цієї групи препаратів: розвитку гіперплазії ендометрія, тромбозу глибоких вен тощо [184]. Також відомо, що існує достатньо велика група пацієнтів, клітини молочної залози яких не мають рецепторів до естрогену. З даних літератури бачимо, що ця група пацієнтів може становити до 32 % [6, 99, 178]. Призначення антиестрогенів пацієнтам цієї групи як засобу профілактики не дасть бажаного результату. Цим хворим може бути запропоновано інший варіант профілактики – хірургічний.

Крім того, встановлено, що ступінь проліферації тканини при ДДМЗ залежав від варіантів генотипу за поліморфізмом PvuII гена EsR $\alpha$ . Так, при генотипі С/С значні проліферативні зміни були частішими від невираженої проліферації у 14,3 рази. У той час як при Т/Т генотипі все було навпаки –



зміни 1–2-го ступенів превалювали у 3,5 раза над проліферацією 3–4-го ступенів. При порівнянні частоти зразків зі значною проліферативною активністю в осіб із різними генотипами показано превалювання їх при С/С варіанті над Т/Т генотипом у 4,8 раза. Показник  $P$ , визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона підтверджує достовірну різницю між генотипами за поліморфізмом PvuII і ступенем проліферації при ДДМЗ ( $\chi^2 = 43,142$ ;  $P < 0,0001$ ).

Поряд із наведеним було вивчено вплив генотипу на експресію EsR $\alpha$ . Так, при генотипі С/С експресія EsR $\alpha$  досягала ( $6,33 \pm 0,13$ ) бала, що було інтенсивнішим, ніж при Т/Т-генотипі у 2,6 раза. За критерієм Дункана рівень різниці був достовірний.

Множинність ураження та білатеральне розташування новоутворень не залежала від генотипів поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  ( $\chi^2 = 4,889$ ;  $P = 0,087$ ) та рівня експресії EsR $\alpha$  ( $\chi^2 = 0,070$ ;  $P = 0,791$ ).

При цитоморфологічному вивченні зразків видалених ділянок при ДДМЗ за категоріями С (1, 2, 3, 4) не встановлено статистичної різниці між ними і генетичним розподілом поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  ( $\chi^2 = 10,228$ ;  $P = 0,113$ ) та експресією EsR $\alpha$  ( $\chi^2 = 2,228$ ;  $P = 0,515$ ).

Одержані результати УЗД, хворих на ДДМЗ, не відрізнялися в оперованих зі слабковираженою та сильновираженою експресією EsR $\alpha$ . Те саме одержано і при вивченні молочних залоз шляхом мамографії. Отже, наведене не дозволяє визначитися з гормональними та проліферативними особливостями новоутворень у молочних залозах, а відтак, визначитися із тактикою ведення таких хворих, призначенням чи відмовою від хірургічного втручання.

Вивчення зв'язку поліморфних локусів гена EsR $\alpha$  з клінічними і лабораторними показниками у хворих на ДДМЗ дає корисну інформацію про її патогенез. У виконаній нами роботі вперше проаналізовано асоціацію поліморфізму PvuII гена EsR $\alpha$  з рівнем експресії EsR $\alpha$  у пацієнтів із проліферативними формами ДДМЗ і виявлено зв'язок досліджуваного

генетичного чинника зі зростанням експресії  $EsR\alpha$  та ступенем проліферації у пацієнтів групи ризику на РМЗ. Уперше встановлено зв'язок клініко-анамнестичних даних з рівнем експресії  $EsR\alpha$  та впливом поліморфізму  $RvuII$  гена  $EsR\alpha$  на формування проліферативної мастопатії, а також визначено частоту однонуклеотидного поліморфізму  $RvuII$  у хворих на ДДМЗ в Україні, а у носіїв такого поліморфізму існує тенденція до виражених та атипичних змін тканини молочної залози. З огляду на вплив поліморфізму  $RvuII$  важливу роль відіграє визначення експресії  $EsR\alpha$  в осередках ДДМЗ у жінок із факторами ризику хвороб молочної залози як об'єктивний критерій проліферативних змін та підґрунтя для призначення антиестрогенної терапії як профілактики раку. Висновки роботи покладені в основу виявлення пацієнток, схильних до розвитку проліферативних форм ДДМЗ та їх своєчасного хірургічного лікування для запобігання розвитку малігнізації. Мастодія, ІМТ, тривалість *mensis* у поєднанні з гомозиготним станом за  $RvuII$ -поліморфізмом та експресією  $EsR\alpha$  вважаємо предикторами проліферативних змін ДДМЗ, що є підставою для обстеження таких хворих фахівцем-мамологом. Ураховуючи значущість проблеми (захворюваність та хворобливість на ДДМЗ і РМЗ), потреба введення такого фахівця у розклад органів охорони здоров'я від II рівня медичної допомоги є на часі.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведені теоретичне узагальнення й спроба нового вирішення задачі про зв'язок між генетичними особливостями індивідуума та фенотипічними проявами доброякісної дисплазії молочної залози. Зокрема, наведені дані щодо ролі поліморфізму RvuII у розвитку проліферації тканини молочної залози через механізми гіперекспресії EsR $\alpha$ , що можна використовувати як критерій необхідності хірургічного лікування.

1. Частота аельних варіантів гена EsR $\alpha$  за поліморфізмом RvuII у пацієнтів із проліферативною формою доброякісної дисплазії молочної залози розподілилася так: генотип T/T – 27,4 %, генотип T/C – 51,2 %, генотип C/C – 21,4 %.

2. Найбільш значущими клінічними предикторами у хворих на проліферативні форми доброякісної дисплазії молочної залози визначаються: мастодинія ( $\chi^2 = 11,444$ ;  $P = 0,003$ ), зменшення ІМТ до  $(21,17 \pm 1,06)$  кг/м<sup>2</sup> ( $F = 5,020$ ;  $P = 0,009$ ), подовжена менструація до  $(5,67 \pm 0,30)$  дня ( $F = 3,017$ ;  $P = 0,055$ ).

3. За однакової гістологічної структури доброякісної дисплазії молочної залози встановлено різний рівень експресії EsR $\alpha$  в усіх варіантах вивченої патології. Водночас тип проліферації ДДМЗ не був обумовлений генотипом за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  ( $\chi^2 = 9,123$ ;  $P = 0,167$ ) і не залежав від рецепторного статусу за експресією EsR $\alpha$  ( $\chi^2 = 2,236$ ;  $P = 0,525$ ).

4. В оперованих хворих на доброякісну дисплазію молочної залози, крім стандартного морфологічного дослідження, виправданим є проведення імуногістохімічного тесту з визначенням рівня експресії EsR $\alpha$ , оскільки підвищення рівня експресії асоційоване зі збільшенням проліферації ( $\chi^2 = 7,370$ ;  $P = 0,007$ ) та гомозиготним станом (C/C) за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  ( $F = 189,250$ ;  $P < 0,001$ ).

5. Гомозиготний стан (C/C) за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  є достовірним індикатором підвищеної проліферативної активності зі схильністю до атипових змін ( $\chi^2 = 43,142$ ;  $P < 0,0001$ ), що є об'єктивним

критерієм необхідності хірургічного лікування хворих на доброякісну дисплазію молочної залози.

б. Запропонований алгоритм комплексної діагностики доброякісної дисплазії молочної залози передбачає визначення генотипів за поліморфізмом RvuII та рівня експресії EsR $\alpha$ . На тлі предикторів атипової метаплазії (сімейний анамнез, мастодинія, зменшення ІМТ та подовжений термін mensis) його можна розглядати як «додаток» до відповідних наказів МОЗ України. Це дозволяє виділити групу пацієнтів, клітини молочної залози яких не мають рецепторів до естрогену. Призначення антиестрогенів пацієнтам цієї групи як засобу профілактики не дасть бажаного результату. Цим хворим необхідно запропонувати інший варіант профілактики подальшої атипії – хірургічний.

### **ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

Результати роботи можуть бути покладені в основу виявлення пацієнтів, схильних до розвитку проліферативних форм ДДМЗ, для своєчасного хірургічного лікування і запобігання розвитку малігнізації.

Рекомендовано визначати поліморфізм RvuII гена EsR $\alpha$  у пацієнок із факторами ризику, до яких відносимо: молодий (до 21 року) вік пацієнок; зменшення ІМТ, подовження mensis; первинну множинність ураження; рецидив хвороби; обтяжений сімейний анамнез; гіперекспресію EsR $\alpha$ ; непроліферативну форму ДДМЗ за результатами аспіраційної біопсії при виявленні осередку за результатами УЗД чи мамографії.

До групи високого ризику відносять пацієнтів із клінічними (мастодинії, триваліший період mensis), антропометричними (ІМТ) та молекулярно-генетичними (RvuII-поліморфізм) предикторами проліферативних форм ДДМЗ. При поєднанні клінічних предикторів із гомозиготним станом С/С за поліморфізмом RvuII гена EsR $\alpha$  показане хірургічне лікування. Курацію пацієнтів із проліферативними формами ДДМЗ рекомендовано проводити відповідно до запропонованого алгоритму.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Абдуллаев Р. Я. Комплексная эхография / Р. Я. Абдуллаев, С. Левит, Ю. С. Соболев. – Харьков : Факт, 1999. – С. 56–69.
2. Агамова К. А. К вопросу о причинах ошибок цитологической диагностики и возможных путях их предупреждения / К. А. Агамова // Новости клинической цитологии России. – 1997. – № 1. – С. 5–9.
3. Агамова К. А. Ошибки в цитологической диагностике / К. А. Агамова // Ошибки в клинической онкологии: Руководство для врачей / под ред. В. И. Чиссова, А. Х. Трахтенберга. – М. : Медицина, 1993. – С. 90–113.
4. Андреева Е. Н. Основные аспекты этиологии, патогенеза фиброзно-кистозной болезни молочной железы / Е. Н. Андреева, Е. В. Леднева // Акушерство и гинекология. – 2002. – № 6. – С. 7–9.
5. Байлюк Е. Н. Клинико-морфологические особенности пролиферативных процессов в молочной железе у больных миомой матки / Е. Н. Байлюк // Журн. акуш. и жен. болезн. – 2010. – Т. LIX, № 1. – С. 98–105.
6. Балашова О. И. Опыт применения препарата Фарестон в комплексном лечении дисгормональных гиперплазий молочной железы у женщин с сохраненной менструально-овариальной функцией / О. И. Балашова, Я. В. Антоновская // Онкология. – 2004. – Т. 6, № 3. – С. 189–192.
7. Белохвостов А. С. Онкомаркеры : пособие для врачей / А. С. Белохвостов, А. Г. Румянцева. – М. : МАКС-Пресс, 2003. – 93 с.
8. Болгова Л. С. Цитоморфологическая диагностика заболеваний грудной железы : учебное пособие для врачей / Л. С. Болгова, Т. Н. Туганова, И. И. Смоланка. – Киев : Издательство «Интерсервис», 2010. – 231 с.
9. Влияние препаратов гестагенного ряда на морфофункциональное состояние молочных желез / Е. Ф. Кира, С. В. Бескровный, А. Б. Ильин [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2000. – Т. 49, № 2. – С. 75–84.

10. Вольф А. С. Атлас детской и подростковой гинекологии / А. С. Вольф, Ю. Э. Митаг ; пер. с нем. ; под ред. В. И. Кулакова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 304 с.
11. Габуня М. С. Состояние молочных желез при заместительной гормональной терапии / М. С. Габуня, Т. А. Лобова, Л. Г. Егорова // Акушерство и гинекология. – 2001. – № 2. – С. 50–53.
12. Головин Д. И. Ошибки и трудности гистологической диагностики опухолей / Д. И. Головин. – Ленинград : Медицина, 1982. – С. 186–202.
13. Гуменюк О. И. Состояние здоровья девочек-подростков, учащихся учреждений начального и среднего профессионального образования / О. И. Гуменюк, Ю. В. Черненко, А. С. Эйберман // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7, № 1. – С. 141–145.
14. Диагностика рака молочной железы / под ред. В. А. Хайленко, Д. В. Комарова, В. Н. Богатырева. – М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. – 240 с.
15. Диксон М. Заболевания грудной железы: все, что нужно знать / М. Диксон, Р. Леонард. – М. : АСТ «Астрель», 2006. – 80 с.
16. Доброкачественные заболевания молочных желез: руководство по диагностике и лечению / под ред. О. С. Филиппова. – М. : МЕДпресс-информ, 2008. – 112 с.
17. Думанский Ю. В. Антиэстрогенная терапия больных раком молочной железы с использованием Фарестона / Ю. В. Думанский, И. Е. Седаков, С. О. Алиева // Онкология. – 2004. – № 6 (1). – С. 60–62.
18. Дымарский Л. Ю. Рак молочной железы / Л. Ю. Дымарский. – М. : Медицина, 1980. – 192 с.
19. Експресія рецепторів стероїдних гормонів як фактор прогнозу у хворих на рак молочної залози / Р. С. Конар, А. В. Русин, М. Ф. Рішко [та ін.] // Онкология. – 2008. – № 10 (1). – С. 55–57.

20. Заболотская Н. В. Ультразвуковая томография заболеваний молочной железы / Н. В. Заболотская // Акушерство, гинекология и педиатрия. – 1993. – № 4. – С. 95–106.

21. Зайцев В. М. Прикладная медицинская статистика / В. М. Зайцев, В. Г. Лифляндский, В. И. Маринкин. – СПб. : Фолиант, 2006. – 432 с.

22. Зотов А. С. Мастопатия и рак молочной железы: краткое руководство / А. С. Зотов, Е. О. Белик. – Киев, 2003. – 82 с.

23. Изучение связи маммографической плотности молочных желез с эффектами глюкозы и уровнем циркулирующих в крови стволовых клеток / Л. М. Берштейн, Д. А. Васильев, И. Г. Коваленко [и др.] // Вопросы онкологии. – 2011. – № 1. – С. 42–47.

24. Ильин А. Б. Дисгормональные гиперплазии молочных желез у больных миомой матки : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. Б. Ильин. – М., 1998. – 20 с.

25. Ильин А. Б. Дисгормональные заболевания молочной железы / А. Б. Ильин // Хирургия. – 1997. – № 11. – С. 115–118.

26. Иммуногистохимическое исследование экспрессии рецепторов стероидных гормонов и E-кадгерина как возможных маркеров прогноза у больных раком молочной железы / О. В. Юрченко, Е. Д. Волкова, Н. В. Русецкая [и др.] // Онкология. – 2004. – № 6 (4). – С. 252–256.

27. Клиническая маммология / под ред. В. П. Харченко, Н. И. Рожковой. – М. : ООО «Фирма Стром», 2005. – 200 с.

28. Клиническая маммология: современное состояние проблемы / под ред. Е. Б. Камповой-Полевой, С. С. Чистякова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 512 с.

29. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике / под ред. В. В. Митькова, М. В. Медведева. – М., 1997. – Т. 3. – С. 132–174.

30. Кобзарь А. И. Прикладная математическая статистика / А. И. Кобзарь. – М. : Физматлит, 2006. – 327 с.

31. Коган И. Ю. Мастопатия: фиброзно-кистозная болезнь молочных желез (патогенез, диагностика, лечение) : учеб.-метод. пособие / И. Ю. Коган, М. А. Тарасова, М. О. Мясникова. – СПб. : Изд-во Н-Л, 2008. – 52 с.

32. Коган И. Ю. Молекулярно-биологические маркеры пролиферации и апоптоза в эпителии молочной железы / И. Ю. Коган // Молекулярная медицина. – 2008. – № 1. – С. 23–27.

33. Коколина В. Ф. Детская и подростковая гинекология: руководство для врачей / В. Ф. Коколина. – М. : ИД «Медпрактика-М», 2006. – 640 с.

34. Ласачко С. А. Комплексный подход к ведению пациенток с гинекологическими заболеваниями и опухолевыми и дисгормональными процессами молочных желез / С. А. Ласачко, В. П. Квашенко, С. Ю. Сергиенко // Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів. – Київ : Інтермед, 2006. – С. 373–375.

35. Летягин В. П. Рак молочной железы: Эпидемиология, классификация, диагностика, лечение, прогноз / К. П. Лактионов, И. В. Высоцкая, В. А. Котов. – М., 1996. – 150 с.

36. Летягин В. П. Мастопатия: современные аспекты лечения заболеваний молочных желез / В. П. Летягин // Русский медицинский журнал. – 2000. – Т. 8, № 11. – С. 468–470.

37. Летягин В. П. Факторы риска развития рака молочной железы / В. П. Летягин, И. В. Высоцкая, Е. А. Ким // Маммология. – 2006. – № 4. – С. 10–12.

38. Луценко Н. С. Мастопатия: проблемы и решения / Н. С. Луценко // Репродуктивное здоровье женщины. – 2006. – № 1 (25). – С. 55–57.

39. Мальдештам М. Ю. Рак молочной железы. Тканевые маркеры в оценке метастазирования и прогноза / М. Ю. Мальдештам, А. С. Ожерельев, Н. Е. Кушлинский. – М. : Издательская группа РОНЦ, 2003. – 250 с.

40. Маммология: национальное руководство / под ред. В. П. Харченко, Н. И. Рожковой. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 328 с. – С. 20–21, 131.



41. Межевитинова Е. А. Предменструальный синдром / Е. А. Межевитинова, В. Н. Прилепская // Гинекология (приложение). – 2002. – С. 3–8.
42. Молочные железы и их заболевания у детей / А. Б. Окулов, Л. В. Адамян, Д. Н. Бровин [и др.]. – М. : МИА, 2010. – 160 с.
43. Накази МОЗ України № 624 від 03.11.2008 р. та № 645 від 30.07.2010 р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://www.moz.gov.ua>.
44. Невожай В. И. Иммуногистохимическое исследование рецепторов стероидных гормонов при раке молочной железы / В. И. Невожай, Е. С. Мюллер // Тихоокеанский мед. журнал. – 2007. – № 4. – С. 79–80.
45. Нейроэндокринная патология в гинекологии и акушерстве: руководство для врачей / И. А. Гилязутдинов, З. Ш. Гилязутдинов, И. М. Боголюбова [и др.]. – М. : МЕДпресс-информ, 2006. – 416 с.
46. Нейштадт Э. Л. Патология молочной железы / Э. Л. Нейштадт, О. А. Воробьева. – СПб. : Фолиант, 2003. – 208 с.
47. Ориновский М. Б. Рак молочной железы. Тканевые маркеры в оценке метастазирования и прогноза / М. Б. Ориновский, А. С. Ожерельев, Н. Е. Кушлинский. – М. : Издательская группа РОНЦ, 2003. – 250 с.
48. Павлов К. А. Онкология в практике поликлинического врача / К. А. Павлов, М. Д. Пайкин, Л. Ю. Дымарский. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1987. – 320 с.
49. Поиск часто встречающихся мутаций предрасположенности к раку молочной железы / М. Ю. Мандельштам, В. И. Голубков, Е. П. Ламбер [и др.] // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 12. – С. 1681–1686.
50. Практическое руководство по гинекологической эндокринологии / В. Н. Серов, В. Н. Прилепская, Т. Я. Пшеничникова [и др.]. – М., 1995. – 426 с.

51. Прилепская В. Н. Мастопатия у женщин репродуктивного возраста: клиника, диагностика, лечение / В. Н. Прилепская, А. И. Волобуев, О. Б. Швецова // Гинекология. – 2003. – Т. 5, № 4. – С. 161–165.

52. Прогностическое значение иммуногистохимических маркеров для выбора тактики терапии больных раком молочной железы / Н. Н. Мельник, К. А. Галахин, А. А. Литвиненко [и др.] // Онкология. – 2004. – № 6 (4). – С. 259–261.

53. Розен В. Б. Основы эндокринологии / В. Б. Розен. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1994. – 383 с.

54. Руководство по гинекологии детей и подростков / под ред. В. И. Кулакова, Е. А. Богдановой. – М. : Триада-Х, 2005. – 336 с.

55. Семиглазов В. Ф. Неинвазивные и инвазивные опухоли молочной железы / В. Ф. Семиглазов, В. В. Семиглазов, А. Е. Клецель. – СПб., 2006. – С. 6–60.

56. Семиглазов В. Ф. Опухоли молочной железы (лечение и профилактика) / В. Ф. Семиглазов, К. Ш. Нургазиев, А. С. Арзуманов. – Алматы, 2001. – 344 с.

57. Сметник В. П. Неоперативная гинекология: руководство для врачей / В. П. Сметник, Л. Г. Тумилович. – М. : Медицинское информационное агенство, 1998. – 592 с.

58. Смоланка И. И. Дисгормональные гиперплазии молочной железы: этиология, клинические формы, принципы терапии / И. И. Смоланка, И. В. Досенко // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2007. – № 3 (6). – С. 42–43.

59. Содержание рецепторов прогестерона глюкокортикоидов и глицирризиновой кислоты в опухолевой и нормальной ткани молочной железы человека / Т. Н. Ильичева, Т. Р. Проняева, А. А. Сметанников [и др.] // Вопросы онкологии. – 1998. – Т. 44, № 4. – С. 390–394.

60. Сравнительное изучение содержания рецепторов эстрогенов и прогестерона в неизменной, опухолевой и метастатической тканях при

раке молочной железы / Е. Е. Шашова, И. В. Кондакова, Е. М. Слонимская, С. А. Глущенко // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 4 (28). – С. 42–45.

61. Стариков В. И. Фиброзно-кистозная мастопатия / В. И. Стариков // Междунар. мед. журн. – 2002. – № 1. – С. 144–148.

62. Тагиева Т. Т. Фиброзно-кистозная мастопатия / Т. Т. Тагиева // Гинекология. – 2003. – Т. 7, № 3. – С. 141–148.

63. Татарчук Т. Ф. Эндокринная гинекология (клинические очерки) : в 2 ч. / Т. Ф. Татарчук, Я. П. Сольский. – Киев, 2003. – Часть 1. – С. 147–180.

64. Тихомиров А. Л. Местные гормональные препараты в лечении доброкачественных патологий молочных желез, сопровождающийся масталгией / А. Л. Тихомиров, Д. М. Лубнин // Русск. мед. журн. – 2000. – № 18. – С. 768–771.

65. Тиц Н. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Н. Тиц. – М. : Лабинформ, 1997. – 942 с.

66. Травина М. Л. Подростковая маммология / М. Л. Травина, Т. Ю. Поляева // Consilium Medicum: Педиатрия. – 2010. – № 4. – С. 68–73.

67. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В. Ю. Урбах. – М. : Медицина, 1975. – 297 с.

68. Цитологический атлас: диагностика заболеваний молочной железы / И. П. Шабалова, Т. В. Джангирова, Н. Н. Волченко, К. К. Пугачев. – М. ; Тверь : ООО «Издательство «Триада», 2005.

69. Чехун В. Ф. Современные взгляды на механизмы формирования лекарственной устойчивости опухоли / В. Ф. Чехун, Ю. В. Шишова // Онкология. – 2000. – № 1–2. – С. 11–14.

70. Щепотин И. Б. Пролактин и его антагонисты и неопластический процесс в молочной железе / И. Б. Щепотин, А. С. Зотов, Е. А. Костюченко // Новообразование. – 2007. – № 1. – С. 7–16.

71. Abramson Ji. H. WINPEPE (PEPIr for Windows): computer programs for epidemiologists / Ji. H. Abramson // *Epidemiol Perspect Innov.* – 2004. – Vol. 1, No 3. – P. 6.

72. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer / D. R. Robinson, Y.-M. Wu, P. Vats [et al.] // *Nature Genet.* – 2013. – No 45. – P. 144–1451.

73. Albani J. M. Renal pseudoaneurysm after partial nephrectomy: three case reports and a literature review / J. M. Albani, A. C. Novick // *Urology.* – 2003. – Vol. 62. – P. 227–231.

74. Alleles and haplotypes of the estrogen receptor alpha gene are associated with an increased risk of spontaneous abortion / B. Pineda, C. Hermenegildo, J. J. Tarín [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. – No 93. – P. 1809–1815.

75. Analysing genetic information with DNA arrays / S. C. Case-Green, K. U. Mir, C. E. Prithard [et al.] // *Current Opinion in Chemical Biology.* – 1998. – Vol. 2. – P. 404–410.

76. Analysis of the ERalpha germline PvuII marker in breast cancer risk / R. González-Mancha, J. J. Gala'n, C. Crespo [et al.] // *Med. Sci. Monit.* – 2008. – No 14 (3). – CR136–CR143.

77. Apocrine Cyst of the Breast / E. Celis Julio, P. Gronov, M. A. Moreira Jose, T. Cabezone // *Molecular & Cellular Proteomics.* – 2006. – No 5. – P. 462–483.

78. Are Solitary Breast Papillomas Entirely Begin? / Haim Gutman, Jacob Schachter, Nir Wesserberg, Itzhak Shechtman // *Arch. Surg.* – 2003. – Vol. 138. – P. 1330–1333.

79. Argirova R. Sexually transmitted diseases in adolescence – how to make the difference in their acquisition and consequence / R. Argirova // *Abstracts 12th European congress of paediatric and adolescent gynaecology, Plovdiv, Bulgaria, May 25–28, 2011.* – P. 45–46.

80. Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia / A. Molvarec, A. Ve´r, A. Fekete [et al.] // *Hypertens Res.* – 2007. – No 30. – P. 205–211.

81. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with left ventricular mass and wall thickness in women / I. Peter, A. M. Shearman, R. S. Vasan [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 2005. – No 18. – P. 1388–1395.

82. Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with sporadic Alzheimer’s disease / M. L. Brandi, L. Becherini, L. Gennari [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – No 265. – P. 335–338.

83. Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with osteoporosis in the Mexican population / R. Gomez, J. J. Magana, B. Cisneros [et al.] // *Clin. Genet.* – 2007. – No 72. – P. 574–581.

84. Association of the estrogen receptor-alpha genopolymorphisms with venous thrombosis / F. Lussana, E. M. Faioni, C. Mavilia [et al.] // *Haematologica.* – 2006. – No 91. – P. 279–280.

85. Aupperlee M. D. Differential hormonal regulation and function of progesterone receptor isoforms in normal adult mouse mammary gland / M. D. Aupperlee, S. Z. Haslam // *Endocrinology.* – 2007. – Vol. 148, No 5. – P. 2290–2300.

86. Bai Z. Breast Cancer, Estrogen Receptor and Ligands / Z. Bai, R. Gust // *Arch. Pharm. (Weinheim).* – 2009. – No 342 (3). – P. 133–149.

87. Beatson G. T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases / G. T. Beatson // *Lancet.* – 1896. – No 2. – P. 104–107.

88. Breast Cancer Screening with Imaging: Recommendations From the Society of Breast Imaging and the ACR on the Use of Mammography, Breast MRI, Breast Ultrasound, and Other Technologies for the Detection of Clinically Occult Breast Cancer / C. H. Lee, D. D. Dershaw, D. Kopans [et al.] // *J. Am. Coll. Radiol.* – 2010. – No 7. – P. 18–27.

89. Breast US in children and adolescents / C. J. Garcia, A. Espinoza, V. Dinamarca [et al.] // *Radiographics*. – 2000. – Vol. 20 (6). – P. 1605–1612.

90. Cancer risk prediction models: a workshop on development, evaluation, and application / A. N. Freedman, D. Seminara, M. H. Gail [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2005. – Vol. 97. – P. 715–723.

91. Chang H. L. Breast hamartomas in adolescent females / H. L. Chang, M. F. Lerwill, A. M. Goldstein // *Breast J.* – 2009. – Vol. 15 (5). – P. 515–520.

92. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary / G. G. Kuiper, E. Enmark, M. Peltö-Huikko [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – No 93. – P. 5925–5930.

93. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer / Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer // *Lancet*. – 1997. – Vol. 350. – P. 1047–1059.

94. 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.

95. Delayed puberty and estrogen resistance in a woman with estrogen receptor alpha variant / S. D. Quaynor, E. W. Stradtman, H.-G. Jr. Kim [et al.] // *New Eng. J. Med.* – 2013. – No 369. – P. 164–171.

96. Deroo B. J. Estrogen receptors and human disease / B. J. Deroo, K. S. Korach // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116, No 3. – P. 561–570.

97. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites / K. Paech, P. Webb, G. G. Kuiper [et al.] // *Science*. – 1997. – No 277 (5331). – P. 1508–1510.

98. Dumitrescu R. G. Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005 / R. G. Dumitrescu, I. Cotarla // *J. Cell. Mol. Med.* – 2005. – Vol. 9. – P. 208–221.

99. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials // *Lancet*. – 1998. – Vol. 351. – P. 1451–1467.

100. Effects of pre- and postmenopausal use of exogenous hormones on receptor content in normal human breast tissue: a randomized study / G. Hallberg, I. Persson, T. Naessen [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 24. – P. 475–480.

101. Endogenous hormones and breast cancer collaborative group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies / T. Key, P. Appleby, I. Barnes, G. Reeves // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2002. – No 94 (8). – P. 606–616.

102. Epidemiologic factors // *Diseases of the Breast* / J. R. Harris, M. E. Lippman, M. Morrow [et al.]. – 3<sup>rd</sup> eds. – Philadelphia, PA : Lippincott Williams & Wilkins, 2004. – P. 260–264.

103. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer / W. Toy, Y. Shen, H. Won [et al.] // *Nature Genet.* – 2013. – No 45. – P. 1439–1445.

104. Estrogen receptor  $\alpha$  gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts / A. M. Shearman, J. A. Cooper, P. J. Kotwinski [et al.] // *Circulation Res.* – 2006. – No 98. – P. 590–592.

105. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer / F. Holst, P. R. Stahl, C. Ruiz [et al.]. – Department of Pathology, University Medical Center Hamburg Eppendorf, D-20246. – Hamburg, Germany, 2007, May. – No 39 (5). – P. 655–660. – ePub. 2007. – Apr. 8.

106. Estrogen receptor alpha gene polymorphism and endometrial cancer risk—a case-control study / S. Wedreń, L. Lovmar, K. Humphreys [et al.] // *BMC Cancer*. – 2008. – No 8. – P. 322.

107. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk / A. Shin, D. Kang, H. Nishio [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2003. – No 80 (1). – P. 127–131.

108. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction / S. C. Schuit, H. H. Oei, J. C. Witteman [et al.] // *JAMA.* – 2004. – No 291. – P. 2969–2977.

109. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women / J. Wang, R. Higuchi, F. Modugno [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2007, Dec. – No 106 (2). – P. 273–280. – ePub. 2007, Feb. 1.

110. Estrogen receptor alpha polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk / A. M. González-Zuloeta Ladd, A. A. Va'squez, F. Rivadeneira [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2008, Feb. – No 107 (3). – P. 415–419. – ePub. 2007. – Apr. 24.

111. Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk / S. A. Khan, M. A. Rogers, K. K. Khurana [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1998. – No 90 (1). – P. 37–42.

112. Estrogen receptor-alpha polymorphisms and angiographic outcome after coronary artery stenting / V. Ferrero, F. Ribichini, G. Matullo [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* – 2003. – No 23. – P. 2223–2228.

113. Estrogen receptor-alpha, bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: association with nodule size, hormonal and reproductive features / R. Cericatto, A. Pozzobon, D. M. Morsch [et al.] // *Steroids.* – 2005. – Vol. 70, No 3. – P. 153–160.

114. Feasibility and tolerability of sequential doxorubicin/paclitaxel followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and its effects on tumor response as preoperative therapy / L. Gianni, J. Baselga, W. Eiermann [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – No 11 (24), Part 1. – P. 8715–8721.

115. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai breast cancer study / Q. Cai, X. O. Shu,



F. Jin [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2003. – No 12 (9). – P. 853–859.

116. Genetic polymorphisms of ESR1 and ESR2 that may influence estrogen activity and the risk of hypospadias / S. Ban, F. Sata, N. Kurahashi [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – No 23. – P. 1466–1471.

117. Genetic rescue of nonclassical ER-alpha signaling normalizes energy balance in obese Er-alpha-null mutant mice / C. J. Park, Z. Zhao, C. Glidewell-Kenney [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2011. – No 121. – P. 604–612.

118. Genomic Imprinting: Implication for Human Disease / J. G. Falls, D. J. Pulford, A. A. Wylie [et al.] // *Amer. J. Path.* – Vol. 154, No 3. – P. 635–647.

119. Guideline implementation for breast healthcare in low- and middleincomecountries: early detection resource allocation // *Cancer.* – 2008. – Vol. 113. – P. 2244–2256.

120. Gumenyuk O. I. Condition and protection of the reproductive health of adolescent girls as a basis of the preconception health care / O. I. Gumenyuk, Yu. V. Chernenkov // *Program and Abstract of 1st European Congress «Preconception Care and Preconception Health».* – 2010. – P. 38–39.

121. Gumenyuk O. I. Epidemiology of menstrual disorders and diseases of mammary glands in adolescent girls / O. I. Gumenyuk, Yu. V. Chernenkov // *Endocrine Journal.* – 2010. – Vol. 57 (2). – P. 608–609.

122. Gumenyuk O. I. Epidemiology of reproductive disorders and their risk factors in adolescent girls / O. I. Gumenyuk, Yu. V. Chernenkov // *Hormone Research.* – 2010. – Vol. 74 (3). – P. 276–277.

123. Harper A. P. *Ultrasound mammography* / A. P. Harper. – Baltimor : University Park Press, 1985. – 38 p.

124. Henderson B. E. *Hormonal carcinogenesis* / B. E. Henderson, H. S. Feigelson // *Carcinogenesis.* – 2000. – No 21. – P. 427–433.

125. Hormonal therapies for early breast cancer: systematic review and economic evaluation / D. Hind, S. Ward, N. E. De [et al.] // *Health Technol. Assess.* – 2007. – No 11 (26). – P. 1.

126. Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. / S. Green, P. Walter, V. Kumar [et al.] // *Nature*. – 1986. – No 320 (6058). – P. 134–139.

127. Impact on bone of an estrogen receptor-alpha gene loss of function mutation / E. P. Smith, B. Specker, B. E. Bachrach [et al.] // *J. Clin. Endocr. Metab.* – 2008. – No 93. – P. 3088–3096.

128. Joint effects of the CYP1A1 MspI, ERalpha PvuII, and ERalpha XbaI polymorphisms on the risk of breast cancer: results from a populationbased case-control study in Shanghai, China / Y. Shen, D. K. Li, J. Wu [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2006. – No 15 (2). – P. 342–347.

129. Ki67 index in breast cancer: correlation with other prognostic markers and potential in pakistani patients / S. Haroon, A. A. Hashmi, A. Khurshid [et al.] // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2013. – Vol. 14, No 7. – P. 4353–4358.

130. Kulendran M. Oestrogen-synthesising enzymes and breast cancer / M. Kulendran, M. Salhab, K. Mokbel // *Anticancer Res.* – 2009. – No 29 (4). – P. 1095–1109.

131. Larissa P. Alcazar. Estrogen Receptor Polymorphism and Its Relationship to Pathological Process / Larissa P. Alcazar, Pricila A. Arakaki, Alexandre Godoy-Santos // *The American journal of the Medical Sciences*. – 2010, August. – Vol. 340, No 2. – P. 20–28.

132. Lenihan D. J. Multidisciplinary strategy for managing cardiovascular risks when treating patients with early breast cancer / D. J. Lenihan, F. J. Esteva // *Oncologist*. – 2008. – No 13 (12). – P. 1224–1234.

133. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma / W. D. Dupont, D. L. Page, F. F. Pari [et al.] // *N. J. Med.* – 1994. – Vol. 331. – P. 1259–1264.

134. Mammary duct ectasia in children presenting bloody nipple discharge: a case in a pubertal girl / S. Kitahara, M. Wakabayashi, T. Shiba [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2001. – Vol. 36 (6). – P. E2.

135. Mammary glands dysplasia in adolescent girls / O. I. Gumenyuk, Yu. V. Chernenkov, A. S. Eyberman [et al.] // Abstracts 12th European congress of paediatric and adolescent gynaecology, Plovdiv, Bulgaria, May 25–28. – 2011. – P. 73–74.

136. Management of complex breast cyst / L. A. Venta, J. P. Kim, C. E. Pelloski [et al.] // *Am. J. Roentgenol.* – 1999. – Vol. 173. – P. 1331–1336.

137. Mansfield J. F. Precocious puberty / J. F. Mansfield // *Pediatric and Adolescent Gynecology.* – Philadelphia, Pa : Lippincott-Raven, 1998. – P. 141–162.

138. Mastitis nonpuerperalis after nipple piercing: time to act / V. R. Jacobs, K. Golombeck, W. Jonat [et al.] // *Int. J. Fertil Womens Med.* – 2003. – Vol. 48 (5). – P. 226–231.

139. McCormack V. A. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis / V. A. McCormack, Silva I. dos Santos // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2006. – No 15. – P. 1159–1169.

140. Mediana D. Biological and molecular characteristic of the premalignant mous mammary gland / D. Mediana // *BBA.* – 2002. – Vol. 1603. – P. 1–9.

141. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures / P. Wirapati, C. Sotiriou, S. Kunkel [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2008. – No 10 (4). – R65.

142. Millis R. R. Microglandular adenosis of the breast / R. R. Millis, V. Eusebi // *Adv. Anat. Pathol.* – 1995. – No 2. – P. 10–18.

143. Mohammed R. H., Lakatua D. J., Haus E. [et al.] // *Cancer.* – 1986. – Vol. 58, Issue 5. – P. 1076–1081.

144. Moinfar F. *Essentials of Diagnostic Breast Pathology* / F. Moinfar // Springer. – 2007. – Vol. 1. – P. 193.

145. Molecular Cytogenetic Comparison of Apocrine hyperplasia and Apocrine Carcinoma of the Breast / Chris Jones, Stefania Damiani, Dagan Wells [et al.] // *American Journal of Pathology.* – 2001. – Vol. 158. – P. 207–214.

146. Mosselman S. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor / S. Mosselman, J. Polman, R. Dijkema // FEBS Lett. – 1996. – No 392 (1). – P. 49–53.

147. MR imaging of Diabetic Mastopathy / Sakuhara Yusuke, Shinosaki Takeshi, Hosumi Yasuo [et al.] // A. J. R. – 2002. – Vol. 179. – P. 1201–1203.

148. Narod S. A. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond / S. A. Narod, W. D. Foulkes // Nature reviews. Cancer. – 2004. – Vol. 4. – P. 665–672.

149. Neinstein L. S. Prevalence and longitudinal study of breast masses in adolescents / L. S. Neinstein, J. Atkinson, M. Diament // J. Adolesc. Health. – 1993. – Vol. 14 (4). – P. 277–281.

150. Nonpuerperal mastitis in adolescents / T. Stricker, F. Navratil, I. Forster [et al.] // J. Pediatr. – 2006. – Vol. 148 (2). – P. 278–281.

151. Oestrogen receptor {alpha} gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus / M. Johansson, L. Arlestig, B. Moller [et al.] // Arm. Rheum. Dis. – 2005. – Vol. 64, No 11. – P. 1611–1617.

152. Oestrogen receptor alpha gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study / S. Wedre´n, L. Lovmar, K. Humphreys [et al.] // Breast Cancer Res. – 2004. – No 6 (4). – R437–R449. – ePub. 2004, June 4.

153. Pagets disease in an adolescent arising in a supernumerary nipple / V. G. Martin, E. V. Pellettiere, D. Gress [et al.] // Cutan. Pathol. – 1994. – Vol. 21 (3). – P. 283–286.

154. Parker S. J. Phyllodes tumors / S. J. Parker, S. A. Harries // Postgrad Med. J. – 2001. – Vol. 77. – P. 428–435.

155. Patent JP2012034633A1. Method for determining estrogen-related disease / Inventors: Mizukami, Yoichi; Applicant: Yamaguchi univ; Priority Number: EP20070121810 ; Publication date: February 23, 2012.

156. Patent WO2009068409A1. A method to assess prognosis and to predict therapeutic response to endocrine treatment / Wirtz, R., Hennig, G., Von Toerne ; Siemens Healthcare Diagnostics, Ralph Wirtz, Guido Hennig, Toerne Christian Von. – Priority Number : PCT/EP2008/064763 ; Publication date : June 4, 2009.

157. Pinder S. E. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)-current definition and classification / S. E. Pinder, I. O. Ellis // *Breast Cancer Res.* – 2003. – No 5. – P. 254–257.

158. Pneumothorax: A complication of fine needle aspiration of breast tumors / Z. Kaufman, B. Scpitz, M. Shapiro [et al.] // *Acta. Cytol.* – 1994. – Vol. 38, No 5. – P. 53.

159. Polymorphisms in estrogen-metabolizing and estrogen receptor genes and the risk of developing breast cancer among a cohort of women with benign breast disease / L. Gallicchio, S. L. Berndt, M. A. McSorley [et al.] // *BMC Cancer.* – 2006. – Vol. 29, No 6. – P. 173–184.

160. Polymorphisms of the estrogen receptor alpha (ESR1) gene and the risk of Alzheimer's disease in a southern Chinese community / S. L. Ma, N. L. Tang, C. W. Tam [et al.] // *Int. Psychogeriatr.* – 2009. – No 21. – P. 977–986.

161. Positive association between an estrogen receptor gene polymorphism and Parkinson's disease with dementia / K. Isoe-Wada, M. Maeda, J. Yong [et al.] // *Eur. J. Neurol.* – 1999. – No 6. – P. 431–435.

162. Possible linkage of the estrogen receptor gene to breast cancer in a family with late-onset disease / P. Zuppan, J. M. Hall, M. K. Lee [et al.] // *Am J. Hum Genet.* – 1991. – No 48 (6). – P. 1065–1068.

163. Prevention of breast cancer with tamoxifen: Preliminary findings from the Italian randomized trial among hysterectomised women / U. Veronesi, P. Maisonneuve, A. Costa [et al.] // *Lancet.* – 1998. – Vol. 362. – P. 93–97.

164. Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue and fibroadenomas / G. Branchini, L. Schneider, R. Cericatto [et al.] // *Endocrine.* – 2009. – Vol. 35, No 3. – P. 459–466.

165. Progesterone Withdrawal Promotes Remodeling Processes in the Nonpregnant Mouse Cervix / S. M. Yellon, A. E. Burns, J. L. See [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2009. – P. 1–6.

166. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis / D. C. Allred, J. M. Harvey, M. Berardo, G. M. Clark // *Modern Pathology*. – 1998. – Vol. 11, No 2. – P. 155–168.

167. Rajan P. B. Cystosarcoma phyllodes in adolescent girls and young women: a study of 45 patients / P. B. Rajan, M. L. Cranor, P. P. Rosen // *Amer. J. Surg. Pathol.* – 1998. – Vol. 22 (1). – P. 64–69.

168. Reply to 'ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?' (Letter) / F. Holst, P. Stahl, O. Hellwinkel [et al.] // *Nature Genet.* – 2008. – No 40. – P. 810–812.

169. Risk of prostate, breast and colorectal cancer after skin cancer diagnosis / F. Levi, L. Randimbison, V. Te, C. La Vecchia // *Int. J. Cancer*. – 1994. – Vol. 57. – P. 681–683.

170. Selim A. G. Immunohistochemical localization of androgen receptor in apocrine metaplasia and apocrine adenosis of the breast: relation to oestrogen and progesterone receptors / A. G. Selim, C. A. Wells // *Journal of clinical pathology*. – 1999. – Vol. 52. – P. 838–841.

171. Sensitivity of BRCA1/2 mutation testing in 446 breast/ovarian cancer families / D. G. R. Evans, M. Bulman, K. Young [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2003. – Vol. 40. – P. 107–109.

172. Stromal fibrosis of the breast / M. Sklair-Levy, T. H. Samuels, C. Catzavelos [et al.] // *Am. J. Roengenol.* – 2001. – Vol. 177. – P. 573–577.

173. Tamoxifen for prevention of breast cancer. Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study / B. Fisher, J. P. Constantino, D. L. Wickerham [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1998. – No 90. – P. 1371–1388.

174. Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention / W. Yueet [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – No 11. – 925s-930s.

175. T-cell metagene predicts a favourable prognosis in estrogen receptor negative and HER2 positive breast cancers / A. Rody, U. Holtrich, L. Pusztai [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2009. – No 11 (2). – R15.

176. The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk (The Netherlands) / N. C. Onland-Moret, C. H. van Gils, M. Roest [et al.] // *Cancer Causes Control*. – 2005. – No 16 (10). – P. 1195–1202.

177. The protective association of high plasma enterolactone with breast cancer is reasonably robust in women with polymorphisms in the estrogen receptor alpha and beta genes / E. Sonestedt, M. I. Ivarsson, S. Harlid [et al.] // *J. Nut.* – 2009, May. – Vol. 139 (5), No 993–1001. – ePub. 2009, Mar. 25.

178. The Royal Marsden Hospital pilot tamoxifen chemoprevention trial / T. J. Powels, A. L. Jones, S. A. Ashley [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 1994. – Vol. 31. – P. 73–82.

179. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B / P. Kastner, A. Krust, B. Turcotte [et al.] // *EMBO J.* – 1990. – Vol. 9, No 5. – P. 1603–1614.

180. Tyrer J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors / J. Tyrer, S. W. Duffy, J. Cuzick // *Stat. Med.* – 2004. – No 23. – P. 1111–1130.

181. Umekita Y. / Y. Umekita, H. Yoshida // *Virchows Arch.* – 1998. – Vol. 433. – P. 311–314.

182. Underestimation of atypical Ductal Hyperplasia at MRI-Guided 9-Gauge Vacuum-Assisted Breast Biopsy / Laura Liberman, Agnes E. Holland, Marjan Domogoj [et al.] // *A. J. R.* – 2007. – Vol. 188. – P. 684–690.

183. Variation in estrogen-related genes and cross-sectional and longitudinal blood pressure in the Framingham Heart Study / I. Peter, A. M. Shearman, D. R. Zucker [et al.] // *J. Hypertens.* – 2005. – No 2. – P. 2193–200.

184. Weighing the risk and benefits of tamoxifen treatment for preventing breast cancer / M. N. Gail, J. P. Constantino, J. Bryant [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1999. – Vol. 91. – P. 1829–1846.