



УДК 618.19-006.55-07-036

О. Ю. Усенко, Р. П. Ромак¹

АЛГОРИТМ ДІАГНОСТИКИ ТА ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ДОБРОЯКІСНИХ ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

ДУ «Національний інститут хірургії і трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України», Київ, Україна,

¹ Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 618.19-006.55-07-036

А. Ю. Усенко, Р. П. Ромак¹

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ГУ «Национальный институт хирургии и трансплантологии имени А. А. Шалимова НАМН Украины», Киев, Украина,

¹ Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Цель данного исследования — разработка алгоритма диагностики и прогнозирования течения доброкачественных пролиферативных заболеваний молочной железы.

Показано, что у женщин с локальными формами доброкачественной дисплазии молочной железы целесообразно определять содержание метилированных ДНК генов *DKK4* и *GSR*. При значении содержания метилированных ДНК гена *GSR* менее 17,8 % и гена *DKK4* менее 33,7 % риск возникновения рака молочной железы является низким. При обнаруженном высоком риске развития рака молочной железы пациентку необходимо раз в полгода обследовать с применением УЗИ и раз в год проводить маммографическое исследование. У женщин старше 40 лет исследования интенсивности метилирования генов *DKK4* и *GSR* целесообразно проводить во всех случаях возникновения опухолей молочной железы, при наличии наследственной предрасположенности и других факторов риска.

Ключевые слова: доброкачественные пролиферативные заболевания, молочная железа, диагностика, прогнозирование.

UDC 618.19-006.55-07-036

O. Yu. Usenko, R. P. Romak¹

ALGORITHM FOR THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF BENIGN PROLIFERATIVE BREAST DISEASES

SI "O. O. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology NAMS Ukraine", Kyiv, Ukraine,

¹ The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Proliferative breast disease include benign dysplasia and breast cancer. Today there are known models for evaluating the risk of breast cancer in women including the most popular models Gail and Claus, as well as less known model BRCAPRO, BOADICEA and Guzick–Tyrer's. These models mainly based on analysis of family history of the disease and is not suitable for assessing recurrence or other complications of breast benign dysplasia.

The **purpose** of this study was to develop an algorithm for diagnosis and prognosis of benign proliferative breast disease.

Methods. The study was conducted at the Odessa Clinical Hospital (Odesa). The control group (30 healthy women aged 28–45 years) were observed according to the clinical examination programs. The first clinical group included 50 women with histologically verified breast fibroadenoma; the second group — 50 women formed from histologically verified 1 stage breast adenocarcinoma. The follow-up term was 2 years. Average age — (51.5±0.8) year in patients with breast cancer and (35.3±1.5) — the group of patients with fibrocystic mastopathy. The average age of the patients in the control group was (38.2±0.8) years.



All women were performed clinical, laboratory and instrumental (ultrasound, magnetic resonance imaging, mammography), postmortem, molecular-genetic (polymerase chain reaction (PCR), pyrosequencing) examinations.

Key gene methylation *DKK4* studied using a set of EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) by PCR and further Pyrosequencing. Analysis of gene methylation *GSR* was held by semiquantitative COBRA. DNA was isolated from tissue samples according to protocol QiAmp DNA Mini Kit (Qiagen, USA). Isolated from tissue samples were subjected to DNA bisulfite treatment according to the protocol EpiTest Bisulfite Kits (Qiagen). The primers were designed using Methyl Primer Express v1.0 (Applied Biosystems).

The risk of breast cancer was evaluated using the model Gail. For statistical processing the software STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., USA) was used.

Results. According to Gail model calculations the risk of breast cancer in women with benign breast diseases did not exceed 1.9% (mean $(1.6 \pm 0.1)\%$). Methylation of *DKK4* gene was higher in breast cancer cases than control values 4.7–5.2 times as much, and the index value as compared to benign tumors — almost twice. Even greater differences are characteristic for gene methylation activity *GSR* — correspondently (51.6 ± 2.5) , (1.5 ± 0.2) and $(4.9 \pm 1.1)\%$ ($p < 0.05$).

It is shown that in women with local forms of proliferative benign lesions of breast is advisable to determine the content of methylated DNA of genes *DKK4*, *GSR*. With the value of methylated DNA gene content *GSR* less than 17.8% and gene *DKK4* less than 33.7%, risk of breast cancer is low. With identified high risk for breast cancer the patient must be examined every six months using ultrasound and once a year mammographic studies. Researching genes *DKK4*, *GSR* methylation intensity is recommended in all cases of breast cancer under genetic susceptibility and other risk factors for women over 40.

Key words: benign proliferative disease, breast, diagnosis, prognosis.

Вступ

Проліферативні захворювання молочної залози (МЗ) включають доброякісні дисплазії МЗ (ДДМЗ), а також рак МЗ (РМЗ). За оцінками вітчизняних та іноземних фахівців, ДДМЗ виявляються у 40–92 % жінок [1; 2]. Розрізняють дифузну кістозну мастопатію, солітарні кісти МЗ, фіброаденоз і фібросклероз МЗ, ектазію протоку МЗ та інші патологічні стани, пов'язані з проліферацією залозистого епітелію МЗ [1].

Зв'язок ДДМЗ і РМЗ залишається предметом дискусії. Згідно з концепцією онконастороженості, найбільший ризик малігнізації мають філоїдні пухлини та комплексні фіброаденоми, до яких належать утворення понад 3 см у діаметрі з переважанням у гістологічній структурі елементів склерозивного аденозу, епітеліальної кальцифікації або папілярної апокринної метаплазії. Для таких ДДМЗ ризик малігнізації зростає до 3,1 %, а за наявності проліферативних змін у паренхімі — до 3,9 %. Втім, малігнізуюча трансформація в епітеліальних компонентах е

казуїстикою, її частота не перевищує 0,02–0,125 % [1; 3]. Водночас ризик РМЗ у жінок із ДДМЗ більш високий порівняно із загальною популяцією [1; 3; 4].

Сьогодні відомі численні моделі оцінки ризику розвитку РМЗ у жінок групи ризику, серед яких найбільшою популярністю користуються моделі Gail і Claus, а також менш відомі моделі — BRCAPRO, BOADICEA та Guzik-Tyler [5]. Усі ці моделі базуються переважно на аналізі сімейної історії хвороби та є малоприсадними для оцінки виникнення рецидивів або інших ускладнень ДДМЗ.

Мета даного дослідження — розробка алгоритму діагностики та прогнозування перебігу доброякісних проліферативних захворювань молочної залози.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведене на базі КУ ООКЛ (Одеса). Контрольну групу утворили 30 практично здорових жінок віком 28–45 років, обстежених відповідно до програм диспансеризації. До I клінічної групи увійшли

50 пацієнок із верифікованою гістологічним дослідженням фіброаденомою МЗ; II групу утворили 50 хворих із верифікованою гістологічним дослідженням аденокарциномою МЗ I стадії. Термін катамнестичного спостереження — 2 роки. Середній вік жінок — $(51,5 \pm 0,8)$ року у групі хворих на РМЗ і $(35,3 \pm 1,5)$ роки у групі пацієнок із фіброзно-кістозною мастопатією (ФКМ). Середній вік обстежених у контрольній групі — становив $(38,2 \pm 0,8)$ року.

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

Пацієнткам здійснювали клінічні, лабораторні, клініко-інструментальні (УЗД, магнітно-резонансна томографія, маммографія), патоморфологічні, молекулярно-генетичні (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), піросеквенування) дослідження.

Активність метилування гена *DKK4* вивчали за допомогою набору EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Orange, CA, США) методом специфічної



ПЛР і подальшого піросеквенування. Аналіз метилування гена *GSR* проводили напівкількісним методом COBRA. Виділяли ДНК зі зразків тканини згідно з протоколом QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Виділену зі зразків тканини ДНК піддавали бісульфитній обробці згідно з протоколом EpiTect Bisulfite Kits (Qiagen, Німеччина). Дизайн праймерів здійснювали за допомогою програми Methyl Primer Express v1.0 (Applied Biosystems).

Додатково оцінювали ризик розвитку РМЗ за допомогою моделі Gail. Для інтерпретації отриманих результатів використовували методи статистичної обробки із застосуванням програмного забезпечення Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США).

Результати дослідження та їх обговорення

При визначенні частоти різних форм ДДМЗ у пацієнток встановлено, що найчастіше у них реєструвалася фіброаденома (62,0 %), значно рідше траплялися локальний (12,0 %) і дифузний аденоматоз (6,0 %), солітарні кісти МЗ (6,0 %), філоїдні пухлини (4,0 %) тощо.

Обтяжений спадковий анамнез щодо патології МЗ виявлено у 44 (88,0 %) хворих, випадки РМЗ у родичів першого ступеня спорідненості (сібсів або за висхідною лінією), за нашими даними, відзначено у 17 (34,0 %) осіб.

Обтяжений гінекологічний анамнез зареєстровано у 25 (50,0 %) жінок із ФКМ і 36 (72,0) % — із РМЗ. У більшості (31, або 62,0 %) пацієнток із ФКМ були супровідні гінекологічні захворювання, у тому числі синдром полікістозних яєчників, ендометріоз і міоми матки. У групі хворих на РМЗ супровідна гінекологічна патоло-

гія зафіксована у 22 (44,0 %) випадках.

У пацієнток із РМЗ найчастіше виявлялися пухлини у стадії Т2 (41, або 82,0 %), рідше — Т1 (9, або 18,0 %). У трьох випадках визначено метастазування в регіональні лімфатичні вузли (N1, N2). Віддалених метастазів не було у жодної хворої.

При вивченні спадкового анамнезу пацієнток встановлено наявність статистично значущих відмінностей за частотою сумарного сімейного накопичення у жінок I та II груп порівняно з контролем. Дві третини обстежених з дифузною мастопатією (70,0 %) мали обтяжений спадковий анамнез ($\chi^2=19,3$; $p<0,05$), а серед жінок контрольної групи — лише кожна четверта (24,0 %).

Рак молочної залози відзначався в анамнезі родичок пацієнток із локалізованими формами ДДМЗ у 12,0 % випадків, а у хворих II групи — у 22,0 %. Відомості про онкологічні захворювання інших органів у родичок пацієнток із дифузною мастопатією наявні у 50,0 % випадків.

Згідно з розрахунками за моделлю Gail, ризик виникнення РМЗ у жінок із ДДМЗ не перевищував 1,9 % (у середньому — $(1,6\pm 0,1)$ %).

Результати метилування генів *GSR* і *DKK4*, одержані у різ-

них групах жінок, наведені у табл. 1.

Як видно з наведених даних, активність метилування гена *DKK4* при РМЗ перевищує контрольні значення у 4,7–5,2 рази, а значення показника при ДДМЗ — майже удвічі. Ще більші відмінності характерні для активності метилування гена *GSR*: $(51,6\pm 2,5)$, $(1,5\pm 0,2)$ та $(4,9\pm 1,1)$ % відповідно ($p<0,05$).

Зв'язок метилування з обтяженим спадковим анамнезом у жінок із ДДМЗ показано на рис. 1.

На підставі одержаних даних нами розроблено алгоритм діагностики та прогнозування перебігу пухлинних процесів МЗ (рис. 2), який передбачає, разом із проведенням рутинних тестів, застосування епігенетичних тестів метилування генів *DKK4* та *GSR*.

За наявності додаткових факторів ризику виникнення ДДМЗ (гінекологічні захворювання, ендокринні порушення, пізні менархе, вік після 35 років, обтяжений спадковий анамнез) відповідно до даного алгоритму проводиться дослідження функціональних поліморфізмів генів *DKK4*, *GSR*, *TOX3*, *SLC4A7* і *MAP3K1*. У пацієнток з локальними формами ДДМЗ виконують епігенетичне дослідження активності

Таблиця 1

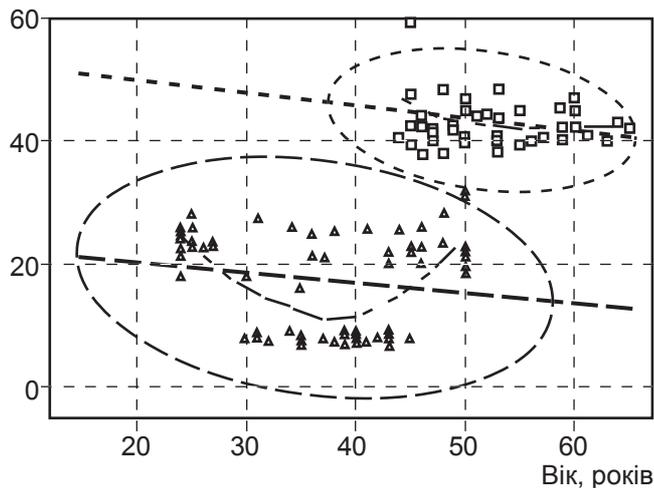
Стан метилування генів *GSR* і *DKK4* в обстежених жінок, %

Ген	Група		
	ДДМЗ	РМЗ	Контроль
<i>DKK4</i>			
<i>DKK4P1</i>	23,3±0,7**	43,7±1,1**	8,4±0,4
<i>DKK4P2</i>	22,7±0,6**	42,8±0,8**	8,7±0,6
<i>DKK4P3</i>	25,1±0,8**	43,0±0,8**	8,5±0,5
<i>DKK4P4</i>	21,6±0,6**	42,1±0,7**	8,6±0,6
<i>DKK4PS</i>	23,2±0,5**	43,3±0,7**	7,8±0,1
<i>GSR</i>	4,9±1,1**	51,6±2,5**	1,5±0,2

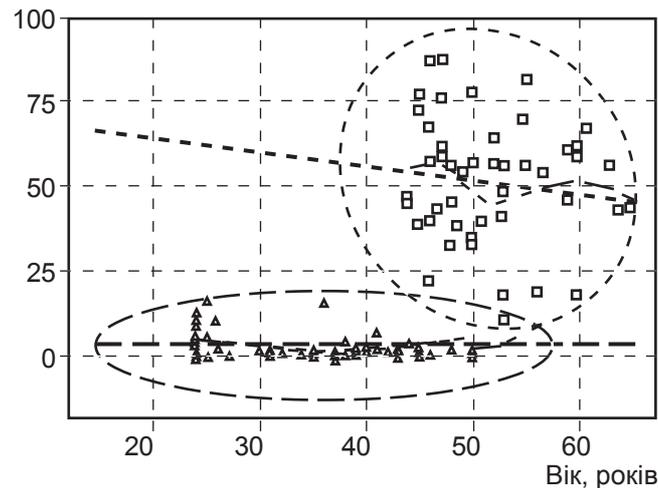
Примітка. * — відмінності з контролем є статистично значущими ($p<0,05$); # — відмінності між клінічними групами є статистично значущими ($p<0,05$).



Метилування гена *DKK4*, %



Метилування гена *GSP*, %



□ так Δ ні

Рис. 1. Особливості спадкового анамнезу залежно від активності метилування генів *GSR* і *DKK4*

метилування генів *DKK4* та *GSR* у біоптаті тканини МЗ. При значеннях коефіцієнта метилування гена *GSR* менше 17,8 % і гена *DKK4* менше 33,7 % ризик виникнення РМЗ є низьким. Запровадження даного алгоритму дозволило на 12,3 % збільшити точність прогнозування розвитку РМЗ у пацієток із проліферативними процесами МЗ за рахунок збільшення показника прогностичності позитивного результату, яка для чинного клінічного протоколу становила 80,2 %.

Висновки

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

2. У жінок після 40 років дослідження інтенсивності метилування генів *DKK4* та *GSR* до-

цільно проводити в усіх випадках виникнення пухлин МЗ за наявності спадкової схильності та інших факторів ризику.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дубініна В. Г. Досвід удосконалення роботи щодо профілактики та раннього виявлення захворювань молочної залози серед жіночого насе-

лення Одеси / В. Г. Дубініна, О. В. Заволока, І. В. Шпак // Одеський медичний журнал. – 2013. – № 2. – С. 72–76.

2. *Prophylactic mastectomy: an appraisal* / F. Zagouri, D. T. Chrysikos, T. N. Sergentanis [et al.] // *Am Surg.* – 2013. – Vol. 79 (2). – P. 205–212.

3. *Follow-up recommendations for benign breast biopsies* / S. Shin, H. B.



Рис. 2. Алгоритм діагностики та прогнозування перебігу пухлинних процесів при локальних формах доброякісної дисплазії молочної залози



Schneider, F. J. Cole-Jr., C. Laronga // *Breast J.* – 2006. – Vol. 12 (5). – P. 413–417.

4. Zavoloka A. Benignant breast tumors diagnosis: recent advances / A. Zavoloka // *Journal of Health Sciences.* – 2013. – Vol. 10, N 3. – P. 665–674.

5. Can the Gail model increase the predictive value of a positive mammogram in a European population screening setting? Results from a Spanish cohort / A. Buron, M. Vernet, M. Roman

[et al.] // *Breast.* – 2013. – Vol. 22 (1). – P. 83–88.

REFERENCES

1. Doubinina V.G., Zavoloka O.V., Shpak I.V. Experience of improvement of work as for prophylaxis and breast diseases timely diagnosing in Odessa women population. *Odes'kyi medychnyi zhurnal* 2013; 2: 72-76.

2. Zagouri F., Chrysikos D.T., Sergentanis T.N. et al. Prophylactic mastectomy: an appraisal *Am Surg* 2013; 79 (2): 205-212.

3. Shin S., Schneider H.B., Cole-Jr. F.J., Laronga C. Follow-up recommendations for benign breast biopsies. *Breast J* 2006; 12 (5): 413-417.

4. Zavoloka A. Benignant breast tumors diagnosis: recent advances. *Journal of Health Sciences* 2013; 10 (3): 665-674.

5. Buron A., Buron M., Roman M. et al. Can the Gail model increase the predictive value of a positive mammogram in a European population screening setting? Results from a Spanish cohort. *Breast* 2013; 22 (1): 83-88.

Надійшла 24.03.2015

УДК 616.62-008.61-07-08

Н. В. Кресюн, В. О. Полясний

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 616.62-008.61-07-08

Н. В. Кресюн, В. А. Полясний

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Актуальность. Патогенез диабетической ретинопатии (ДР) связан с функциональными изменениями нейрональной части сетчатой оболочки, а также с морфологическими нарушениями микроциркуляторной сети, проявляющимися в появлении микроаневризм (МА).

Цель работы состояла в изучении результатов различных методов диагностики ДР, основанных на применении методов исследований функционального состояния сетчатой оболочки, а также методов идентификации МА.

Материал и методы. Наблюдали 52 пациента с ДР (43 пациента с тяжестью проявлений 20 единиц и 9 — 35 единиц по шкале ETDRS). Группа из 17 пациентов, страдающих сахарным диабетом второго типа без признаков ДР (10 единиц по шкале EDTRS), служила контролем. Диагностическую эффективность рассчитывали путем определения чувствительности, специфичности, а также прогностических положительного и негативного показателей в результате диагностики, проводимой с помощью методов многомасштабного текстурного градиента (ММТГ), определения разницы цветности элементов сетчатки — ΔE , контрастной пространственной чувствительности (КПЧ), электроретинографии (ЭРГ) с определением характеристик осцилляционного потенциала (ОП1), расчета скотопического глиального индекса (Кг), оптической плотности макулярного пигмента (ОПМП), а также исследования восстановления зрительных вызванных потенциалов после фотостресса.

Результаты. Чувствительность диагностики ДР с помощью метода определения ΔE превосходила аналогичный показатель, получаемый при применении других диагностических подходов, — КПЧ (на 36,6 %; $p < 0,001$); ОП1 (на 32,9 %; $p < 0,001$); восстановления после фотостресса (на 37,4 %; $p < 0,001$), а также Кг и ОПМП соответственно на 15,0 и 17,3 % ($p > 0,05$). Положительный прогностический индекс при определении ΔE был выше, чем при исследовании КПЧ (на 17,0 %; $p < 0,05$); ОП1 (на 20,6 %; $p < 0,05$); ОПМП (на 24,7 %; $p < 0,01$) и при фотострессе (на 20,1 %; $p < 0,05$). Отрицательный прогностический индекс при исследовании ΔE также превышал соответствующий показатель в группах — КПЧ (на 44,2 %; $p < 0,001$); ОП1 (на 42,5 %; $p < 0,001$); ОПМП (на 30,9 %; $p < 0,01$) и при фотострессе (на 41,7 %; $p < 0,01$). Все исследованные показатели при использовании диагностического критерия ΔE были выше в сравнении с таковыми при использовании ММТГ-диагностики в отсутствие достоверности наблюдаемых различий ($p > 0,05$).

