

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ
І РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО

ПАЛІЙЧУК ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК: 616 – 006.04:618.14:576.3

**КЛІНІКО-ГЕНЕТИЧНІ КРИТЕРІЇ ОПТИМІЗАЦІЇ ДІАГНОСТИКИ ПУХЛИН
ОРГАНІВ ЖІНОЧОЇ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ У ХВОРИХ З
АГРЕГАЦІЄЮ ЗЛОЯКІСНОЇ ПАТОЛОГІЇ**

14.01.07 – онкологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Київ-2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Науковий консультант

- академік НАН України,
доктор медичних наук, професор
Чехун Василь Федорович,
завідувач відділу моніторингу пухлинного
процесу та дизайну терапії
Інституту експериментальної патології, онкології і
радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Офіційні опоненти:

- доктор медичних наук, професор
Володько Наталія Антонівна,
професор кафедри онкології і радіології
Львівського національного медичного університету
ім. Данила Галицького МОЗ України;
- доктор медичних наук, професор
Смоланка Іван Іванович,
завідувач науково-дослідного відділення пухлин
грудної залози та її реконструктивної хірургії
Національний інститут раку МОЗ України;
- доктор медичних наук, професор
Клименко Сергій Вікторович,
завідувач кафедри клінічної лабораторної
діагностики Національного університету
охорони здоров'я ім. П.Л. Шупика.

Захист відбудеться « 07 » липня 2021 р. о 13.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитись на веб-сайті в мережах Інтернет за адресою <http://iepor.org.ua> та в науковій бібліотеці ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий « 05 » червня 2021 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Л.М. Шлапацька

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Рак органів жіночої репродуктивної системи (ОЖРС), зокрема молочної залози та яєчника, є однією з найбільш актуальних проблем онкології, що зумовлено зростанням захворюваності на ці форми раку жінок різного віку, в т.ч. осіб репродуктивного періоду, як в Україні [Федоренко З. П. та співавт., Бюлетень Національного канцер-реєстру України, 2020], так і в країнах ЄС та світу [ReportLinker Reviews, 2020, 2021]. Відомо, що більшість злоякісних новоутворень ОЖРС мають багатофакторну природу, що зумовлено впливом як генетичних, так і ендо- та екзогенних факторів, які в значній мірі модулюють варіабельність клінічного перебігу пухлинного процесу, особливо при раку молочної залози (РМЗ) (Налескіна Л. А., Лук'янова Н. Ю., Чехун В. Ф., 2017). На сьогодні встановлено, що рак яєчника (РЯ) та РМЗ часто виникає при агрегації злоякісних пухлин у родовах з різним типом успадкування [Worg A., Ngeow J., 2015; Neben C.L. et al., 2019]. Клінічними дослідженнями продемонстровано, що підвищений ризик розвитку раку у членів родин з агрегацією пухлинної патології існує, але питання відносно того, які саме генетичні фактори чи їх комплекс сприяють розвитку неоплазій у родичів пробанда, залишається не визначеним. Тому пріоритетним напрямком сучасної онкології є пошук молекулярних маркерів, застосування яких сприяло б визначенню осіб з високим ризиком малігнізації існуючих у них новоутворень різного генезу. Знання таких маркерів має слугувати підґрунтям для їх використання при розробці клінічних протоколів обстеження членів родин із накопиченням онкологічної патології в сім'ях.

Роль спадкових факторів у схильності до розвитку раку доведена клініко-генеалогічними дослідженнями, проведеними в Україні, Німеччині, Іспанії, Швеції та інших країнах [Володько Н. А., 2018; Кіцера Н. І., Гельнер Н. В., 2019; Mahdavi M, et al., 2010, 2019; Meindl A, Ditsch N, Kast K, et al., 2015; Segerer R, et al., 2020, Trandafir PC, et al., 2020]. Результати клініко-генеалогічних досліджень, проведених в ІЄПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України, свідчать про агрегацію пухлинної патології у сім'ях хворих на рак різного генезу. Зокрема при раку ендометрію (РЕ) визначено накопичення пухлин по типу синдрому Лінча II [Ганіна К. П., Налескіна Л. А. та співавт., 1995; Поліщук Л. З., 2010; Бучинська Л. Г., 2012].

Про безперечну роль генетичних змін при пухлинному рості свідчать нові здобутки молекулярної біології. Одним з таких досягнень у вивченні спадкових форм РЯ і РМЗ стало відкриття та дослідження генів-супресорів пухлинного росту *BRCA1* і *BRCA2*, гермінальні мутації яких обумовлюють спадкову схильність до виникнення цих пухлин. Доведено, що у носіїв таких мутацій вірогідність розвитку РМЗ та РЯ більш висока і досягає 70% [Balmaña J, et al., 2017; Любченко Л. Н. та співавт., 2017, 2018; Vasilieiou G, et al., 2020; Seiffert K, et al., 2021; Bick U, 2021]. Встановлено популяційні особливості наявності цих мутацій. Наприклад, делеція двох нуклеотидів в екзоні *BRCA1* (*185delAG*) є мажорною мутацією в популяції євреїв-ашкеназі. У той же час у здорових жінок Великобританії ця мутація діагностується лише у 3% випадків. Крім вказаних, у них були виявлені також мутації *5382insC*, *2080delA*, *4154delA* у гені *BRCA1* [Brunei, Spillmanetal, 2018], тобто спостерігається різниця послідовностей ДНК розміром в один нуклеотид (А,

T, G або C) [Bowcock, Dean et al., 2014; Burghaus S et al., 2017; Michelle Rath et al., 2019].

Сучасний розвиток клінічної онкології пов'язаний з пошуком молекулярно-біологічних маркерів, які мають як діагностичне, так і прогностичне значення і у перспективі можуть бути використані у практичній роботі клінічних онкологів. Національними клінічними протоколами України вже передбачено визначення мутацій в генах *BRCA1* та *BRCA2* у жінок, хворих на РМЗ. Як показав ряд досліджень, виникнення злоякісних та доброякісних новоутворень матки та молочної залози у членів родини у декількох поколіннях може бути пов'язано також з одонуклеотидними перебудовами (Single nucleotide polymorphism - SNP) за іншими генами [Горовенко Н. Г., Россоха З. І. та співавт., 2017; Chao-Qun Wang et al., 2019; Zhi-Qin Liu et al., 2020].

Враховуючи той факт, що порушення гормонального гомеостазу є ключовим фактором патогенезу таких гормонозалежних пухлин, як РМЗ та РЯ, невідкладним і, безумовно, актуальним стає також вивчення SNP генів рецептору естрогену-альфа *ESR1* (*T397C*, *A351G*) та ферменту першої фази детоксикації ксеноботиків *CYP2D6*4* (*G1846A*), які мають прогностичне значення [J. Giasomazzi та співавт., 2015, 2016; Takashi T et al., 2019; Guilherme P et al., 2019] і асоціюються з мамографічною щільністю молочних залоз у здорових жінок. Така асоціація пов'язана із високою експресією естрогенових рецепторів в молочній залозі у здорових жінок-носіїв С-алелю (генотип *397TC* та генотип *397CC*). [Doherty J. A., Rossing M. A., Cushing-Haugen K. L. et al., 2010; Zheqi Li et al., 2021].

Таким чином, вивчення ролі генетичних факторів у розвитку злоякісних пухлин ОЖРС, розробка методів генетичного скринінгу, ранньої діагностики онкологічної патології у родинах із агрегацією злоякісних пухлин в родовах і методичних основ впровадження онкогенетичного консультування у сім'ях з агрегацією онкопатології є однією з найбільш актуальних проблем онкології. Перспективність такого напрямку дослідження обумовлена можливістю виявлення РМЗ та РЯ на етапі доклінічної маніфестації пухлинного процесу. На підставі одержаних результатів виникає потреба в медико-генетичному консультуванні і молекулярно-генетичного тестування жінок як ключової складової діагностичної і профілактичної програми обстеження членів родини з обтяженим онкологічним анамнезом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України за темами: «Молекулярна епідеміологія металовмісних білків у взаємовідносинах пухлини та організму» (2012-2016 рр.; № державної реєстрації 0112U002197), «Проаналізувати дані клініко-генеалогічного консультування жінок Черкаського регіону. Розробити рекомендації по профілактиці та лікуванню виявлених захворювань» (2016 р. шифр теми V-8-2016), «Дослідити особливості гормонально-рецепторного статусу та елементів мікрооточення для оцінки агресивності пухлинного процесу» (№ держреєстрації 0113U008329, 2014-2016 рр.), «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та

варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин” (№ держреєстрації 0117U002034, 2017-2021pp.).

Мета дослідження. Ідентифікувати клініко-генетичні критерії схильності до розвитку новоутворень шляхом визначення частоти мутацій *BRCA1* та *BRCA2* та особливостей поліморфних варіантів деяких генів на рівні пухлини та організму у жінок, хворих на рак молочної залози та рак яєчника, із ускладненою сімейною історією, для оптимізації скринінгу та діагностики новоутворень органів жіночої репродуктивної системи.

Задачі дослідження:

1. Провести комплексне клініко-генеалогічне обстеження хворих на рак ОЖРС, визначити частоту агрегації онкологічної патології, типи асоціації злоякісних пухлин у родовах.
2. Визначити клінічні ознаки маніфестації пухлинних процесів у хворих на РМЗ та РЯ з агрегацією злоякісних новоутворень в родовах та без обтяженої на рак історії родини.
3. Дослідити клініко-генеалогічні особливості первинно-множинних пухлин та їх молекулярно-генетичну характеристику, залежно від агрегації пухлинної патології в родовах.
4. Визначити частоту та характер мутацій генів *BRCA1/2* у периферичній крові та пухлинах жінок із доброякісною патологією ОЖРС, РМЗ, РЯ і первинно-множинними пухлинами та представити клінічну і молекулярно-генетичну характеристику пухлинного процесу.
5. Дослідити поліморфізм олігонуклеотидні поліморфні варіанти генів рецептора естрогену-альфа *ESR1* та ферменту першої фази детоксикації ксенобіотиків *CYP2D6*4* у периферичній крові та пухлинах хворих з доброякісною патологією ОЖРС, РМЗ, РЯ та первинно-множинними пухлинами.
6. Ідентифікувати молекулярно-генетичні критерії, які ляжуть в основу розробки моделі для прогнозування схильності до виникнення доброякісної патології ОЖРС, РЯ та РМЗ, і оцінити ризик розвитку цієї патології.
7. Проаналізувати ефективність застосування розробленої прогностичної моделі міжгенної взаємодії ризику прогресування перебігу пухлинного процесу у хворих на РМЗ та РЯ.

Об'єкт дослідження: анкети-опитувальники, родоводи, периферична кров та пухлини хворих на доброякісну патологію ОЖРС та РМЗ і РЯ.

Предмет дослідження: визначення прогностичних клініко-генетичних критеріїв оптимізації діагностики та прогностичних моделей міжгенної взаємодії оцінки ризику виникнення доброякісних пухлин ОЖРС, РМЗ та РЯ у жінок із родин з агрегацією злоякісної патології.

Методи дослідження: загальноклінічні; клініко-генеалогічний для виявлення серед родичів пробандів із сімейним обтяженням на онкологічну патологію анамнезом хворих на доброякісні пухлини ОЖРС, РМЗ та РЯ; цитологічний; гістологічний; імуногістохімічний з визначенням експресії маркера проліферативної активності пухлин (Ki-67), рецепторів естрогенів (ER), прогестерону (PR),

епідермального фактора росту (HER2/neu), протеїн-регулятора клітинного циклу, онкосупресора (p53), білка регулятора апоптозу (bcl-2); молекулярної біології (виділення ДНК, якісна алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція мультіплексна з ПЛР рестрикційним аналізом) для дослідження SNP генів *CYP2D6*4* (*G1846A*), *ESR1*(*T397C*, *A351G*) та мутацій в генах *BRCA1/2* - *BRCA1 185delAG*, *BRCA1 5382insC* та *BRCA2 6174delT*); генетико-математичні (сегрегаційний аналіз, відносний ризик); статистичні (розрахунок середніх величин, похибки та медіани). Багатофакторний, кореляційний, регресійний аналіз частот генотипів проводився за допомогою критеріїв Пірсона χ^2 та розрахунку показника співвідношення шансів (odds ratio, OR з довірчим інтервалом 95% confidence interval, CI, виживаність хворих за Kaplan-Meier з використанням F-критерію Кокса); генетико-математичний та технологія програмування прогностичних моделей міжгенної взаємодії – за допомогою біоінформатичного методу MDR (Multifactor Dimensionality Reduction - MDR_2.0 з використанням відповідного програмного забезпечення: MDR).

Наукова новизна отриманих результатів.

На підставі комплексного клініко-генеалогічного та молекулярно-генетичного дослідження в дисертаційній роботі вперше ідентифіковано прогностичні фактори, асоційовані із схильністю до розвитку РМЗ та РЯ у жінок з родин із агрегацією злоякісних новоутворень (ЗН).

Вперше визначено популяційні особливості комбінації мутацій в генах *BRCA1/2* - *BRCA1 185delAG*, *BRCA1 5382insC* та *BRCA2 6174delT* і поліморфних варіантів генів *CYP2D6*4* (*G1846A*), *ESR1*(*T397C*, *A351G*), що розширило існуючі знання про молекулярно-генетичні характеристики доброякісних пухлин ОЖРС, РМЗ та РЯ у жінок із ускладненим спадковим онкоанамнезом.

На підставі комплексного клініко-генеалогічного та молекулярно-генетичного дослідження хворих із доброякісними та злоякісними пухлинами ОЖРС, які були мешканцями Черкаського регіону, вперше охарактеризовано поліморфні варіанти генів *CYP2D6*4* (*G1846A*) та *ESR1*(*T397C*, *A351G*), що асоціюються з агрегацією злоякісних пухлин у родовах хворих.

Вперше розроблено прогностичні моделі міжгенної взаємодії, які дозволяють передбачити ризик виникнення доброякісної патології ОЖРС, РМЗ та РЯ в умовно здорових членів родин із спадково ускладненою сімейною історією раку. Найбільш ефективною прогностичною моделлю міжгенної взаємодії оцінки ризику виникнення доброякісної патології ОЖРС визначена 2** модель, яка враховує варіанти генів *T397C ESR1/Cyp2D6*4*. Для злоякісних пухлин ОЖРС найбільш достовірними виявились 1** (*T397C ESR1*) та 2** моделі (*BRCA1 5382insC/T397C ESR1*).

Визначені прогностичні моделі міжгенної взаємодії дозволяють оптимізувати діагностику доброякісних пухлин ОЖРС, РМЗ та РЯ і асоціюються з 5-ти річною виживаністю хворих.

Ідентифіковано оптимальну прогностичну модель міжгенної взаємодії для прогнозування перебігу пухлинного процесу РМЗ/РЯ, а саме дволокусну модель 2** (*BRCA1 5382insC/T397C ESR1*), що включала мутацію в гені *BRCA1 5382insC* та

поліморфний варіант *T397C* гену *ESR1*, які у більшості випадків спричинили появу пухлинної прогресії.

Аналіз 5-річної виживаності засвідчив ефективність моделі 2** (*BRCA1 5382insC/T397C ESR1*) для оцінки ризику рецидивного перебігу пухлинного процесу у хворих на РЯ, з якою асоціюються 27,3% випадків прогресування захворювання. У хворих на РМЗ показник 5-річної виживаності становив 84,8% і був асоційований з моделлю міжгенної взаємодії 3** (*T397C/A351G ESR1/Cyp2D6*4 G1846A*).

Практичне значення одержаних результатів.

Одержаними результатами обґрунтовано доцільність інтегрального підходу при обстеженні хворих на доброякісні та злоякісні пухлини ОЖРС, який поряд з клінічними, клініко-генеалогічними дослідженнями включає молекулярно-генетичне визначення мутацій в генах *BRCA1/2* і поліморфних варіантів генів *ESR1* та *CYP2D6*4*, що забезпечує об'єктивне підґрунтя як для оцінки прогнозу, так і для персоналізованої корекції лікування хворих цієї категорії.

На підставі створеної панелі молекулярно-генетичних маркерів (*BRCA1/2, ESR1, Cyp2*D6*) розроблено прогностичні моделі для визначення ризику виникнення доброякісних процесів ОЖРС, РМЗ, РЯ та ПМП у членів сімей з накопиченням онкологічної патології у родовах, що характеризуються високою ефективністю та демонструють доведену в межах 65,00-71,68% валідність.

Запропоновано алгоритм обстеження умовно здорових жінок та хворих на пухлини ОЖРС із родин з ускладненим на рак анамнезом: самостійне заповнення пацієнткою під час консультативного прийому розробленої анкети-опитувальника (Інформаційний лист №208-2013), при наявності в родині пацієнтки хворих на рак проведення її медико-генетичного консультування, яке включає визначення характеру успадкування злоякісної патології в родині та виконання додаткового молекулярно-генетичного дослідження з метою виявлення генетичних критеріїв ризику виникнення пухлинного процесу.

Розроблено алгоритм роботи обласних спеціалізованих канцер-реєстрів з урахуванням спадкових форм РМЗ і РЯ та реєстрів сімей із агрегацією злоякісних пухлин в родовах.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є реалізацією творчих ідей автора. Здобувачем була розроблена програма та здійснене планування клінічних досліджень, особисто проведено збір, обробку та аналіз клінічного матеріалу, узагальнення і аналіз результатів медико-генетичного консультування пацієнток та їх молекулярно-генетичного тестування. Було удосконалено методику дообстеження осіб із обтяженим на рак спадковим анамнезом, проаналізовані результати усіх методів додаткових обстежень пацієнток із доброякісними та злоякісними пухлинами ОЖРС та жінок із групи контролю. У співавторстві розроблено прогностичні моделі міжгенної взаємодії оцінки ризику виникнення доброякісної патології та злоякісних пухлин ОЖРС та ризику виникнення рецидивного перебігу захворювання на РМЗ/РЯ. Здобувач брав участь у теоретичному обґрунтуванні, опрацюванні та практичному застосуванні усіх вказаних методик, формулював основні положення і висновки наукової розробки, а у роботах, написаних у співавторстві, реалізовані його наукові ідеї.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації оприлюднено, представлено та обговорено на: науково-практичній конференції молодих вчених, присвяченій 200-річчю від дня народження М.І. Пирогова (Харків, 2010), науково-практичній конференції з міжнародною участю “Проблеми спадкової та мультифакторної патології” (Київ, 2012р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю “Проблеми мультифакторної патології та порушень метаболізму” (Київ, 2013), Всеукраїнських науково-практичних конференціях (Дніпропетровськ, Вінниця, Київ, Яремча, 2015), міжнародному конгресі ESGO (Nice, France, 2015), Всеукраїнських науково-практичних конференціях (Буковель, Дніпропетровськ, 2016), VII Міжнародному медичному форумі «Інновації в медицині – здоров’я нації» (Київ, 2016), X з’їзді онкологів України, (Київ, 2016), міжнародній конференції “Clinical and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer” (Київ, 2016), міжнародному конгресі ESGO (Antaliya, Turkey, 2016), обласних та міських науково-практичних конференціях (Черкаси, 2017, 2018, 2019; Київ, 2018, 2019), науково-практичній конференції “Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоніфікованої терапії раку” (Київ, 2019), науково-практичній конференції “ASCO 2020: нові аспекти лікування раку яєчників” (Київ, 2020).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 38 наукових праць: 21 стаття у провідних фахових журналах, затверджених МОН України (серед яких 10 у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз) та 17 тез у збірках вітчизняних та міжнародних конгресів, з’їздів і конференцій. Отримано 2 патенти України на корисну модель, видано 1 інформаційний лист.

Обсяг та структура дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 306 сторінках комп’ютерного набору. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», семи розділів результатів власних досліджень, розділу «Узагальнення та обговорення результатів», висновків та списку використаних джерел, який налічує 392 посилання, з них 69 кирилицею. Роботу ілюстровано 36 рисунками та 67 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження базується на даних клініко-генеалогічного спостереження 1313 жінок, які були обстежені в амбулаторному медичному центрі та перебували на стаціонарному лікуванні в Комунальному неприбутковому підприємстві “Черкаський обласний онкологічний диспансер ЧОР” (КНП “ЧООД ЧОР”). Лікувальні заходи щодо хворих на доброякісні та ЗН ОЖРС включали: консервативне або хірургічне, комбіноване або комплексне, лікування в період з січня 2007 по грудень 2016 року. У результаті клініко-генеалогічного дослідження складено 1313 родоводів жінок, що мешкали не менше 25 років у Черкаському регіоні, з яких сформовані наступні групи дослідження: 210 жінок, яким було проведено молекулярно-генетичні дослідження, що включало визначення мутацій в генах *BRCA1/2* та.. поліморфних варіантів генів *CYP2D6*, *ESR1* (90 пацієнток із ЗН ОЖРС і 65 хворих на доброякісну патологію ОЖРС з родин із

агрегацією злоякісних пухлин в родоводах та 55 умовно здорових жінок без обтяження родин онкологічною патологією), 760 жінок, які звернулися в медичний центр “Андромеда-плюс” з метою профілактичного огляду у лікаря та 343 пацієнтки КНП “ЧООД ЧОР” з вперше виявленими злоякісними новоутвореннями ОЖРС. Розподіл пацієнток за діагнозом та методами обстеження представлено у табл. 1.

Таблиця 1

Зведені дані щодо кількості пацієнток і методів їх обстеження

Методи дослідження	Практично здорові жінки	Хворі на доброякісні пухлини ОЖРС	Хворі на злоякісні пухлини ОЖРС	Конт рольна група (умовно здорові)	Вперше виявлені хворі на ПМП та рак ОЖРС	Всього
Клінічні (УЗД, КТ, рентгенологічні, ендоскопічні) та цитологічні (мазки з шийки матки чи аспірати з порожнини матки)	760	65	90	55	343	1313
Морфологічні дослідження: (біопсія шийки матки, зішкребки слизової оболонки матки, операційний матеріал)	73	65	90	-	343	571
Ідентифікація молекулярного підтипу новоутворень	24	28	44	-	-	96
Клініко-генеалогічний метод	760	65	90	55	343	1313
Молекулярно-генетичний метод	-	65	90	55	-	210

Усі включені в дослідження пацієнтки були проінформовані і дали згоду на використання даних обстеження: матеріалів медико-генетичного консультування та молекулярно-генетичного тестування, клінічного та операційного матеріалу, які в наукових цілях заносилися до анкети-опитувальника. Програма досліджень була схвалена комісією з питань біоетики ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України, а також погоджена з локальним етичним комітетом із висновком про відповідність до вимог морально-етичних норм біоетики згідно з правилами ICH/GCP.

Розповсюдженість пухлинного процесу і стадію захворювання визначали за класифікаціями TNM 6 (2002 р.), 7 (2009 р.) і 8 видання (2016 р.) та FIGO (2002 р.).

Морфологічна верифікація діагнозів була проведена у всіх хворих до початку спеціального лікування на базі обласної імуногістохімічної лабораторії КНП “ЧООД ЧОР”.

Показники чисельності жіночого населення Черкаського регіону були отримані з бази даних Державної служби статистики України (<http://www.ukrstat.gov.ua>). Стандартні показники захворюваності на РМЗ та РЯ на 100 тис. жіночого населення (2007-2020 pp.) оцінювали за даними Національного канцер-реєстру (<http://www.ncru.inf.ua>). Генеалогічні відомості про обтяженість родинного анамнезу пробандів на онкологічну патологію одержували при безпосередньому опитуванні хворих на доброякісну (кісти яєчників, фіброміома матки, фіброаденома молочної залози) та злоякісну патологію ОЖРС (РЯ, РМЗ, РЕ і ПМП). Дослідження сімейного анамнезу хворих на доброякісну та злоякісну патологію ОЖРС проводили за допомогою спеціально розробленого клініко-генеалогічного опитувальника, що включав інформацію про онкологічні захворювання у родичів I та II ступеня спорідненості, умови життя пацієнтки, акушерський анамнез та супутні захворювання. На основі одержаних генеалогічних даних складали родовід, проводили його аналіз і визначали характер захворювання пробанда – без накопичення онкологічної патології у родоводі чи з агрегацією ЗН у родині. При наявності сімейної історії раку у пробанда враховували кількість хворих на рак родичів, ступінь їх спорідненості з пробандом і асоціації у родовах пухлин різної локалізації.

Графічне оформлення родоводів на основі клініко-генеалогічних даних, викладених пробандом в анкеті-опитувальнику та додатково зібраних під час медико-генетичного консультування, проводили за стандартною системою принципів і позначок. Родинний анамнез включав інформацію про стан здоров'я родичів I (мати, батько, сестри, брати, діти) та II (бабусі/дідусі, тітки/дядьки, двоюрідні сестри/брати, племінники/племінниці) ступеня спорідненості по материнській та батьківській лініям.

При ідентифікації у пацієнток наявності агрегації злоякісних пухлин в родовах та, відповідно, спадкових ризиків виникнення раку використовували наступні критерії відбору: не обтяжений – у родині окрім пробанда не спостерігали ЗН, анамнез обтяжений – наявність у родині пробанда двох або більшої кількості родичів I ступеня спорідненості або одного родича I ступеня спорідненості і двох II ступеня спорідненості із ЗН ОЖРС та КШТ, наявність двох або більше родичів з ПМП (синхронні чи метасинхронні) у родовах.

Інформацію про клінічний перебіг хвороби, стадію захворювання, ступінь диференціювання та гістологічну верифікацію пухлинного процесу, терміни виживаності хворих після лікування отримували при вивченні історій хвороб і амбулаторних карт пацієнтів.

З операційного матеріалу, крім морфологічного, проводили **імуногістохімічне дослідження (ІГХД) експресії білків** з використанням моноклональних антитіл до маркерів, пов'язаних з проліферацією клітин, Ki-67 (клон MIB-1) та p53 (клон DO-7), експресії рецепторів естрогену (ER) та прогестерону (PR) - ER α (клон 1D5) та PR (клон PgR636), епідермального фактора росту HER-2/неу, маркера апоптозу bcl-2

(“Dako Cytomation”, Denmark). Для візуалізації імуногістохімічної реакції використовували систему EnVision (“Dako Cytomation”, Denmark). Експресію білків визначали за кількістю пухлинних клітин з позитивною імуногістохімічною реакцією, виражену у відсотках (індекс мітки – ІМ). Молекулярний підтип ідентифікували на підставі об’єктивної оцінки експресії біомолекулярних маркерів, визначали медіану (Me) кількості позитивних клітин: при значеннях ІМ та ІІ менших за Me, або більших за Me, рівень експресії маркера вважали відповідно низьким або високим.

Молекулярно-генетичне дослідження проводили в зразках біологічного матеріалу цільної периферичної крові (у вакутайерах з антикоагулянтom КЗЕДТА) та пухлинах тканин яєчників і молочної залози (у вигляді гістологічних зрізів з парафінових блоків). Всі етапи молекулярно-генетичного дослідження зразків були проведені в Державному закладі “Референс центр з молекулярної діагностики МОЗ України”.

Гістологічні зрізи депарафінізували за методикою з ксилолм та етанолом, після чого з них виділяли геномну ДНК набором “Quick-DNATM Universal Kit” (Zymo Research, USA). Екстракцію ДНК з периферичної крові проводили наборами “innuPREP Blood DNA Mini Kit” (AnalytikJena, Німеччина) та “ДНК-сорб-В” (АмпліСенс, РФ). Концентрацію та якість виділеної ДНК вимірювали за допомогою спектрофотометра “NanoDrop 2000c Spectrophotometer” (ThermoScientific, США). Отриману ДНК використовували для постановки реакції ампліфікації за модифікованими протоколами із застосуванням комерційного набору DreamTaq Green PCR Master Mix (фирми «Thermo Scientific», США) та специфічних олігонуклеотидних праймерів («Metabion», Німеччина). Для визначення мутацій *185delAG* та *5382insC* в гені *BRCA1*, *617delT* в гені *BRCA2* проводили мультиплексну алель-специфічну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), а поліморфні варіанти генів *ESR1(T397C, A351G)* та *CYP2D6*4 (G1846A)* визначали із застосуванням ПЛР з подальшим аналізом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Для рестрикційного аналізу використовували такі ендонуклеази рестрикції для варіанту гена *ESR1(T397C)* PvuII (10 U/μL), для варіанту гена *ESR1(A351G)* – XbaI (10 U/μL), для варіанту гена та *CYP2D6*4 (G1846A)* – MvaI (BstNI) (10 U/μL). Візуалізацію рестрикційних фрагментів здійснювали в 2% агарозному гелі (агароза “CSL-AG500”, Cleaver Scientific Ltd, Великобританія, буфер “10xTBE Electrophoresis Buffer”, Thermo Scientific, США) з додаванням Етидію броміду в якості барвника за допомогою електрофорезу. Оцінку довжин рестрикційних ферментів проводили в системі гель-документації «Micro DOC System with UV Transilluminator Clear View» (Cleaver Scientific Ltd, Велика Британія) порівнюючи з маркером молекулярної ваги «GeneRuler 100 bp DNA Ladder» (Thermo Scientific, США).

Клініко-генеалогічні дані піддавали генетико-математичному аналізу, на основі якого визначали генетичний ризик за допомогою технології програмування прогностичних моделей міжгенної взаємодії з використанням біоінформатичного методу MDR.

Для статистичної обробки отриманих результатів були використані наступні статистичні методи: стандартний описовий, непараметричний, кореляційний аналіз,

порівняння частот 2-х вибірок (критерій Пірсона χ^2). Прогностичне значення молекулярно-біологічних маркерів визначали за допомогою багатфакторного Сох-регресійного аналізу. **Генетико-математичний аналіз** оцінки внеску спадкового фактору у схильність до виникнення раку та відносного ризику (OR, odds ratio) розвитку раку у родинах із агрегацією злоякісних пухлин у родовах проводили після первинної обробки даних з використанням пакету прикладних програм MS Excel 2000. Статистична обробка виконувалася з використанням програм MS Excel 2010 та Statistica 10 for Windows, Stat Soft, Inc., USA. Для оцінки розбіжності показників у групах використовували параметричні та непараметричні критерії (t-критерій Ст'юдента або критерій Манна-Уїтні). Для аналізу відмінностей отриманих числових показників застосовували методи варіаційної статистики, а частот генотипів – критерій Пірсона χ^2 . При об'ємі вибірки менше 10 застосовували поправку Йетса та розраховували показник співвідношення шансів (odds ratio, OR) з довірчим інтервалом (95% confidence interval, CI). Показники виживаності і терміни виникнення рецидивного перебігу хвороби були проаналізовані графічно з використанням методу Каплан-Мейєра, порівняння проведено з використанням *long-rank*-критерію. Прогностичне значення молекулярних маркерів вивчали за допомогою регресійної моделі за Коксом, для перевірки вірогідностей використовували тести Вілкоксона і Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Клініко-генеалогічна характеристика хворих на доброякісну та злоякісну патологію ОЖРС.

Вивчення клініко-генеалогічних даних 1313 пробандів дозволило ідентифікувати хворих із агрегацією ЗН в родовах та без агрегації, на рис. 1 показано схему дизайну дослідження.

На основі аналізу результатів комплексного обстеження (клінічне, клініко-генеалогічне і лабораторне) 760 умовно здорових жінок, які звернулися з метою профілактичного огляду, у 73 з них були виявлені пухлинні процеси. У 24 (32,9%) осіб були діагностовані ЗН ОЖРС, у 47 (64,4%) – доброякісні пухлини ОЖРС. У 2/0,03% жінок патологічних змін ОЖРС не виявлено, але верифіковані пухлини органів шлунково-кишкового тракту (ОШКТ). Слід відзначити, що за результатами клініко-генеалогічного обстеження у 22 (91,7%) з 24 (100%) хворих на ЗН, виявлених серед умовно здорових жінок, мала місце агрегація злоякісних пухлин в родовах, найчастіше це були родичі I ступеня спорідненості.

Схема дизайну дослідження

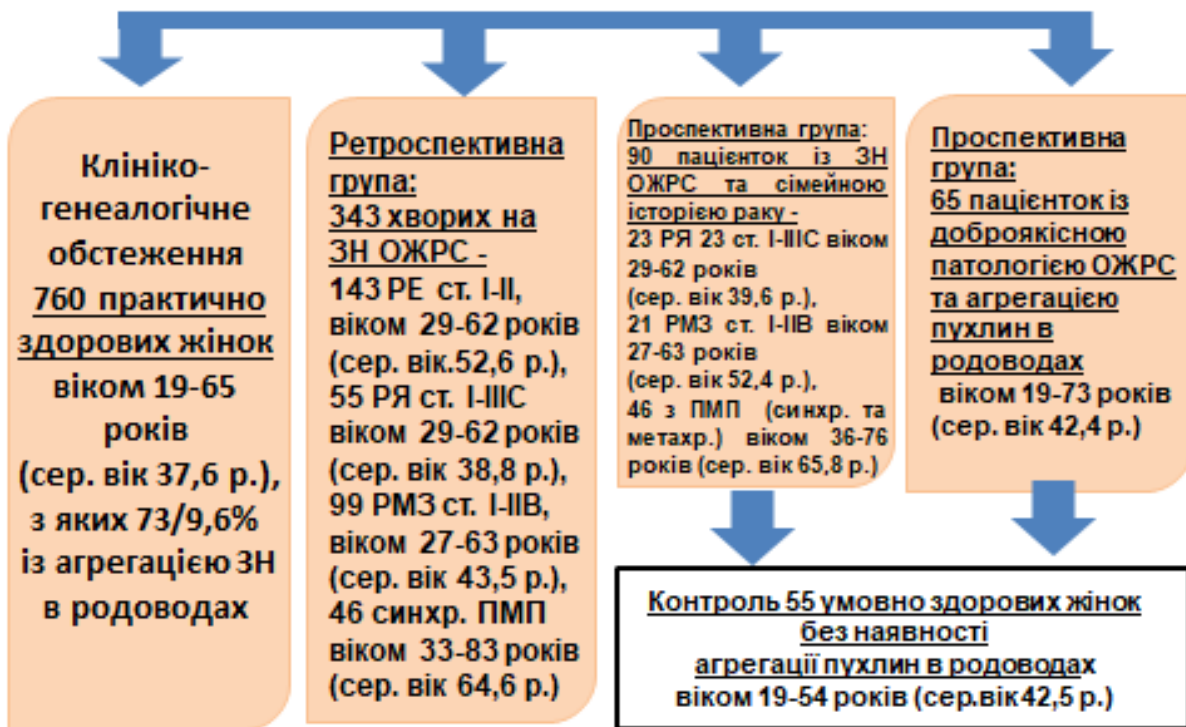


Рис. 1. Розподіл обстежених жінок за результатами медико-генетичного консультування

На підставі аналізу генеалогічних даних 73/100% хворих на рак (пробандів) у 39/53,4% в родовах мала місце агрегація ЗН по типу синдрому Лінча II. Серед останніх визначено спадкові форми РМЗ (3 родова), РМЗ/РЯ (1), РЯ (1) і рак ОШКТ (2). У 3 пробандів, родичі яких були хворі на РМЗ, були діагностовані доброякісні пухлини ОЖРС: 4 – фіброаденома молочних залоз, кіста яєчника, міома тіла матки.

Серед виявленої онкологічної патології у 24 пробандів значну частку (75,0%) становили злоякісні пухлини ОЖРС (табл. 2): рак шийки матки (РШМ) in situ, IA1 та IIIA (29,1%) стадій, РМЗ IA-B стадії (25,0%), РЯ I стадії (12,5%), РЕ I стадії (4,2%) і саркома матки (4,2%). Крім того, у 6/25,0% пробандів діагностовано злоякісні пухлини іншого генезу, а саме рак щитоподібної залози, товстої кишки, хвороба Ходжкіна (6/25,0%). Вік пробандів, у яких були виявлені ЗН, коливався у діапазоні 37-64 років.

У пробандів із доброякісними процесами ОЖРС, які також були виявлені при обстеженні умовно здорових жінок, найчастіше діагностувалась патологія тіла і шийки матки, відповідно у 46,9 і 38,8% хворих, а саме визначали міоми матки та важкі форми цервікальної інтраепітеліальної неоплазії (ЦІН). В однакової кількості хворих (по 28,6%) виявлено патологію молочної залози та яєчників з переважанням фіброаденом молочної залози (24,6%) і кіст яєчників (20,4%). Треба також відзначити, що у кожній третій з обстежених жінок діагностовано комбінацію

пухлин молочної залози та яєчників чи тіла матки та молочної залози, тобто, у одних і тих же хворих спостерігали асоціацію декількох доброякісних патологічних процесів ОЖРС.

Таблиця 2

Розподіл хворих на ЗН за діагнозом, стадією та віком

Діагноз	Кількість хворих n/%	Стадія	Вік M±m, роки
РШМ	7/29,1	in situ, IA1, IIIA	37±2,7
РМЗ	6/25,0	IA-IV	46±3,5
РЯ	3/12,5	I	43±1,3
РЕ	1/4,2	I	59±1,2
Саркома матки	1/4,2	I	63±0,8
Інші ЗН	6/25,0	I-III	64±0,7
Всього	24/100		

Інформація, яка була отримана від 760 жінок, використана для обґрунтування важливості проведення медико-генетичного консультування з метою виявлення хворих із доброякісними та злоякісними новоутвореннями для створення груп ризику і динамічного спостереження за цими жінками.

Поряд з цим, нами досліджено 343/100% первинних пацієнток, в яких було виявлено ЗН ОЖРС. Із загальної кількості цих осіб медико-генетичне консультування з подальшим клініко-генеалогічним аналізом було проведено 143/41,7% хворим на РЕ, 99/28,9% - на РМЗ, 55/16,0% - на РЯ, 46/13,4% - на синхронні злоякісні ПМП ОЖРС. На підставі аналізу родоводів пробандів було встановлено, що ознаки спадкової схильності та агрегація злоякісних пухлин ОЖРС і ОШКТ спостерігалися у 23,1% хворих на РЕ, 29,1% - на РЯ, 40,4% - на РМЗ та 53,6% - на ПМП ОЖРС, що вказує на значний внесок фактору спадковості до розвитку вказаних форм раку.

Цей етап роботи мав на меті з'ясування кількості хворих на ЗН ОЖРС, а також виявлення у їх сім'ях родичок, хворих на доброякісну патологію та рак тих же локалізацій, для дообстеження і включення в окремі групи щодо подальшого молекулярно-генетичного дослідження генетичної схильності до виникнення пухлин.

Отже, для молекулярно-генетичного обстеження на підставі даних анкет-опитувальників та за результатами медико-генетичного консультування було сформовано групу осіб, яка налічувала 210 жінок, у т. ч. 90 хворих на рак ОЖРС і 65 пацієнток з доброякісною патологією ОЖРС з агрегацією ЗН в родовах та 55 умовно здорових жінок без обтяженого сімейного анамнезу. В залежності від використаного біологічного матеріалу хворі розділені на 2 групи: пухлини 90 пацієнток із злоякісною патологією ОЖРС (21 - РМЗ, 23 - РЯ та 46 пацієнток з синхронними чи метакронними ПМП, однією з яких була злоякісна пухлина ОЖРС); зразки периферичної крові 109 хворих (44 на злоякісні пухлини ОЖРС, а саме - 21 на РМЗ I-II стадії, 23 - РЯ I-IV стадії; та 65 хворих на доброякісну патологію ОЖРС), у яких за даними генеалогічного аналізу спостерігалась агрегація

злюкисних пухлин в родовах; а також периферична кров 55 умовно здорових жінок з не обтяжених на рак родин (група контролю).

Вік хворих на ЗН ОЖРС (пробандів) і жінок групи контролю коливався у межах 24-79 років. Більш детальний розподіл за цим показником представлено на рис. 2.

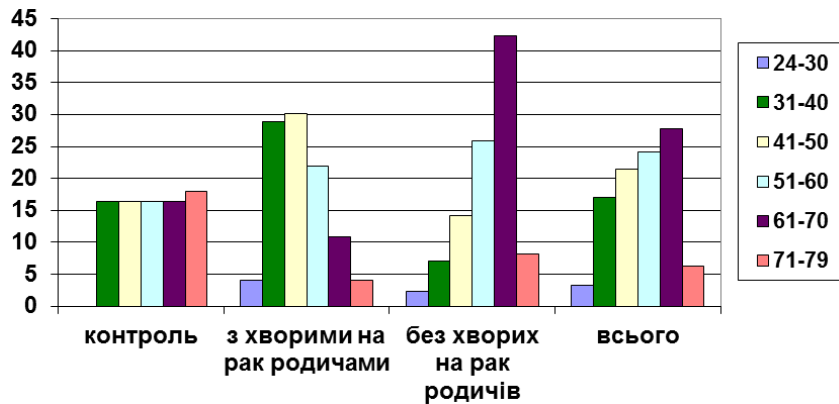


Рис. 2. Розподіл (%) хворих на ЗН ОЖРС за віком порівняно з контролем (здорові жінки) і клініко-генеалогічними даними

Відзначається збільшення кількості пробандів віком від 30 років. Якщо розглядати їх вік диференційно, то середнє значення цього показника становило $48,7 \pm 3,6$ років (за умови хворих на рак родичів) і $59,1 \pm 3,8$ років (за відсутності таких хворих). Отже, вік пацієнтів з асоціацією злюкисних пухлин у родовах був на 10,4 роки меншим, ніж у пробандів без онкологічної обтяженості. У пробандів з хворими на рак родичами мода дорівнювала 41-50 років, медіана - 38 років; у пробандів без онкологічної патології у родовах - відповідно 61-70 і 60 років ($p < 0,05$). Ці дані свідчать про більш ранній період маніфестації РЯ та РМЗ, характерний саме для спадково-обумовлених варіантів раку.

Клінічна характеристика 90 хворих на рак ОЖРС з виділеної нами групи із 210 осіб представлена в наступних фрагментах дослідження (рис. 3, табл. 3).

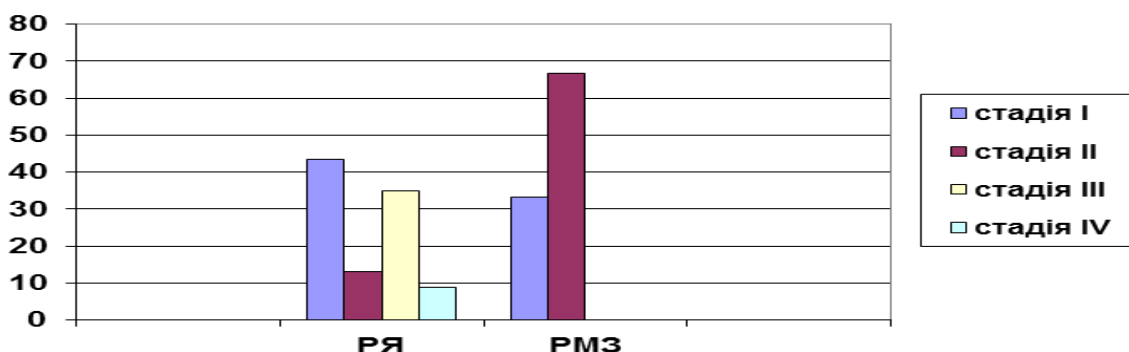


Рис. 3. Розподіл хворих (%) на РЯ та РМЗ в залежності від розповсюдженості пухлинного процесу (відповідно класифікації FIGO та TNM)

Розподіл цих хворих за стадіями пухлинного процесу показав, що при РЯ переважали хворі з I (42%) та III (34%) стадіями, а при РМЗ відповідно з I (32%) та II (68%) стадіями.

Детальний аналіз 21 родовада хворих на РЯ та 23 - на РМЗ дозволив встановити, що у 80 родичів I ступеня спорідненості кількість хворих на ЗН становила 33/41,2%, II ступеня – 47/58,8%. У обстежених нами пацієнток було більше родичів із ЗН по материнській лінії, ніж по батьківській.

Таблиця 3

Розподіл родичів на ЗН у родовадах хворих на РЯ та РМЗ

Клініко-генеалогічні дані родовадів		Кількість хворих на РЯ і РМЗ залежно від ступеня спорідненості родичів, які хворіли на рак	
		Хворі на РЯ n=23 / 100%	Хворі на РМЗ n=21 / 100%
Кількість хворих на рак родичів I ступеня спорідненості n=33 (100%)	Материнська лінія, n=22 / 64,5%	12 / 47,8	10 / 42,8
	Батьківська лінія n =11 / 35,5%	6 / 26,1	5 / 23,8
Кількість хворих на рак родичів II ступеня спорідненості n=47 (100%)	Материнська лінія n=35 / 74,5%	21 / 91,3	14 / 66,7
	Батьківська лінія n =12 / 25,5%	6 / 21,7	6 / 23,8

Аналіз клініко-генеалогічних даних у родовадах пробандів із ЗН ОЖРС виявив варіабельність пухлинних процесів за локалізацією і генезом. Найчастіше у родичів реєструвались пухлини ОЖРС, які разом склали 51,7%. Серед них за кількістю перше місце належало РЯ (27,5%), друге - РМЗ (16,1%), третє - РЕ (8,1%). Значна частота ЗН вірогідно обумовлена спільним патогенезом цих форм раку, а саме порушенням гормонального гомеостазу. Другою за частотою онкологічною патологією у родичів пробандів були пухлини ОШКТ. Частіше спостерігався рак товстої кишки (РТК), ніж рак шлунка (РШ), відповідно 17,4% і 12,1%; рак підшлункової залози (РПЗ) діагностовано лише в одному випадку (0,7%), значна кількість родичів хворіла на рак легень (РЛ) (14,8%), інші пухлини, у тому числі, рак простати (РП), були виявлені у незначній кількості родичів пробандів.

Аналіз клініко-генеалогічних даних пробандів з доброякісною патологією та раком ОЖРС виявив широкий спектр пухлинної патології у їх родичів, серед яких переважали ЗН ОЖРС, а саме: РЕ, РЯ, РМЗ. Частота РМЗ становила 23,0%, РЕ -

21,2%, РЯ -18,1%, тобто частота пухлин гормонозалежних органів була достатньо великою і загалом становила 62,3%.

За результатами клініко-генеалогічного аналізу даних пробандів із ПМП визначено, що у 7 (15,2%) з 46 хворих ПМП були синхронними, у 39 (84,8%) – метасинхронними. Загалом, вік хворих при діагностиці першої пухлини коливався від 23 до 83 років і становив $49,9 \pm 4,4$ років. Найбільша кількість хворих з первинною пухлиною (78,7%), була у віковому інтервалі 31-60 років, з метасинхронною (60%) - в інтервалі 51-70 років.

Встановлено, що вік хворих на синхронні ПМП коливався від 39 до 74 років із середнім значенням $57,6 \pm 5,6$ з медіаною 57 років. Мінімальний вік хворих на метасинхронні ПМП становив 23 роки, максимальний - 83 роки, при середньому значенні $48,6 \pm 6,1$ років і медіані 50 років. Отже, спостерігалась тенденція до зменшення віку появи метасинхронних ПМП ($p > 0,05$) порівняно з такими у групі хворих на синхронний рак. Тривалість періоду між діагностикою первинної і метасинхронної пухлини була різною і коливалась від 3 до 27 років. Найбільш великий термін (27 років) був у хворої на РЕ (первинна пухлина у віці 50 років), у якої у подальшому виникли 3 метасинхронні пухлини (рак прямої кишки, рак шкіри, лімфома Ходжкіна).

Залежно від часу виявлення ПМП (перша з діагностованих при синхронних ПМП чи первинна пухлина при метасинхронних) і морфологічного діагнозу первинних пухлин всі хворі були розподілені на 4 групи: 1 – хворі на РМЗ, 2 – на РЕ, 3 – на РЯ, 4 – хворі на РТК, і основні клініко-морфологічні особливості характеризували окремо відповідно до цих груп (табл. 4, 5).

Метасинхронні пухлини були різними за гістогенезом, при цьому у деяких хворих на РМЗ, РЕ, РЯ спостерігалось по 2 пухлини. Первинні та вторинні пухлини були діагностовані на I-III стадії неопластичного процесу. Враховуючи, що РЯ, РМЗ, РЕ (первинні пухлини) є гормонообумовленими, можна припустити, що розвиток метасинхронних пухлин у цих хворих пов'язаний з гіперестрогенією, яка задіяна у механізмах патогенезу пухлин ОЖРС. Гормонозалежні пухлини серед 46 ПМП загалом становили більшість - 36 (78,2%), з яких РЕ - 19 (41,3%), РМЗ – 7 (15,2%), РЯ - 10 (21,7%), і лише 27,8% були новоутвореннями іншого генезу.

Досить важливими з погляду ролі спадкових факторів у розвитку генетично обумовлених пухлин виявились клініко-генеалогічні дані, згідно яких у 39 родовах хворих на метасинхронні ЗН виявлено 74 родича різного ступеня спорідненості, які хворіли на рак. Злоякісні пухлини були виявлені у 38 (51,3%) родичів I ступеня спорідненості (16 матерів і 14 батьків, 3 дочок, 5 братів і сестер) та 36 (48,7%) родичів II ступеня спорідненості (17 тіток і 4 дядьків, 12 бабусь і 3 дідів). Загалом, за клініко-генеалогічними даними у 6 (12,8%) з 46 родин встановлено агрегацію пухлин яєчника, молочної залози, тіла матки і шлунково-кишкового тракту та пухлин іншого генезу. У трьох сім'ях діагностовано спадковий рак (РЯ, РМЗ, РЕ). У 5 хворих із загальної кількості обстежених було декілька метасинхронних пухлин (табл. 6), а саме: РМЗ (2), РЕ (2) і РЯ (1). Характерно, що в усіх спостереженнях, крім одного, за клініко-генеалогічними даними можна констатувати агрегацію злоякісних пухлин по типу синдрому Лінча II.

Таблиця 4

Результати клінічних, морфологічних та клініко-генеалогічних досліджень у хворих на первинно-множинний синхронний рак (n=7)

Характеристика первинної пухлини				
Групи хворих	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4
Первинні пухлини	PM3	PE	РЯ	РТК
Кількість хворих	2	3	1	1
Вік хворих	39, 54	53, 68,74	58	57
Стадія	I	IA, IB	IIIC	I
Патоморфологічний діагноз	Протоковий інфільтративний	Аденокарцинома	Серозна аденокарцинома	Муцинозний рак
Ступінь диференціювання пухлин	G2, G1	G0, G1, G1	G3	G2
Характеристика синхронних пухлин				
Вторинні пухлини	PE	РЯ (2), РТК (1)	РТМ	РЯ
Кількість хворих	2	3	1	1
Стадія	IA	IC – IIB	IB	IC
Ступінь диференціювання	G0, G2	G3, G3, G2	G1	G3
Патоморфологічний діагноз	Аденокарцинома	Серозний папілярний рак, Аденокарцинома	Аденокарцинома	Серозна аденокарцинома
Злоякісні пухлини у родичів пробандів	PM3 – у сестри, бабусі	PE у дочки і матері, PM3 у сестри, РТК у брата, РЛ (2) у дідусів	PM3 у матері	РШМ у сестри

За результатами дослідження визначено, що у більшості хворих перша діагностована пухлина, синхронна чи метасинхронна, була гормонозалежною, що може свідчити про спільність їх патоморфозу. Слід відзначити, що у розвитку злоякісного росту, крім гормональних порушень і генетичної схильності, мають значення інші ендо- та екзогенні фактори, які також можуть впливати на ОЖРС та викликати в них патологічні зміни. Отже, порушення не тільки гормонального гомеостазу, але й наявність метаболічних змін у організмі призводять до розвитку полінеоплазій.

Таблиця 5

Результати клінічних, морфологічних та клініко-генеалогічних досліджень у хворих на первинно-множинний метакронний рак (n=39)

Характеристика первинних пухлин				
Групи хворих	I група	II група	III група	IV група
Пухлини	PMЗ	РЕ	РЯ	РТК
Кількість хворих	12	10	6	11
Вік хворих (коливання), середній вік/ медіана віку (Me)	<u>33 - 83</u> 49,2 / 45	<u>33 - 78</u> 48,3 / 46	<u>23 - 67</u> 43 / 40,5	<u>26 - 68</u> 50 / 52
Кількість хворих до 50 / після 50 років	8 / 4	6 / 4	3 / 3	3 / 8
Стадія	IA – IIIC	IA – IIIC	IA-IIIC	I – IIIC
Патоморфологічний діагноз	Протоковий інфільтративний рак	Аденокарцинома	Серозний рак (3), аденокарцинома (2), дісгермінома (1)	Аденокарцинома (8), муцинозний (2), карциноїд (1), базальноклітинний рак (1)
Характеристика вторинних пухлин				
Інтервал до діагностики метакронних пухлин	2 – 22 роки	4 – 27 років	3 – 31 років	3 – 19 років
Метакронні пухлини	РЕ (6), РЯ (6), білатеральний РМЗ (1), саркома (1), рак щитоподібної залози (1)	РПК (6), РМЗ (3), РЯ (2), РШ (1), рак шкіри (1), лімфома Ходжкіна (1)	РЕ (3), РМЗ(3), РШ(1)	РЕ (10), РЯ (2)

продовження табл. 5

Кількість пухлин / кількість хворих у групі	15 / 12	14 / 10	6 / 6	11 / 11
Кількість хворих до 50 років / після 50 років	7 / 8	4 / 8	3 / 3	1 / 11
Стадія	IA – ІІС	I – ІІВ	IA-ІІВ	IA – ІІВ
Ступінь диференціювання	РЕ (G0-G2) РЯ (G1-G3) РМЗ білатеральний (G2) Саркома (G3) Рак щитоподібної залози (G1)	РПК6 (G1-G2) РМЗ (G1-G3) РЯ (G3) РШ (G3) Рак шкіри (G1) Лімфома Ходжкіна	РЕ (G0-G1) РМЗ (G1- G2) РШ (G1)	РЕ (G0-3) РЯ (G1- G3)
Патоморфологічний діагноз	Аденокарцинома, протоковий інфільтративний рак, серозна аденокарцинома, лейоміосаркома	Аденокарцинома, протоковий інфільтративний рак, базально-клітинний рак, плоско-клітинний рак, хронічний лімфолейкоз	Аденокарцинома, медулярний рак, протоковий інфільтративний рак	Аденокарцинома, серозний папілярний, гранульозо-клітинний рак
Загальна кількість злоякісних пухлин у родовах / у родичів I ступеня спорідненості	24 / 14*	18 / 9	8 / 5	26 / 12 *

Примітки:* первинно-множинний рак у матері пробанда; РПК – рак прямої кишки, РШ- рак шлунка.

Оскільки феномен виникнення декількох вторинних злоякісних новоутворень при метакхронному раку є не частим, наводимо дані щодо спектру пухлин за гістогенезом у досліджених нами 5 хворих на ПМП.

Таблиця 6

Індивідуальні характеристики хворих з декількома метакхронними пухлинами

№ спостереження, діагноз	Вік хворих, стадія і морфологічні особливості пухлинного процесу				Клініко-генеалогічні дані
	Первинна пухлина	Перша метакхронна пухлина	Друга метакхронна пухлина	Третя метакхронна пухлина	
№27	33 р.	40 р.	61 р.	-	РМЗ у матері, РМЗ і РЯ у тіток, РТК у дядька
Клінічний діагноз	РМЗ ст. ІА	РЦЗ ст. І	РЯ ст. ІІС		
Патоморфологічний діагноз	Протоковий інфільтративний рак	Папілярний рак	Аденокарцинома		
№36	36 р.	57 р.	57,5 р.	-	РМЗ і РШМ у матері, РМЗ у сестри, РЛ у батька
Клінічний діагноз	РМЗ ст. ІІ	РЯ ст. ІІС	РМЗ ст. ІІВ		
Патоморфологічний діагноз	Солідний рак	Серозна аденокарцинома	Протоковий Інфільтративний рак		
№16	23 р.	50 р.	54 р.		РПК у матері, РЛ у дядька
Клінічний діагноз	РЯ ст. ІС	РТМ ст. ІВ	РМЗ ст. І		
Патоморфологічний діагноз	Серозна цистаденокарцинома	Аденокарцинома	Протоковий інфільтративний рак		
№19	47 р.	59 р.	69 р.	-	
Клінічний діагноз	РТМ ст. ІІІ	РПК ст. І	РМЗ ст. ІІІ		
Патоморфологічний діагноз	Аденокарцинома	Базально-клітинний рак	Хронічний лімфолейкоз		РШ у двох братів
№42	50 р.	75 р.	77 р.	77 р.	Рак нирки у діда
Клінічний діагноз	РТМ ст. ІА	РПК ст. ІІ	Рак шкіри гомілки ст. І	Лімфома ст. ІVА	
Патоморфологічний діагноз	Аденокарцинома	Базально-клітинний рак	Плоскоклітинний неороговіючий рак	Лімфома Ходжкіна	

Безумовно, найбільший інтерес викликають хворі, у родовах яких злоякісні пухлини були у матерів і батьків пробандів з синхронними і метакронними пухлинами, що є суттєвим для визначення спадкових форм раку. Як видно з рис. 4, найчастішою патологією у батьків пробандів були ЗН ОШКТ і РЛ, у матерів – рак ОШКТ і РМЗ.

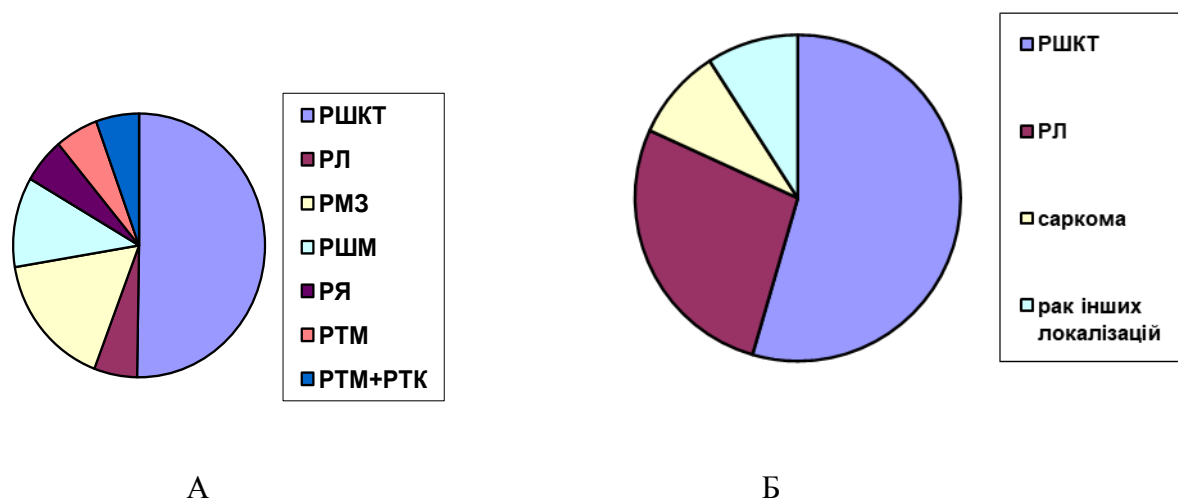


Рис. 4. Розподіл кількості хворих (%) на рак матерів (А) і батьків (Б) пробандів за даними клініко-генеалогічного аналізу

РШКТ – рак шлунково-кишкового тракту, РЛ – рак легені, РМЗ – рак молочної залози, РШМ – рак шийки матки, РЯ – рак яєчника, РТМ – рак тіла матки, РПК – рак товстої кишки.

На основі наведених результатів дослідження констатовано, що клінічний і морфологічний діагнози та дані клініко-генеалогічного дослідження ПМП свідчать про внесок спадкової компоненти у появу пухлинного процесу, а саме: у 12,8% хворих наявна агрегація злоякісних пухлин у родовах, 6% - мають спадкові ризики виникнення РЕ (рис. 5), РМЗ (рис. 6) або ж сімейну історію раку агрегації ЗН по типу синдрому Лінча II (рис. 7).

Поряд з цим, проведено клініко-генеалогічний аналіз родоводів 65 хворих на доброякісну патологію ОЖРС із групи чисельністю 210 жінок, сформованої для молекулярно-генетичного дослідження. Вік пацієнток із доброякісними пухлинами коливалися в межах 23-64 роки. У сім'ях цих жінок було виявлено від 3 до 6 родичів хворих на рак I та II ступенів спорідненості. Агрегація злоякісних пухлин у родовах за гістогенезом була по типу синдрому Лінча II. ЗН частіше зустрічалися у родичів пробандів по материнській (63/75%), ніж по батьківській (21/25%) лінії.

При аналізі 90 родоводів хворих на злоякісні пухлини ОЖРС із дослідженої групи з 210 осіб також зазначено збільшення агрегації ЗН в родовах по материнській лінії порівняно з батьківською (147/73,2% та 54/26,8% відповідно). В той же час 55 жінок із групи контролю не мали ускладненого на рак сімейного анамнезу (табл. 7).

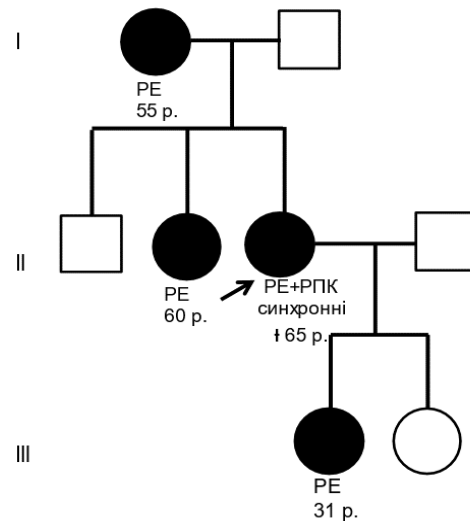


Рис. 5. Родовід пробанда К., 65 р.– спадково-обумовлений РЕ

Легенда родоводу хворої на первинно-множинний рак: у пробанда (вказано стрілкою) в 65 років діагностовано синхронний РЕ та РПК, у матері пробанда у 55 років виявлено РЕ, у сестри та доньки пробанда діагностовано РЕ у 60 та 31 рік відповідно.

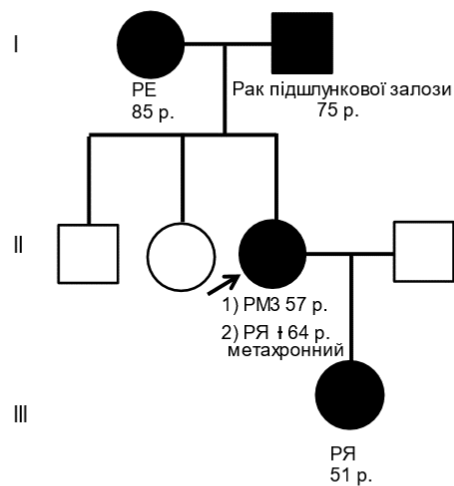


Рис. 6. Родовід пробанда Л., 36 р. – спадково-обумовлений РМЗ

Легенда родоводу хворої на первинно-множинний рак: у пробанда у 36 років діагностовано РМЗ, а також метакронні пухлини РЯ та білатеральний РМЗ, що виникли синхронно у 57 років. У матері пробанда у віці 65 та 69 років виявлено метакронний РМЗ та РЕ, у 2 сестер пробанда у віці 44 та 55 років діагностовано фіброаденому молочної залози та РМЗ відповідно.

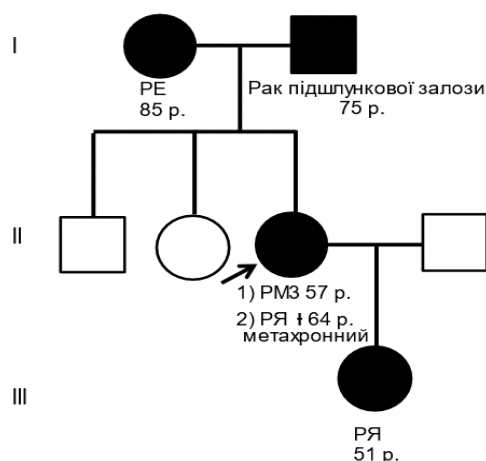


Рис. 7. Родовід пробанда З., 57 р. – агрегація злоякісних пухлин в родовах по типу синдрому Лінча II

Легенда родоову хворої на первинно-множинний рак: у пробанда в 57 років діагностовано РМЗ, у 64 роки - метакронний РЯ. У матері пробанда у віці 85 років виявлено РЕ, у батька у 75.років – рак підшлункової залози, у доньки пробанда у віці 51 рік виник РЯ.

Таблиця 7

Частота злоякісних пухлин у родичів пробандів досліджених груп

Дані клініко-генеалогічного аналізу родоовів	Доброякісні (n=65) 84 хворих На рак родичів у родоових	Злоякісні (n=90) 201 хворий на рак родич у родоових	Ступінь спорідненості
Материнська лінія	24 (36,9%)	46 (51,1%)	I ступінь спорідненості (2 та більше родичів)
Батьківська лінія	6 (9,2%)	25 (27,8%)	
Материнська лінія	22 (33,8%)	64 (71,1%)	II ступінь спорідненості (2 та більше родичів)
Батьківська лінія	6 (9,2%)	19 (31,7%)	
Материнська лінія	17 (26,2%)	37 (41,1%)	I- II ступінь спорідненості (3 та більше родичів, до 6)
Батьківська лінія	9 (13,8%)	10 (11,1%)	

Розподіл за гістологічними формами доброякісних (n=65) та злоякісних (n=90) пухлин ОЖРС у родичів пробандів з агрегацією ЗН в родовах.

Комплексне обстеження пробандів з доброякісними пухлинами ОЖРС виявило різноманітну патологію (табл. 8) з перевагою новоутворень матки та яєчника, які відповідно становили 29,2% і 27,7%. Патологія молочної залози діагностувалась у 16,9% обстежених. Вражає значна кількість поєднання пухлин ОЖРС (26,2%), зокрема комбінації різних форм доброякісної патології, а саме матки та яєчника, молочної залози та яєчника, матки та молочної залози. Тобто, майже у кожній третій обстеженій жінки діагностовано патологію матки. За гістологічною формою це були: лейоміома, аденоміоз тіла матки або кіста яєчника. В той же час, у кожній шостій жінки з доброякісною патологією ОЖРС, крім того, виявлено пухлини молочної залози (фіброаденома або кіста).

Таблиця 8

Розподіл доброякісної патології у пацієнток з доброякісними пухлинами ОЖРС та з обтяженим на рак сімейним анамнезом

Доброякісна патологія	Кількість обстежених пацієнток n=65 (100%)
Лейоміома, аденоміоз тіла матки	19 (29,2)
Кіста яєчника	18 (27,7)
Фіброаденома, кіста молочної залози	11 (16,9)
Комбінація різних форм доброякісної патології: матки+додатків, молочної залози+додатків, матки+молочної залози	17 (26,2)

За результатами аналізу 65 родоводів хворих з доброякісною патологією ОЖРС було проведено зіставлення злоякісних пухлин за гістогенезом у родичів пробандів, хворих на рак, залежно від характеру успадкування ЗН по материнській чи батьківській ліній. Згідно рис. 8 (А, Б), по батьківській лінії у незначній кількості визначалися родички із РЕ, не виявлено випадків захворювання на РЯ, в той же час, у 7,5 разів було більше хворих на РШ. По материнській лінії найбільшу частину становили хворі на РЕ.

Аналіз гістологічних форм пухлин, виявлених у родичів 90 пробандів із ЗН ОЖРС, які входили у сформовану групу для молекулярно-генетичних досліджень чисельністю 210 осіб, показав, що у 91,1% жінок із РЯ та РМЗ значно переважали серозні пухлини, відповідно 87,7% і 94,1% ($p>0,05$). Інші гістологічні форми (епітеліальний РЯ, злоякісні пухлини строми статевого тяжу) складали значно меншу кількість (14/8,9%). У хворих на РМЗ 90,5% становив інфільтративний протоковий рак. За ступенем злоякісності у хворих на РЯ та РМЗ переважав високий ступінь диференціювання пухлин (G1), відповідно 47,8% та 47,6%, що дає підстави вважати клініко-генеалогічний аналіз ефективним інструментом визначення ранніх форм новоутворень цього генезу.

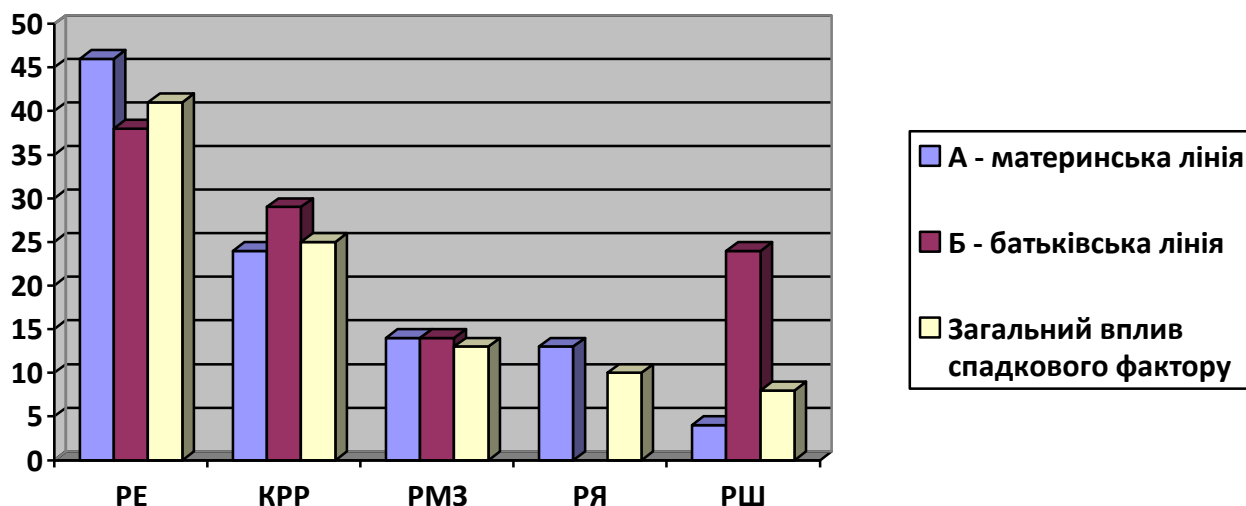


Рис. 8. Розподіл (%) пухлин різного генезу у родовах жінок з доброякісними процесами ОЖРС з урахуванням успадкування пухлин по материнській (А) і батьківській лініях (Б)

Серед хворих на РМЗ за результатами ІГХД експресії гормональних рецепторів до естрогену та прогестерону і епідермального фактору росту новоутворень (HER2/neu) визначені молекулярні підтипи пухлин. Як видно з табл. 9, 42,9% пухлин РМЗ мали люмінальний А підтип, 33,3% - люмінальний В підтип, 23,8% - базальний підтип (тричі рецептор негативний). HER2/neu-позитивний молекулярний підтип у даному дослідженні не визначено.

Таблиця 9

Молекулярні підтипи РМЗ у пробандів

Молекулярні підтипи	Рецептори			Кількість хворих (n=21 /100%)	
	ER	PR	HER2/neu	n	%
Люмінальний А	+	+	—	9	42,9
Люмінальний В	+	+	+	7	33,3
Базальний (тричі рецептор негативний)	—	—	—	5	23,8
HER2/neu-позитивний	—	—	—	0	0

Примітки: «+» - позитивна експресія рецепторів, «—» - відсутність експресії рецепторів

Отже, отримані результати дозволили аргументовано обґрунтувати доцільність застосування клініко-генеалогічного методу для виявлення родин із генетичною схильністю до виникнення ЗН ОЖРС та подальшого визначення персоніфікованого ризику появи раку у членів таких сімей.

Визначення мутацій в генах *BRCA1/2* у хворих на ЗН та ПМП ОЖРС.

Враховуючи значення мутацій у генах *BRCA1* (5382 *insC*, 185 *delAG*) та *BRCA2* (6174 *DelT*) у схильності до розвитку РЯ та РМЗ, були проведені молекулярно-генетичні дослідження на їх виявлення в операційному матеріалі 44/100% хворих (1 група) на РМЗ (21/47,7%) і РЯ (23/52,3%) та 46/100% ПМП (2 група), однією з локалізацій якої також був РЯ чи РМЗ. У 1 групі було ідентифіковано 8/18,2%, а в 2 групі - 7/15,2% випадків лише одної мутації, а саме 5382 *insC* у гені *BRCA1*. Після аналізу даних клініко-генеалогічного дослідження встановлено, що у обстежених нами пацієнток з 1 групи, носіїв мутації 5382 *insC* у гені *BRCA1*, родичі по материнській лінії також хворіли на РЯ (2 матері), РМЗ (матір і 3 тітки по материнській лінії), рак щитоподібної залози (матір), РЕ (бабуся), РТК (матір та бабуся по материнській лінії), РПЗ (матір). У жінок 2 групи з ПМП ОЖРС найчастіше на рак хворіли матері, при цьому переважали пухлини, у патогенезі яких мають значення гормональні фактори (РМЗ, РЯ, РЕ, рак щитоподібної залози), і вік пробандів на момент виникнення першої локалізації ЗН ОЖРС носіїв цієї мутації не перевищував 50 років. Наводимо приклад родовету жінки - носія мутації 5382 *insC* у гені *BRCA1* з розвитком ПМП ОЖРС (рис. 9).

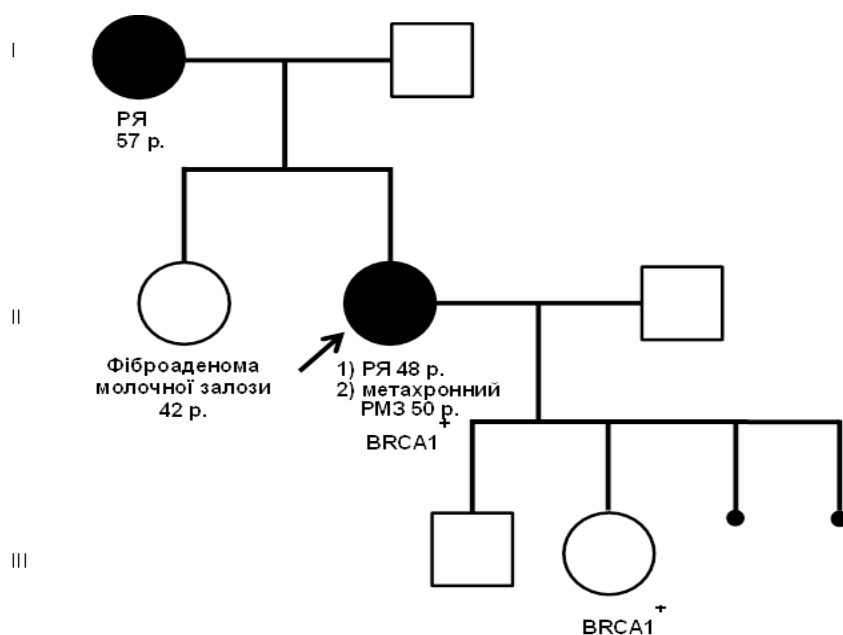


Рис. 9. Родовід хворої З., 48 р.

Легенда родовету хворої на первинно-множинний рак: у пробанда в 45 років діагностовано РЯ, у матері пробанда у віці 57 років виявлено РЯ. У пробанда у віці 50 років виникла метакронна ПМП - РМЗ. У сестри пробанда діагностовано фіброаденому молочної залози. У пробанда визначено мутацію 5382 *insC* у гені *BRCA1*. У пробанда син і дочка, яка є носієм мутації 5382 *insC* у гені *BRCA1*.

Визначення молекулярно-генетичних критеріїв для оцінки ризику виникнення доброякісної та злоякісної патології ОЖРС. Результати

дослідження, які свідчать про спадковий характер пухлин у родовах обстежених жінок із доброякісною та злоякісною патологією ОЖРС, стали підставою для проведення комплексного молекулярно-генетичного обстеження 210 жінок славіянської популяції із сформованих 3 однорідних за віком та місцем проживання в Черкаському регіоні більше 25 років груп, яким було проведено додаткове молекулярно-генетичне дослідження периферичної крові 55 умовно здорових жінок із групи контролю без сімейної історії раку, 65 пацієток з доброякісною патологією та матеріалу пухлин 90 хворих на ЗН ОЖРС з ускладненим на рак родинним анамнезом для виявлення мутацій у генах *BRCA1/2* (5382insC, 185delAG., 6174delT.), і поліморфних варіантів (SNP) генів *ESR1* (A351G, T397C), *Cyp2D6**4 (G1846A).

Наводимо приклади результатів молекулярно-генетичного дослідження поліморфізмів гену *ESR1* (A-351G, T-397C), що включали виявлення продуктів рестрикційного аналізу фрагмента гена *ESR1* у пухлині хворої на РМЗ (рис. 10, 11).

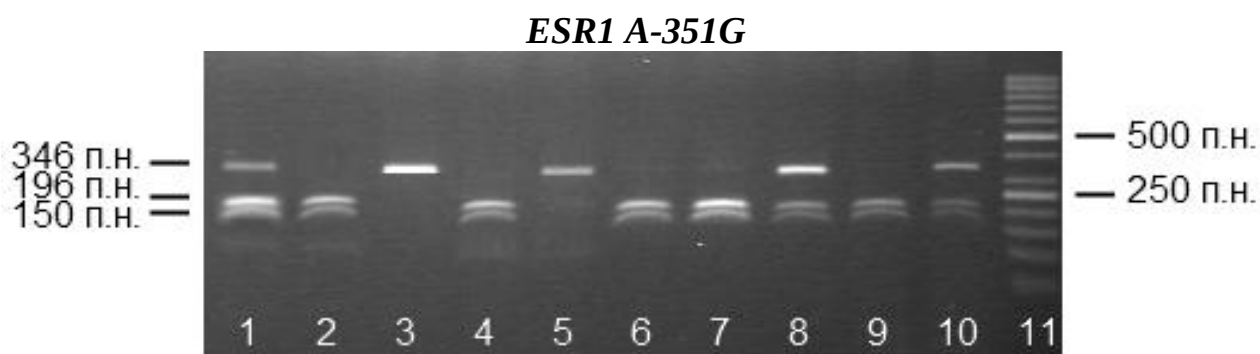


Рис. 10. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу фрагмента гена *ESR1* (A351G). Зразки: 1, 8, 10 - генотип AG; 2, 4, 6, 7, 9 – генотип AA; 3, 5 – генотип GG; 11 – маркер молекулярної ваги.

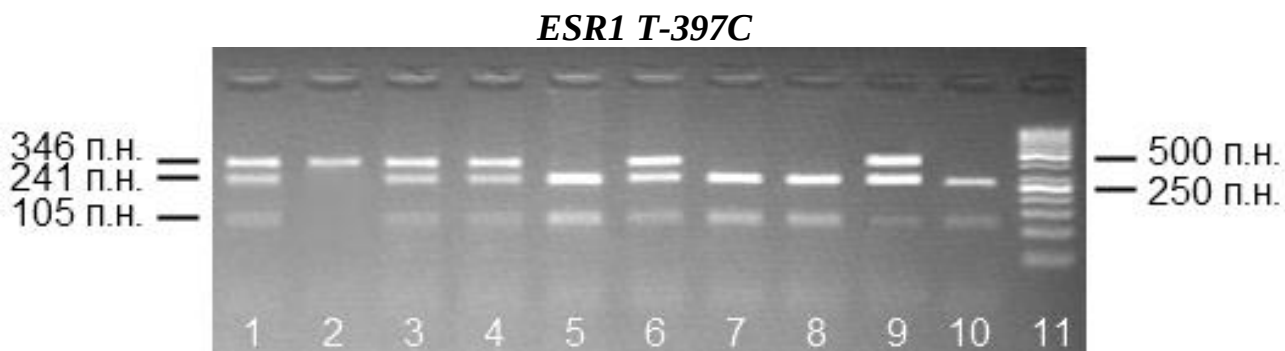


Рис. 11. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу фрагмента гена *ESR1* (T397C). Зразки: 1, 3, 4, 6, 9 - генотип TC; 2 – генотип CC; 5, 7, 8, 10 – генотип TT; 11 – маркер молекулярної ваги.

Крім того, у цій пухлині за результати молекулярно-генетичного дослідження виявлені рестрикційні фрагменти ДНК гена *CYP2D6*4 (G1846A)* з молекулярною вагою 183 п.н., 161 п.н. і 77 п.н., що відповідали генотипу GG, з молекулярною вагою 344 п.н. і 77 п.н. – генотипу AA, а з молекулярною вагою 344 п.н., 183 п.н., 161 п.н. і 77 п.н. – генотипу GA (рис. 12).

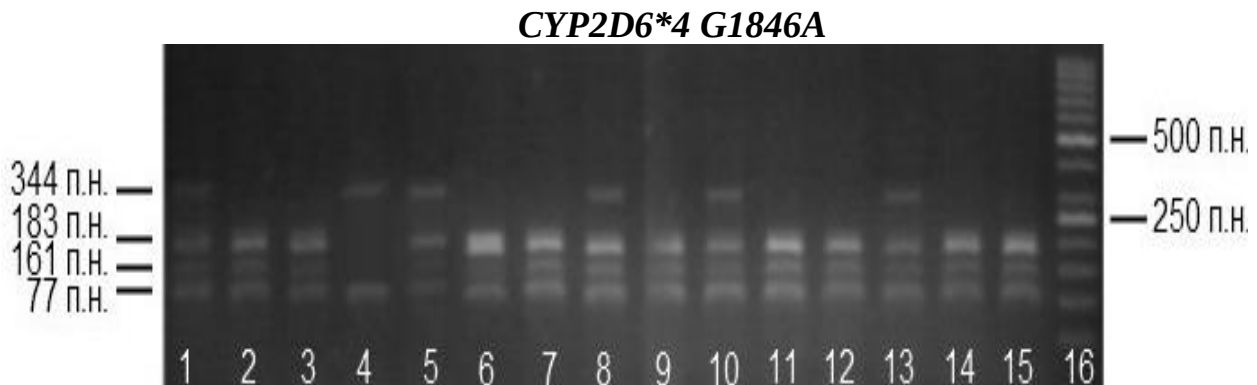


Рис. 12. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу поліморфного варіанту *CYP2D6*4 (G1846A)*. Зразки 1, 5, 8, 10, 13 – генотип GA, зразки 2, 3, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 15 – генотип GG, зразок 4 – генотип AA, 16 – маркер молекулярної ваги

Для оцінки комплексного внеску генетичної компоненти в розвиток доброякісної патології ОЖРС нами проведено аналіз всіх можливих комбінацій поліморфних варіантів досліджених генів у групі хворих на доброякісні пухлини з наявністю у пробандів обтяженого на рак онкологічного анамнезу та в групі контролю (умовно здорові жінки без агрегації ЗН в родовах) (табл. 10).

У подальшому за допомогою біоінформатичного методу скорочення багатофакторної розмірності (MDR_2.0) було проведено оцінку ролі комбінації генів та міжгенні взаємодії для формування прогностичних моделей оцінки виникнення доброякісних пухлин ОЖРС у жінок із обтяжених на рак родин (табл. 11).

Найбільш інформативною прогностичною моделлю з високою точністю (71,68%), отриманою у нашому дослідженні, для прогнозування доброякісної патології у жінок з обтяженим на рак сімейним анамнезом, виявилась 2** модель *ESR1 (T397C)/Cyp2D6*4 (G1846A)* з двома поліморфними варіантами генів *ESR1 (T397C)* та *Cyp2D6*4 (G1846A)*, які можна застосовувати для дослідження їх поліморфних варіантів. За допомогою графічного відображення з'ясовано внесок кожного поліморфного варіанту зазначених генів в ризик розвитку доброякісної патології ОЖРС (рис. 13).

Високий показник ентропії (13,59%) було визначено для гена рецептора естрогену *ESR1 (T397C)*, який, відповідно до зображення, мав негативний взаємозв'язок з іншими генами (синій та зелений кольори), тобто має переважний ізолюваний вплив на зростання ризику захворювання. Виходячи з даних аналізу всіх чотирьох показників, можна зробити висновок про провідну роль поліморфного варіанту *T397C* гена *ESR1* серед усіх проаналізованих генів.

Таблиця 10

Комбінації генотипів за дослідженими генами *ESR1*..(*T397C/ A351G*), *Cyp2D64 (*G1846A*) та *BRCA1* (*5382insC*) асоційовані із зростанням ризику виникнення доброякісної патології ОЖРС**

Комбінації генотипів	Доброякісна патологія (n=65)		Група контролю (n=55)		Результати статистичного аналізу			
..								
генотипи	n	%	n	%	χ^2	OR	p	95%CI
<i>ESR1(T397C)/ESR1 (A351G)</i>								
TT/AA	13	20,97	32	58,18	16,94	0,18	0,001	0,08-0,40
TC/AG	27	41,54	13	23,64	4,29	2,30	0,038	1,04-5,08
CC/GG	10	15,38	0	0,00	7,33	-	0,007	-
<i>ESR1 (T397C)/Cyp2D6*4 (G1846A)</i>								
TT/GG	8	12,31	25	45,45	14,80	0,17	0,001	0,07-0,42
CC/GA	6	9,23	0	0,00	5,34	-	0,021	-
<i>ESR1 (A351G)/Cyp2D6*4 (G1846A)</i>								
AA/GG	15	23,08	27	49,09	7,76	0,31	0,005	0,14-0,68
AG/GA	7	10,77	0	0,00	6,28	-	0,012	-
GG/GG	5	7,69	0	0,00	4,41	-	0,035	-
<i>ESR1 (T397C)/ESR1 (A351G)/Cyp2D6*4 (G1846A)</i>								
TT/AA/GG	8	12,31	23	41,82	13,54	0,20	0,001	0,08-0,49
TT/AA/GA	3	4,61	9	16,36	4,08	0,22	0,049	0,06-0,86
TC/AG/GA	5	7,69	0	0,00	4,41	-	0,035	-
CC/GG/GG	5	7,69	0	0,00	4,41	-	0,035	-
<i>BRCA1 (5382insC)/ESR1 (T397C)/ESR1 (A351G)/Cyp2D6*4 (G1846A)</i>								
NM/CC/AG/GG	1	1,54	0	0,00	0,85	-	0,356	-
NM/CC/GG/GA	1	1,54	0	0,00	0,85	-	0,356	-
NM/CC/GG/GG	1	1,54	0	0,00	0,85	-	0,356	-

Таблиця 11

Моделі міжгенної взаємодії для оцінки ризику виникнення доброякісної патології ОЖРС за допомогою програми MDR 2.0 в режимі всебічного пошуку

Число генів у моделі	Комбінації генів в прогностичній моделі	Відтворюваність моделі	Точність моделі, %
1*	<i>ESR1 T397C</i>	10/10	70,14
2**	<i>ESR1 T397C/Cyp2D6*4 (G1846A)</i>	10/10	71,68
3*	<i>ESR1 T397C/ ESR1 A351G/Cyp2D6*4 (G1846A)</i>	10/10	67,20
4*	<i>BRCA1 (5382insC)/ ESR1 T397C/ ESR1 A351G/Cyp2D6*4 (G1846A)</i>	10/10	69,79

*- визначена найкраща модель ($p \leq 0,01$) серед n - генних моделей

** - визначена найбільш ефективна модель ($p \leq 0,001$) серед n - генних моделей

..

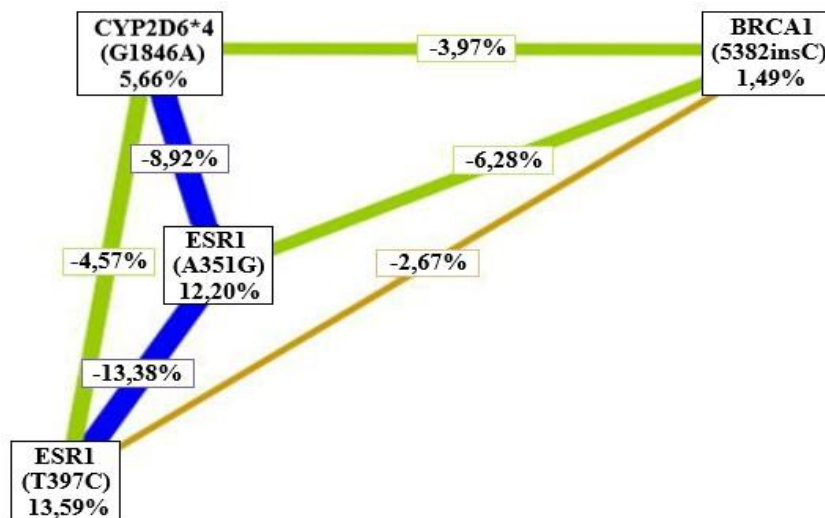


Рис. 13. Графічне відображення результатів аналізу взаємодій між досліджуваними генами у жінок з доброякісною патологією.

Примітки: зелений, синій кольори – антагоністична взаємодія між локусами генів, коричневий колір - незалежний ефект окремих локусів на ризик захворювання. Лініями між генами на рис. 10 вказано тип та ступінь взаємодії. Довгими лініями в дендрограмі описано слабкий взаємозв'язок між генами, короткими лініями - сильнішу взаємодію, кольором охарактеризовано тип взаємодії: синій - незалежний ефект, зелений - посилюючий ефект гена. На вершинах багатогранника представлена інформаційна цінність кожного гена, на ребрах – інформаційна

цінність взаємодії пари генів. Оскільки характер взаємодії досліджених генів в прогностичній моделі міжгенної взаємодії мав незалежний ефект, взаємодія між генами негативна.

Для оцінки комплексного внеску генетичної компоненти в розвиток злоякісних пухлин ОЖРС було проведено аналіз всіх можливих комбінацій поліморфних варіантів досліджених генів у групах пацієнток із ЗН та агрегацією злоякісної патології в родинах та в групі контролю (умовно здорові жінки без сімейної історії раку) (табл. 12).

Таблиця 12

Розподіл поліморфних варіантів генів *ESR1* (A351G, T397C), *CYP2D64 (G1846A) та *BRCA1* (5382insC), *BRCA2* (6174delT) у хворих на ЗН ОЖРС із обтяжених на рак родин та у жінок з групи контролю**

Комбінації генотипів	Злоякісна патологія ОЖРС (n=90)		Група контролю (n=55)		Результати статистичного аналізу			
генотипи	n	%	n	%	χ^2	p	OR	95%CI
.. <i>ESR1</i> (T397C)								
TT	23	25,56	34	61,82	17,33	0,001	0,21	0,10-0,44
TC	47	52,22	18	32,73	4,49	0,034	2,25	1,12-4,52
CC	20	22,22	3	5,45	5,99	0,014	4,95	1,40-17,55
TC+CC	67	74,44	21	38,18	17,33	0,001	4,72	2,29-9,70
.. <i>ESR1</i> (A351G)								
AA	30	33,33	37	67,27	14,48	0,001	0,24	0,12-0,50
AG	52	57,78	18	32,73	7,61	0,006	2,81	1,39-5,67
GG	8	8,89	0	0,00	3,61	0,057	-	-
AG+GG	60	66,67	18	32,73	14,48	0,001	4,11	2,01-8,39
.. <i>Cyp2D6</i>*4 (G1846A)								
GG	60	66,67	45	81,82	3,2	0,074	0,44	0,20-1,00
GA	28	31,11	10	18,18	2,32	0,128	2,03	0,90-4,60
AA	2	2,22	0	0,00	0,14	0,704	-	-
GA+AA	30	33,33	10	18,18	3,92	0,047	2,25	1,00-5,07
.. <i>BRCA1</i> (5382insC)								
NN	80	88,89	55	100,00	4,95	0,026	-	-
NM	10	11,11	0	0,00			-	-
MM	0	0,00	0	0,00	-	-	-	-
.. <i>BRCA2</i> (6174delT)								
NN	86	95,56	55	100,00	1,13	0,288	-	-
NM	4	4,44	0	0,00			-	-
MM	0	0,00	0	0,00	-	-	-	-

Для хворих на рак ОЖРС було характерним зростання частоти генотипів *397TC* та *397CC* за геном *ESR1*.. порівняно з жінками групи контролю ($OR=2,25$, $95\%CI$ (1,12-4,52, $p=0,034$), та $OR=4,95$, $95\%CI$ (1,40-17,55, $p=0,014$), відповідно. Генотип *397TT* мав протективну дію до розвитку онкопатології ($OR=0,21$, $95\%CI$ (0,10-0,44, $p=0,001$), а за наявності поліморфного варіанту *397CC* або *397CT* у гомо- чи гетерозиготному стані ризик розвитку злоякісних пухлин ОЖРС збільшується в 5 разів (показник співвідношення шансів $OR=4,72$ при *397CC* та 5,95 при *397TC+CC*).

У хворих на рак ОЖРС виявлена лише тенденція до підвищення частоти генотипу *351GG* за геном *ESR1* ($p>0,05$). Достовірні відмінності було з'ясовано для *351AG* генотипу за геном *ESR1* ($OR=2,81$ $95\%CI$ (1,39-5,67, $p=0,006$). Для генотипу *351AA* за цим же геном встановлено протективний ефект ($OR=0,24$ $95\%CI$ (0,12-0,50, $p=0,001$). У цих хворих спостерігалось вірогідне підвищення частоти генотипів *1846GA* та *1846AA* за геном *Cyp2D6*4*, на підставі чого можна констатувати, що ризик розвитку раку за наявності несприятливого поліморфного варіанту в гомо- ($OR=2,25$ при *1846GA+AA*) або гетерозиготному ($OR=2,03$ при *1846GA*) стані збільшується більше, ніж в 2 рази. Загалом, у хворих на рак ОЖРС з сімейною історією раку порівняно з пацієнтками без обтяженого онкологічного анамнезу частота виявлення мутації *5382insC* в гені *BRCA1* в гетерозиготному стані ($\chi^2=4,95$, $p=0,026$) має тенденцію до збільшення, також у 4 (4,4%) з 90 (100%) хворих на ЗН ОЖРС було виявлено мутацію *6174 delT* в гені *BRCA2* в гетерозиготному стані.

Оцінка комбінацій генотипів за дослідженими генами була проведена також для хворих на ЗН ОЖРС з обтяжених на рак родин та умовно здорових жінок з групи контролю без наявності спадкового фактору ризику появи онкологічної патології (табл.13).

Як видно з табл. 13, в роботі були виявлені протективні комбінації генотипів та комбінації генотипів, асоційовані із зростанням ризику раку ОЖРС. В умовно здорових жінок достовірно переважали комбінації *397TT/351AA*, *397TT/1846GG*, *351AA/1846GG*, *397TT/351AA/1846GG* за генами *ESR1* та *Cyp2D6*4*. У групі хворих на рак ОЖРС переважала частота комбінації генотипів *397TC/351AG*, *397TC/1846GA*, *351AG/1846GA*, *397TC/351AG/1846GA* за генами *ESR1* та *Cyp2D6*4*. У осіб групи контролю взагалі не було виявлено комбінацій *397CC/351GG*, *351AG/1846GA*, *397TC/351AG/1846GA*, у зв'язку з цим показник співвідношення шансів не був розрахованим для них, але подібна їх розповсюдженість серед хворих вказує на його важливе значення щодо зростання ризику онкологічної патології.

Мутації у високопенетрантних генах *BRCA1* та *BRCA2* також виявлено у комбінаціях з іншими дослідженими генотипами за генами *ESR1* (*A351G*, *T397C*) та *Cyp2D6*4* (*G1846A*). У всіх 9 випадках було виявлено комбінацію *BRCA1* (*5382insC*) з генотипами за дослідженими генами, які підвищують ризик онкологічної патології, а у 4 із 4 випадків генотип *BRCA2* (*6174delT*) був поєднаним з генотипами ризику онкологічної патології, що свідчить про модифікуючий вплив даних генотипів за наявності високопенетрантних мутацій. Подібний модифікуючий ефект спостерігався у пацієток з доброякісною патологією, у яких було виявлено комбінацію *BRCA1* (*5382insC*) з генотипами підвищеного ризику виникнення ЗН за дослідженими генами.

Таблиця 13

Комбінації генотипів за дослідженими генами *ESR1* (T397C/ A351G), *Cyp2D64 (G1846A) та *BRCA1* (5382insC), *BRCA2* (6174delT), які асоційовані із зростанням ризику виникнення злоякісних пухлин ОЖРС у пробандів**

Комбінації генотипів	Злоякісна патологія (n=90)		Група контролю (n=55)		Результати статистичного аналізу			
	n	%	n	%	χ^2	OR	p	95%CI
<i>ESR1</i> (T397C/ A351G)								
TT/AA	21	23,33	32	58,18	12,63	0,26	0,001	0,12-0,53
TC/AG	38	42,22	13	23,64	4,39	2,36	0,036	1,12-5,00
CC/GG	8	12,31	0	0,00	5,17		0,047	
<i>ESR1</i> (T397C)/ <i>Cyp2D6</i> *4 (G1846A)								
TT/GG	17	18,89	25	45,45	10,45	0,28	0,001	0,13-0,59
TC/GA	16	17,78	1	1,82	6,93	11,68	0,008	1,50-80,74
<i>ESR1</i> (A351G)/ <i>Cyp2D6</i> *4 (G1846A)								
AA/GG	19	21,11	27	49,09	12,33	0,28	0,001	0,13-0,58
AG/GA	14	15,56	0	0	9,46	-	0,013	-
<i>T397C</i> / <i>A351G</i> / <i>G1846A</i>								
TT/AA/GG	15	16,66	23	41,82	9,9	0,28	0,002	0,13-0,60
TC/AG/GA	11	12,22	0	0	7,27	-	0,018	-
<i>BRCA2</i> (6174 delT) / <i>T397C</i> / <i>A351G</i> / <i>Cyp2D6</i> *4(G1846A)								
NM/TC/AG/GA	1	1,11	0	0,00	0,06	-	0,803	-
NM/TC/AA/GG	1	1,11	0	0,00	0,06	-	0,803	-
NM/CC/AG/GG	2	2,22	0	0,00	0,14	-	0,704	-
<i>BRCA1</i> (5382insC) / <i>T397C</i> / <i>A351G</i> / <i>Cyp2D6</i> *4(G1846A)								
NM/TT/AA/GA	1	1,11	0	0,00	0,06	-	0,803	-
NM/TC/AA/GA	1	1,11	0	0,00	0,06	-	0,803	-
NM/TC/AG/GG	3	3,33	0	0,00	0,59	-	0,443	-
NM/TC/AG/GA	4	4,44	0	0,00	1,13	-	0,288	-

При моделюванні міжгенної взаємодії у групах хворих на рак та у контролі оцінили ефективність визначених прогностичних моделей міжгенної взаємодії, перевірили їх точність та ефективність. Найбільш інформативними моделями

прогнозування ризику виникнення ЗН ОЖРС було визначено однолокусну 1** модель., що включала ген *ESR1* (T397C), з точністю – 68,23%, відтворюваність якої становила 90% (рис. 12) та дволокусну 2** модель..з двома генами *BRCA1* (5382insC) та *ESR1* (T397C) з точністю, відповідно, 66,11% (табл. 14).

Таблиця 14

**Моделі міжгенної взаємодії у розвитку злоякісної патології ОЖРС
за програмою MDR 2.0 в режимі всебічного пошуку**

Число генів у моделі	Комбінації генів в прогностичній моделі	Відтворюваність моделі	Точність моделі,%
1**	<i>ESR1</i> (T397C)	9/10	68,23
2**	<i>BRCA1</i> (5382insC)/ <i>ESR1</i> (T397C)	8/10	66,11
3*	<i>ESR1</i> (T397C)/ <i>ESR1</i> (A351G)/ <i>Cyp2D6</i> *4(G1846A)	7/10	65,56
4*	<i>BRCA1</i> (5382insC)/ <i>ESR1</i> (T397C)/ <i>ESR1</i> (A351G)/ <i>Cyp2D6</i> *4 (G1846A)	7/10	65,00
*- визначена найкраща модель ($p \leq 0,01$) серед n - генних моделей			
**- визначена найбільш ефективна модель ($p \leq 0,05$) серед n - генних моделей			

Отже, для прогнозування злоякісної патології оптимально, згідно даних дослідження, проводити оцінку поліморфного варіанту гена *ESR1* (T397C), який мав у хворих на злоякісні пухлини ОЖРС найвищий ступінь ентропії - 10,49% та незалежний негативних зв'язок з іншими генами (рис. 14).

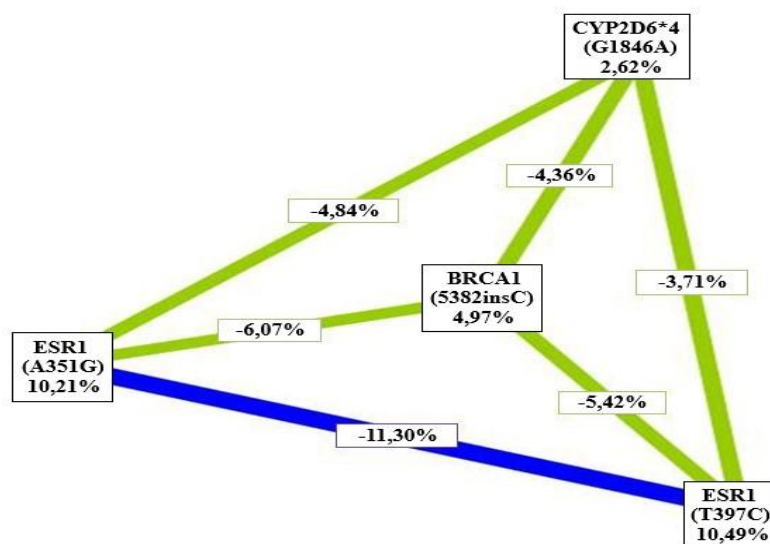


Рис. 14. Графічне відображення результатів аналізу взаємодій між досліджуваними генами у хворих на рак ОЖРС.

Примітки: зелений, синій кольори – антагоністична взаємодія між локусами, інші позначки - див. рис.13.

Після проведення аналізу результатів спеціального лікування та 5-річної виживаності хворих на РМЗ, РЯ та ПМП з досліджуваної групи жінок із злоякісними пухлинами ОЖРС (n=90/100%) було виявлено ознаки пухлинної прогресії у 11/12,2% хворих на РЯ, 4/4,4% - на РМЗ та 4/4,4% пацієнток з ПМП. Загальна частота рецидивного перебігу захворювання на ЗН ОЖРС спостерігалася у 19/21,1% хворих, дані про яких представлено в табл. 15. З 19/100% пацієнток, у яких було виявлено ознаки пухлинної прогресії ЗН ОЖРС, 15/78,9% померли протягом 1-3 років після завершеного комплексного чи комбінованого лікування від прогресування захворювання (табл. 15).

Таблиця 15

Загальна 5-річна виживаність хворих на РЯ, РМЗ та ПМП за прогностичними моделями міжгенної взаємодії ризику виникнення пухлинної прогресії

Злоякісні пухлини ОЖРС	Частота рецидивів, %	Час початку рецидиву після закінченого лікування, виживаність хворих (міс., %)			Визначена прогностична модель міжгенної взаємодії
		Медіана виявлення рецидиву/ міс.	Померли після рецидиву, n/%	5-річна виживаність, %	
І група показників (абс. числа/частота виявлення рецидивів хвороби, n/%)					
РЯ (n=23/11)	47,8%	36	8/72,7%	27,3%	2**
РМЗ (n=21/4)	19,0%	51	2/50%	84,8%	3**
ПМП (n=46/4)	8,6%	97	2/50%	95,7%	2**
ПМП ОЖРС (n=21/2)	9,5%	-	2/100%	84,1%	2**
ПМП ОЖРС+ ОШКТ (n=25/2)	8,1%	-	1/50%	96,0%	1, 2, 3**
Всього рецидивів, n/%	19/21,1%	61,3	15/78,9%	21,1%	
Всього n/%	90/100%				
ІІ група показників (на основі визначених моделей міжгенної взаємодії ризику виникнення рецидивного перебігу онкологічного захворювання ОЖРС)					
Модель міжгенної взаємодії	Комбінація мутацій генів та SNP	Частота появи рецидиву, %	5-річна виживаність, %	Локалізація ЗН ОЖРС	
1*	ESR1 (T397C)	-	-	-	
2**	BRCA1 (5382insC)/ ESR1 (T397C)	47,8	27,3	РЯ	

продовження табл. 15

3**	<i>ESR1 (T397C)/ ESR1 (A351G)/ Cyp2D6*4 (G1846A)</i>	19,0	84,8	PM3
4*	<i>BRCA1 (5382insC)/ES R1 (T397C)/ESR1 (A351G)/ Cyp2D6*4 (G1846A)</i>	-	-	-

При застосуванні багатофакторного аналізу (пропорційна регресійна модель ризику Кокса) визначено найбільш значущі молекулярно-генетичні маркери, що об'єктивно відображають прогноз перебігу захворювання хворих з усіх досліджених груп. При аналізі даних про рецидивний перебіг онкологічної патології та показників смертності від ЗН ОЖРС були визначені найбільш впливові молекулярно-генетичні критерії у вигляді моделей виникнення ризику рецидивного перебігу хвороби в групі хворих на рак ОЖРС. На основі наших даних найбільш інформативною моделлю для прогнозування виявилась дволокусна 2** модель *BRCA1 (5382insC)/ESR1 (T397C)*, що включала мутацію в гені *BRCA1 insC* та поліморфний варіант гена *ESR1 (T397C)*, яка корелювала з появою прогресії злосудного процесу у більшості випадків РЯ, ПМП в загальній групі та при ПМП, що виникали в ОЖРС, а найчастіше була присутня у 47,8% випадках у хворих з рецидивним перебігом РЯ. При РМЗ в усіх випадках пухлинної прогресії захворювання визначалася 3** прогностична модель міжгенної взаємодії (*ESR1 (T397C)/ESR1 (A351G)/Cyp2D6*4 (G1846A)*) комбінації поліморфних варіантів генів *ESR1* та *Cyp2D6*4*, яка мала значний внесок та була присутня у 19% випадках виявлення ознак прогресії захворювання, при цьому 5-річна виживаність демонструвала покращення показника, який склав 84,8% при РМЗ порівняно з 27,3% при РЯ, що також корелює з частотою визначення 2** прогностичної моделі міжгенної взаємодії *BRCA1 (5382insC)/ESR1 (T397C)*.

Отже, ґрунтуючись на результатах проведеного комплексного дослідження на клінічному матеріалі ідентифіковано прогностичні моделі міжгенної взаємодії, що асоційовані із ризиком виникнення доброякісної патології та злосудних пухлин ОЖРС, а також з частотою появи ознак прогресії пухлинного росту при РМЗ та РЯ. Отримані клініко-генеалогічні та медико-генетичні дані про ефективні прогностичні моделі міжгенної взаємодії та комбінації молекулярно-генетичних маркерів перебігу доброякісних і злосудних пухлин ОЖРС з агрегацією ЗН в родовах, допоможуть в практичній діяльності лікарям онкологам оцінити прогноз перебігу РМЗ та РЯ.

ВИСНОВКИ

Варіабельність клінічного перебігу доброякісних та злоякісних пухлин ОЖРС вказує на необхідність пошуку факторів, які дозволять оцінити ризик виникнення новоутворень молочної залози та яєчників, а також прогнозувати агресивний перебіг захворювання на рак зазначених локалізацій. У теперішній час активно проводяться дослідження, спрямовані на визначення молекулярно-генетичних критеріїв, асоційованих із патогенезом доброякісних та злоякісних пухлин ОЖРС у жінок із агрегацією ЗН в родовах. Вивчення широкого спектру клініко-генеалогічних та молекулярно-біологічних критеріїв та можливостей практичного застосування визначених генетичних маркерів для оптимізації ранньої діагностики пухлинних процесів ОЖРС у жінок із родин з обтяженим на рак анамнезом буде сприяти розумінню природи злоякісного процесу, а також в комплексі з ідентифікованими комбінаціями мутацій генів та поліморфних варіантів окремих генів визначити причинно-наслідкові ризики появи рецидивного перебігу пухлинного процесу у хворих на РМЗ та РЯ із сімейною історією раку.

1. На підставі клініко-генеалогічного дослідження серед 1313 осіб жіночої статі визначено родини із агрегацією пухлинної патології, в тому числі по типу синдрому Лінча II: 9,6% практично здорових жінок, 23,1% хворих на РЕ, 29,1% - на РЯ, 40,4% - на РМЗ та 53,6% - на ПМП ОЖРС. Найбільший зв'язок спадкових факторів з ризиком виникнення раку встановлено для жінок, хворих на РМЗ та ПМП ОЖРС.

2. Клініко-генеалогічний аналіз родоводів дозволив встановити, що у родичів пробандів з доброякісною патологією та хворих на рак ОЖРС більшість (62,3%) становлять гормонозалежні пухлини, а саме: РМЗ, РЕ, РЯ та рак щитоподібної залози. Визначено, що на РМЗ хворіли 23,0% родичів пробандів I та II ступенів спорідненості, на РЕ - 21,2%, РЯ - 18,1%. У пацієток з доброякісною та злоякісною патологією ОЖРС частіше ЗН спостерігались серед родичів по материнській лінії, ніж по батьківській.

3. Встановлено, що у 46 хворих на рак ОЖРС, були діагностовані ПМП, з яких 7 (15,2%) за часом виникнення мали синхронний характер, 39 (84,8%) – метакронний. Середній вік появи первинної пухлини становив $49,9 \pm 4,4$ років, частіше (78,7%) синхронне виникнення ПМП спостерігалось у віковому інтервалі 31-60 років, у 60% хворих метакронні пухлини визначались у віці 51-70 років.

4. У пацієток із синхронно розвинутим первинно-множинним раком ОЖРС зустрічались наступні асоціації цієї патології: РМЗ-РЕ, РЕ-РЯ, РЕ-РТК, РЯ-РЕ, РТК-РЯ. За морфологією верифіковано наступні форми раку: інфільтративний протоковий РМЗ; ендометріїдна аденокарцинома ендометрія; ендометріїдний та серозний рак яєчників; аденокарцинома товстої кишки. За розповсюдженістю пухлинного процесу у всіх хворих визначено I-II стадії захворювання, за виключенням РЯ (III стадія), за ступенем диференціювання це були пухлини не вище G2, окрім РЯ (G3). Особливістю ПМП у родичів пробандів є те, що у матерів найчастіше виникали РМЗ та рак ОШКТ, у батьків – РЛ і також рак ОШКТ.

5. Показано, що у 18,2% хворих із ЗН ОЖРС (РМЗ та РЯ) та 15,2% хворих на ПМП ОЖРС, однією з яких був РМЗ чи РЯ, в пухлинній тканині ідентифіковано

мутацію *5382insC* в гені *BRCA1*, при цьому вік пробандів при ПМП на момент виникнення першої локалізації злоякісного новоутворення у носіїв мутації не перевищував 50 років.

6. Доведено, що у ряда хворих на рак ОЖРС з обтяженим онкологічним анамнезом достовірно підвищена частота виявлення мутації *5382insC* в гені *BRCA1* в гетерозиготному стані ($p=0,026$) та, крім того, ідентифікована мутація *6174delT* в гені *BRCA2* у гетерозиготному стані (9,1%).

7. Встановлено, що у хворих на доброякісну патологію ОЖРС з агрегацією ЗН в родовах у 3,75 рази збільшується ризик виникнення доброякісних пухлин молочної залози та яєчників при наявності поліморфних варіантів *351AG+351GG* за геном *ESR1*, а при генотипах *397TC*, *397CC*, *397TC+397CC* ризик зростає у 2,6-5,9 разів, відповідно.

8. Показано, що у хворих на доброякісну патологію та ЗН ОЖРС з агрегацією злоякісних пухлин в родовах при генотипах *1846GA* та *1846AA* за геном *Cyp2D6*4* ризик виникнення пухлин достовірно збільшується в 2,34 та 2,25 рази відповідно ($p<0,05$).

9. На підставі аналізу міжгенної взаємодії у групах хворих з доброякісною патологією ОЖРС доведена ефективність оптимальної прогностичної дволокусної моделі міжгенної взаємодії $2^{**} ESR1 (T397C)/Cyp2D6*4 (G1846A)$ для оцінки ризику виникнення пухлин з точністю відтворення (71,68%) і достовірністю ($p<0,001$).

10. Обґрунтована об'єктивність відтворення ефективної прогностичної молекулярно-генетичної моделі міжгенної взаємодії $1^{**} ESR1 (T397C)$ та $2^{**} BRCA1 (5382insC)/ESR1 (T397C)$ у хворих із ЗН ОЖРС та її достовірність у розвитку злоякісних пухлин з точністю 68,23% та 66,11% відповідно.

11. Встановлено, що у 27,3% хворих на РЯ ознаки пухлинної прогресії відмічаються протягом 1-3 років після завершеного лікування та асоціюються з прогностичною моделлю міжгенної взаємодії $2^{**} BRCA1 (5382insC)/ESR1 (T397C)$.

12. За результатами 5-річної виживаності у 84,8% хворих на РМЗ оптимальною прогностичною моделлю міжгенної взаємодії слід вважати 3^{**} модель $ESR1 (T397C)/ESR1 (A351G)/Cyp2D6*4 (G1846A)$, яка враховує поліморфні варіанти *T397C/A351G* гена *ESR1* та поліморфні варіанти гена *Cyp2D6*4*.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Палійчук О. В. Частота та характеристика сімейного ракового синдрому у хворих на рак яєчника // Здоров'я жінки. – 2016. – №1 (107). – С. 170-175.
2. Палійчук О. В. Мутації в генах *BRCA1* та *BRCA2* у хворих на первинно-множинні пухлини // Репродуктивна ендокринологія. – 2016. - №1 (27). – С. 56-59.
3. Палійчук О. В. Значення клініко-генеалогічного аналізу родоводів у практиці гінеколога // Галицький лікарський вісник. – 2016. – №1 (23). – С. 69-71.
4. О. V. Paliychuk. Frequency and characteristics of family cancer syndrome in ovarian cancer patients // Здоров'я жінки. – 2016. – №2 (108). – С. 155-159.
5. Палійчук О. В. Роль медико-генетичного консультування у виявленні доброякісної та злоякісної патології органів жіночої репродуктивної системи //

Здоров'є жінчини. – 2016. – №3 (109). – С.133-137.

6. Бондар В. М., Палійчук О. В., Галкін Ф. М. Урахування особливостей розповсюдженості пухлинного процесу у черевній порожнині при проведенні ад'ювантної поліхіміотерапії – один із кроків для покращення якості лікування хворих на рак яєчника // Здоров'є жінчини. – Київ.-2008. – №3(36), часть 2. – С.50-52. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, участь у проведенні статистичних досліджень, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

7. Бондар В. М., Палійчук О. В. Актуальні питання раку яєчника: захворюваність, контингенти хворих, індивідуальний моніторинг // Здоров'є жінчини. – Київ.-2009. – №7(43), часть 2. – С.49-51. *(Особистий внесок дисертанта: підбір та аналіз літературних джерел за темою дослідження, узагальнення результатів, написання статті)*

8. Палійчук О. В., Поліщук Л. З., Чехун В. Ф. Впровадження і перші результати онкогенетичного консультування жінок у програмах ранньої діагностики і профілактики передраку і раку органів репродуктивної системи//Онкологія. – 2012. – №3. – С.1-6. *(Дисертантом проведено розробку анкети-опитувальника пробанда, клініко-генеалогічний аналіз родоводів, онкогенетичне консультування пацієнток із доброякісною патологією ОЖРС, онкохворих жінок з РМЗ, РТМ, РЯ та членів їх родин, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

9. Палійчук О. В., Поліщук Л. З., Горовенко Н. Г., Россоха З. І., Галкін Ф. М., Парамонов В. В. Роль генетичних факторів у схильності до розвитку первинно-множинних пухлин органів жіночої репродуктивної системи//Клиническая онкология. – 2013. – №2(10). – С.83-89. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

10. Палійчук О. В., Бондар В. М., Поліщук Л. З., Чехун В. Ф. Дослідження показників метаболізму заліза у хворих на рак яєчника//Онкологія. – 2014. – №1(59).-С.23-27. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

11. Палійчук О. В., Россоха З. І., Поліщук Л. З., Чехун В. Ф. Мутації в генах BRCA1 и BRCA2 у больных раком органов женской репродуктивной системы // Евразийский онкологический журнал. – Приложение. – 2015. – С.26-30. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

12. Палійчук О. В., Россоха З. І., Галкін Ф. М., Поліщук Л. З. Оцінка асоціації клініко-патологічних особливостей пухлинного процесу з результатами клініко-генеалогічного обстеження хворих на рак яєчника та грудної залози – носіїв мутацій 5382insC у гені BRCA1 // Клиническая онкология. – 2015. – №4(20). – С.23-28/ *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

13. Палійчук О. В., Россоха З. І., Галкін Ф. М., Поліщук Л. З. Мутація 6174delT в гені BRCA2 у родині з агрегацією пухлинної патології (опис клінічного випадку) // Онкологія. – 2015. – №4. – С.243-245. *(Дисертантом проведено основну частину*

експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)

14. Палійчук О. В., Россоха З. І. Значення мутації 5382insC у гені BRCA1 у розвитку спадкових і первинно-множинних пухлин // Галицький лікарський вісник. – 2015. – №4(22). – частина 2. – С.91-93. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

15. Палійчук О. В., Россоха З. І. Рак яєчника і мутація 5382insC в гені BRCA1 // Архів клінічної медицини. – 2015. – №2(21). – С.68-70. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

16. Палійчук О. В. Роль медико-генетичного консультування у виявленні доброякісної та злоякісної патології органів жіночої репродуктивної системи // Здоровье женщины. – 2016. – №3 (109). – С.133-137. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

17. О. V. Paliychuk, Z. I. Rossokha, L. Z. Polishchuk, V. F. Chekhun. The frequency of detection of ESR1 gene polymorphisms in patients with benign pathology of female reproductive system organs with cancer positive family history // Буларусский онкологический журнал. – 2016. – №4. – С.42-51. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

18. О. В. Палійчук, Л. З. Поліщук, З. І. Россоха, В. Ф. Чехун. Дослідження поліморфізмів гену ESR1 у хворих на рак органів жіночої репродуктивної системи з обтяженим сімейним анамнезом // Онкологія. – 2016. – Т.18 (70), №4. – С.316-324. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

19. Палійчук О. В., Поліщук Л. З., Россоха З. І. Клінічні аспекти медико-генетичного консультування і генетичного тестування близнюків, у тому числі з родин з сімейним раковим синдромом // Здоровье женщины. – 2016. – №9 (115). – С.142-147. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

20. О. В. Палійчук, Л. З. Поліщук, З. І. Россоха, В. Ф. Чехун. Особливості клінічного використання тестування на поліморфні варіанти гена CYP2D6*4 у пацієнток з доброякісною патологією та хворих на рак органів жіночої репродуктивної системи з родин із сімейним раковим синдромом// Онкологія. – 2017. – Т.19 (71), №1. – С.46-51. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті)*

21. О. V. Paliychuk, Z. I. Rossokha, L. Z. Polishchuk, V. F. Chekhun. Molecular-genetic models for prognosis of development of tumors of reproductive system in women with family history of cancer // Experimental oncology. – 2018. – Т.40(4), №4. – С.1-9. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних молекулярно-генетичних обстежень, участь у розробці*

прогностичних моделей міжгенної взаємодії, написання та оформлення статті)

22. Чехун В. Ф., Палійчук О. В., Поліщук Л. З., Россоха З. І. Спосіб прогнозування індивідуального ризику розвитку раку яєчника у жінок з обтяжених на злякисну патологію родин. u201710976 Патент України на корисну модель №123996. Патент опубліковано 12.03.2018, бюл.№5/2018. *(Дисертантом проведено клініко-генеалогічний аналіз, створено формулу, проведено генетико-математичний аналіз, прийнято участь у написанні та оформленні патенту України на корисну модель).*

23. Чехун В. Ф., Палійчук О. В., Поліщук Л. З., Россоха З. І. Спосіб прогнозування індивідуального ризику виникнення рецидиву у хворих на рак молочної залози із обтяжених на онкологічну патологію родин. u201801286 Патент на корисну модель №126638. Патент опубліковано 25.06.18, бюл. №12/2018. *(Дисертантом проведено клініко-генеалогічний аналіз, створено формулу, проведено генетико-математичний аналіз, прийнято участь у написанні та оформленні патенту України на корисну модель).*

24. Палійчук О. В., Поліщук Л. З., Воробйова Л. І., Парамонов В. В. Скринінг родин із спадково обумовленими формами раку та значення клініко-генеалогічного консультування в онкології//Інформаційний лист №208-2013 (випуск 9 з проблеми “Онкологія”, ухвала ПК “Онкологія”, протокол №1 від 05.04.2013р.). – Київ. – 2013. – С.1-8. *(Дисертантом проведено клініко-генеалогічний аналіз і генетико-математичний аналіз, прийнято участь у написанні інформаційного листа).*

25. Палійчук О. В., Шляга І. В. Досвід профілактики та лікування залізодефіцитних анемії у післяопераційних хворих на злякисні пухлини жіночих статевих органів // Тези науково-практичної конференції “Терапія супроводу в лікуванні онкологічних хворих”. – Анталія. – 2007.

26. Полищук Л. З., Бондарь В. М., Новак Е. Е., Палийчук О. В. Гетерогенность индивидуальных характеристик опухолевого роста у больных раком яичника и ее клиническое значение // Материалы Национального симпозиума с международным участием “Новое в диагностике и комплексном лечении опухолей женской репродуктивной системы”. – Кишинев. – 2008. – С.26.

27. Лук’янова Н. Ю., Бондар В. М., Рябцева О. Д., Палійчук О. В., Поліщук Л. З. Особливості молекулярного фенотипу клітин раку яєчника // Медицина ХХІ століття. – Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 200-річчю від дня народження М.І.Пирогова, 30 листопада 2010 року. – Харків, – 2010. – С.49.

28. Палійчук О. В., Поліщук Л. З. Досвід впровадження медико-генетичного консультування у програми ранньої діагностики передраку і раку органів жіночої репродуктивної системи // Матеріали XII з’їзду онкологів України.-спеціальний випуск II. – Клінічна онкологія. – Київ. – 2011. – С.152.

29. Полищук Л. З., Палийчук О. В., Бондар В. М., Е. Е.Новак. Гетерогенность индивидуальных характеристик опухолевого роста у больных раком яичников и ее клиническое значение // Материалы XII з’їзду онкологів України.-спеціальний випуск II. – Клінічна онкологія. – Київ. – 2011. – С.153.

30. Палійчук О. В., Поліщук Л. З. Досвід впровадження медико-генетичного консультування у програми ранньої діагностики передраку і раку органів жіночої

репродуктивної системи//Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю “Проблеми спадкової та мультифакторної патології”. – Київ. – 2012. – С87.

31. О. Paliychuk, N. Gorovenko, Z. Rossokha. The genetic analyzes in women with cancer and other pathology of female reproductive system // European annual conference of molecular genetics, abstracts, Paris – 2013.

32. Палійчук О. В, Горovenko Н. Г., Россоха З. І., Поліщук Л. З., Чехун В. Ф. Молекулярно-генетичні дослідження у хворих на первинно-множинні пухлини з обтяженим на рак анамнезом //Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю “Проблеми мультифакторної патології та порушень метаболізму”. – Київ. – 2013.

33. О. Paliychuk, V. Chekhun, N. Gorovenko, Z. Rossokha, L.Polishchuk. Molecular genetic studies of peripheral blood in patients with cancer and benign pathology of the female reproductive system from the families with tumor pathology aggregation//second Ukrainian-Swedish Workshop “Translational oncology: old and new paradigms”. – Kiev. – 2013.

34. Палійчук О. В. Досвід використання медико-генетичного консультування і тестування на поліморфні варіанти гену ESR1 у хворих з доброякісною та злоякісною патологією органів жіночої репродуктивної системи // Тези Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 70-річчю Вінницького ОКОД “Сучасні підходи в лікуванні онкологічних хворих”. – Вінниця. – 2015.

35. Палійчук О. В., Поліщук Л. З., Россоха З.І. ”Перші результати впровадження медико-генетичного консультування та молекулярно-генетичних обстежень на виявлення мутацій в генах BRCA-1/2 у хворих з доброякісною та злоякісною патологією органів жіночої репродуктивної системи”, Науково-практична конференція “Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин”. – Яремча – 2015.

36. О. V. Paliychuk, Z. I. Rossokha, L. Z. Polishchuk. Detection of mutations in BRCA1/2 genes in peripheral blood and tumors of patients with cancer and benign pathology of female reproductive system organs // 19th International Meeting of the European Society of Gynecological Oncology (ESGO-2015). – Nice. – France – 2015.

37. Палійчук О. В., Россоха З. І., Поліщук Л. З. Тези “Результати молекулярно-генетичного тестування на мутації в генах BRCA1/2 і поліморфні варіанти гену ESR1 у хворих на рак органів жіночої репродуктивної системи”// Матеріали X з’їзду онкологів України. – Київ. – 2016.

38. Палійчук О. В., Парамонов В. В., Россоха З. І. Тези “Досвід впровадження медико-генетичного консультування в мережі скринінгових центрів “Здоров’я жінки” в Черкаській області// Матеріали науково-практичної конференції “Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоніфікованої терапії раку. – Київ. – 2019.

АНОТАЦІЯ

Палійчук О.В. Клініко-генетичні критерії оптимізації діагностики пухлин органів жіночої репродуктивної системи у хворих з агрегацією злоякісної патології. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2021.

Дисертація присвячена вирішенню актуальної проблеми сучасної онкології – вивченню ролі генетичних факторів у виникненні доброякісних пухлин і раку ОЖРС та оптимізації ранньої діагностики ЗН у жінок з обтяжених на рак родин.

Для реалізації поставленої мети проведено комплексне аналітичне клініко-генеалогічне та молекулярно-генетичне дослідження у 1313 жінок із доброякісними пухлинами, ЗН та умовно здорових осіб. Визначення молекулярно-генетичних критеріїв здійснювали у 210 жінок, з яких у 65 були верифіковані доброякісні пухлини ОЖРС, у 90 – злоякісні, 55 осіб слугували умовним контролем. Для молекулярно-генетичних обстежень жінок з досліджених груп використано біологічний матеріал, зокрема – периферична кров та пухлинна тканина.

Вперше визначено популяційні особливості комбінації рівнів мутаційних змін в генах *BRCA1/2* - *BRCA1 185delAG*, *BRCA1 5382insC* та *BRCA2 6174delT* і поліморфних варіантів генів *Cyp2D6*4 (G1846A)*, *ESR1 (T397C, A351G)* та розроблено прогностичні моделі міжгенної взаємодії, які дозволяють передбачати ризик виникнення доброякісної патології ОЖРС, РМЗ та РЯ в умовно здорових членів родин із ускладненою сімейною історією раку.

Обґрунтовано можливість використання результатів клініко-генеалогічного дослідження та визначених прогностичних моделей міжгенної взаємодії для оцінки ризику виникнення пухлин ОЖРС у жінок з агрегацією ЗН у родовах та прогнозу пухлинної прогресії у хворих на РМЗ та РЯ.

Ключові слова: рак молочної залози, рак яєчників, родоводи, медико-генетичне консультування, клініко-генеалогічний аналіз, агрегація злоякісних пухлин, сімейний раковий синдром, мутації в генах *BRCA1/2*, поліморфні варіанти (SNP) генів *ESR1*, *Cyp2D6*4*, прогностичні моделі міжгенної взаємодії індивідуального ризику раку

АННОТАЦИЯ

Палийчук О.В. Клинико-генетические критерии оптимизации диагностики опухолей органов женской репродуктивной системы у больных с агрегацией злокачественной патологии. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.07 - онкология. - Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, 2021.

Диссертация посвящена решению актуальной проблемы современной онкологии - изучению роли генетических факторов в возникновении доброкачественных опухолей и рака ОЖРС и оптимизации ранней диагностики ЗН у женщин из семей,отягощенных раком.

Для реализации поставленной цели проведено комплексное аналитическое клинико-генеалогическое и молекулярно-генетическое исследование у 1313 женщин с доброкачественными опухолями, ЗН и условно здоровых лиц. Определение молекулярно-генетических критериев осуществляли у 210 женщин, из которых у 65 были верифицированы доброкачественные опухоли ОЖРС, у 90 - злокачественные, 55 - служили условным контролем. Для молекулярно-генетических обследований женщин из исследованных групп использовано биологический материал, в частности - периферическая кровь и опухолевая ткань.

Впервые определены популяционные особенности комбинации уровней мутационных изменений в генах *BRCA1/2* - *BRCA1 185delAG*, *BRCA1 5382insC* та *BRCA2 6174delT*, а также полиморфных вариантов генов *Cyp2D6*4 (G1846A)*, *ESR1 (T397C, A351G)* и прогностические модели межгенного взаимодействия, позволяющие предсказывать риск возникновения доброкачественной патологии ОЖРС, РМЖ и РЯ у условно здоровых членов семей с осложненной семейной историей рака.

Обоснована возможность использования результатов клинико-генеалогического исследования и разработанных моделей межгенного взаимодействия для оценки риска возникновения опухолей ОЖРС у женщин с агрегацией ЗН в родословных и прогноза опухолевой прогрессии у больных РМЖ и РЯ.

Ключевые слова: рак молочной железы, рак яичников, родословная, медико-генетическое консультирование, клинико-генеалогический анализ, агрегация злокачественных опухолей, синдром семейного рака, мутации в генах *BRCA1/2*, полиморфных вариантов генов *ESR1*, *Cyp2D6*4*, модели межгенных взаимодействий индивидуального риска рака

SUMMARY

Paliychuk O.V. Clinical and genetic criteria for optimizing the diagnosis of tumors of the female reproductive system in patients with aggregation of malignant pathology. – A manuscript.

Dissertation for confirmation of the scientific degree of a doctor of medical sciences in the specialty 14.01.07 - Oncology. - RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is dedicated to the resolution of an actual problem - determination of the role of genetic factors in the development of benign tumors and cancers of female reproductive system organs (FRSO), and optimization of early diagnostics of malignant neoplasms (MNs) in females from families burdened with cancer.

To achieve this goal, a comprehensive analytical clinical-genealogical and molecular-genetic study was performed in 1313 females with benign tumors, MN, and conditionally healthy individuals. Determination of molecular-genetic criteria was provided in 210 females, from them 65 persons were verified with benign FRSO tumors, 90 - with malignant tumors, and 55 persons were used as conditional control.

The following research methods were implemented in the work: general clinical, morphological, cytological, histo- and cytochemical, immunohistochemical, clinical-genealogical, molecular-genetic, statistical. Molecular-genetic examinations of females from the studied groups involved the use of biological material, in particular - peripheral blood and tumor tissue.

Based on the results of clinical-genealogical analysis of pedigrees, it was found that the majority of relatives of probands with benign pathology and patients with thyroid cancer (62.3%) suffered from hormone-dependent tumors, namely: breast cancer (BC), endometrial cancer (EC), ovarian cancer (OC), and thyroid cancer. It was determined that BC has 23.0% of probands' relatives of I and II degree of kindred, EC - 21.2%, OC - 18.1%. In patients with benign and malignant pathology of FRSO, MNs were observed more often among relatives on a maternal line, than on a paternal line.

Forty-six of 90 patients with FRSO cancer were diagnosed with primary multiple tumors (PMTs), of which 7 (15.2%) at the time of onset were synchronous, and 39 (84.8%) - metachronous.

It was shown that in 18.2% of women with MNs of FRSO (BC and OC) and 15.2% of patients with PMTs of FRSO, one of which was BC or OC, a mutation of 5382 *insC* in the *BRCA1* gene was identified in the tumor tissue, at that the age of the probands with PMT at the time of the first localization of a malignant neoplasm in the carriers of the mutation did not exceed 50 years.

For the first time, population features of the combination of levels of mutational changes in *BRCA1/2* genes - *BRCA1* 185delAG, *BRCA1* 5382insC and *BRCA2* 6174delT, and polymorphic variants of *Cyp2D6*4* (G1846A), *ESR1* (T397C, A351G) genes were determined. For the first time, on the basis of a comprehensive clinical-genealogical and molecular-genetic study of patients with benign and malignant tumors of FRSO, who were residents of the Cherkasy region, polymorphic variants of genes *Cyp2D6*4* (G1846A),

ESR1 (T397C, A351G), associated with aggregation of malignant tumors in patients' pedigrees, were characterized.

For the first time, molecular-genetic prognostic models have been developed to predict the risk of benign pathology of FRSO, BC and OC in conditionally healthy members of families with a burdened family history of cancer. The best recognized prognostic molecular-genetic model for assessing the risk of benign pathology of FRSO was model 2** with reproducibility accuracy (71.68%) and confidence ($p < 0.001$), which included polymorphic gene variants *ESR1* (T397C)/*Cyp2D6*4* (G1846A).

For malignant tumors of FRSO, the most optimal models were, respectively, 1**/T397C and 2** *BRCA1* (5382insC)/*ESR1* (T397C), whose reliability in the development of malignant tumors was determined with a reproducibility accuracy of 68.23% and 66.11%, respectively.

Prognostic models of intergenic interaction have been developed that allow to optimize the diagnosis of benign tumors of FRSO, BC and OC and are associated with 5-year survival.

For the first time, it was found that in 27.3% of patients with OC the signs of tumor progression are observed within 1-3 years after completion of treatment and are associated with a prognostic molecular-genetic model 2** *BRCA1* (5382insC)/*ESR1* (T397C). At the same time, according to the results of 5-year survival in 84.8% of patients with BC, the optimal prognostic model of intergenic interaction should be considered 3** model *ESR1* (T397C)/*ESR1* (A351G)/*Cyp2D6*4* (G1846A) that accommodate polymorphic variants of *ESR1*, *Cyp2D6*4* gene and polymorphic variants G1846A of *Cyp2D6*4* gene.

The possibility of using the results of clinical and genealogical research and identified molecular-genetic models to assess the risk of FRSO tumors in women with aggregation of malignant tumors in pedigrees and the prognosis of tumor progression in patients with BC and OC is substantiated.

Key words: breast cancer, ovarian cancer, pedigree, medical-genetic counseling, clinical-genealogical analysis, aggregation of malignant tumors, family cancer syndrome, mutations in *BRCA1/2* genes, polymorphic variants of *ESR1*, *Cyp2D6*4* gene, molecular-genetic models of individual cancer risk

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЗН – злоякісні новоутворення
ІГХД – імуногістохімічне дослідження
КРР – колоректальний рак
ОЖРС – органи жіночої репродуктивної системи
ОШКТ – органи шлункового-кишкового тракту
ПМП – первинно-множинні пухлини
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
РМЗ – рак молочної залози
РЯ – рак яєчників
РМТ – рак тіла матки
РЕ – рак ендометрію
РТК – рак товстої кишки
РП – рак простати
РПЗ – рак підшлункової залози
РШ – рак шлунка
РШМ – рак шийки матки
РЛ – рак легень
ЦІН – цервікальна інтраепітеліальна неоплазія
SNP – Single Nucleotide Polimorphism
BRCA ½ - breast cancer gene ½
Cyp2D6 – cytochrome P450 2D6 enzyme gene
ER – рецептори естрогенів
PR – рецептор прогестерону
ESR1 – estrogen receptor 1 (ER-alpha) gene
G1 – високий ступінь диференціювання
G2 – помірний ступінь диференціювання
G3 – низький ступінь диференціювання
Me – медіана