

Можливості клінічного використання тестування на поліморфні варіанти генів *ESR1* та *CYP2D6*4* у хворих на рак грудної залози та ендометрія

О.В. Палійчук^{1,3}, Л.З. Поліщук¹, З.І. Россоха²

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України, м. Київ

²ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України», м. Київ

³КЗ «Черкаський обласний онкологічний диспансер» ЧОР

Мета дослідження: визначення особливостей поліморфізму генів *ESR1*, *CYP2D6* у хворих на рак грудної залози (РГЗ) і рак ендометрія (РЕ) та оцінювання впливу вивчених генетичних особливостей у порівнянні з рецепторним статусом (імунгістохімічне визначення рівнів експресії ER, PR) пухлин і результатами проведеного лікування.

Матеріали та методи. Було здійснено комплексне клінічне, морфологічне, клініко-генеалогічне і молекулярно-генетичне обстеження 28 жінок: 19 – хворих на РГЗ та 9 – хворих на РЕ, у тому числі 5 хворих із первинно-множинними пухлинами (ПМП) з та без агрегації пухлинної патології у родинах.

Результати. Установлено, що у родинах хворих спостерігаються злоякісні пухлини переважно грудної залози, тіла матки та/або яєчників і травного тракту, що відповідає синдрому Лінча II типу (сімейний раковий синдром). Молекулярно-генетичне дослідження геномної ДНК периферійної крові та гістологічних зрізів пухлин на SNP генів *ESR1*, *CYP2D6*4* у порівнянні з результатами імунгістохімічного дослідження пухлин на рецепторний статус ER, PR у загальній групі обстежених не виявило асоціації між ними, але у пацієнток з РЕ вірогідно частіше фіксували генотипи *397TT* і *351AA* порівняно із хворими на РГЗ (55,55% та 10,5% за генотипом *397TT* і 15,8% за генотипом *351AA* відповідно). У той самий час у пацієнток із РГЗ та первинно-множинними пухлинами (ПМП) органів жіночої репродуктивної системи (ОЖРС), які були носіями мутацій у гені *BRCA1*, був виявлений в усіх випадках позитивний рецептурний статус за ER та PR і несприятливі комбінації поліморфних варіантів генів *ESR1* (*397CC*, *397TC*) та *CYP2D6*4* (*1846GG*, *1846GA*). Це свідчить про комбінований вплив зазначених чинників на розвиток злоякісних новоутворень ОЖРС у родинах із обтяженим на рак сімейним анамнезом. У хворих на РГЗ, які отримували стандартну гормонотерапію тамоксифеном, за наявності генотипу *1846GG* гена *CYP2D6*4* у 3 (15,8%) з 19 (100%) хворих був діагностований рецидив захворювання.

Заключення. Одержані результати дозволяють клінічно використовувати оцінювання частоти поліморфізмів генів *ESR1*, *CYP2D6*4* для підбору індивідуальної схеми гормонотерапії у хворих на рак грудної залози та підвищення ефективності диспансерного спостереження після закінчення спеціальної терапії таких пацієнток і персоналізації схем комплексного і комбінованого лікування.

Ключові слова: рак грудної залози, рак ендометрія, родоводи, сімейний раковий синдром, одонуклеотидні заміни, поліморфізми (SNP) генів *ESR1*, *CYP2D6*4*.

Сучасний етап розвитку онкології характеризується удосконаленням традиційних шляхів профілактики і діагностики злоякісних пухлин різного генезу. Збільшення захворюваності на рак грудної залози (РГЗ), яєчника, тіла матки (РТМ) та

інших органів висуває на передові позиції нові методи ранньої діагностики і профілактики раку, які можуть бути засновані на досягненнях молекулярної онкології. Тому все більшого поширення набуває медико-генетичне консультування і генетичне тестування хворих зі злоякісними процесами.

Першим етапом під час проведення медико-генетичного консультування є вивчення сімейної історії раку (cancer family history) шляхом клініко-генеалогічного вивчення родоводу пробанда (особа, родовід якої аналізується) та визначення кількості хворих на рак різної локалізації у декількох поколіннях родини. Другий етап – це тестування пробанда і членів родини на наявність мутації генів-супресорів пухлинного росту *BRCA1* і *BRCA2*, в також поліморфізму гена рецептора естрогену *ESR1*. Установлення таких генетичних змін є свідомим існування генетичної складової пухлинної хвороби [1, 2, 4, 5].

За даними досліджень останніх років, сімейству ферментів цитохромоксидаз CYP належить важлива роль у процесі знешкодження більшості відомих шкідливих сполук екологічного походження, ендогенних метаболітів та ліків. Активність ферментів CYP, що здійснюють першу фазу детоксикації, залежить від структури генів, які їх кодують. В окремих випадках при високій активності ферментів першої фази детоксикації та низькій активності ферментів другої фази спостерігається зростання шкідливого впливу на організм за рахунок зростання клітинної токсичності проміжних сполук та їхнього недостатнього виведення з організму. Окрім того, завдяки наведеним властивостям метаболічних перетворень ліків мають різну спрямованість та впливають на ефективність лікування і ризик виникнення токсичних ефектів.

Вважають, що фермент *CYP2D6* на клітинному рівні задіяний у перетворенні майже 90% шкідливих сполук, ендогенних метаболітів та ліків, а особливості та швидкість метаболічних перетворень визначають як ризик розвитку онкологічних захворювань, так і особливості відповіді на лікування або чутливість до цитостатичної терапії. Формування у пацієнтів фенотипу підвищеної чутливості до дії несприятливих чинників та небажаного ефекту при вживанні ліків пов'язане із успадкованою зміною у структурі гена. Альтернативний варіант гена *CYP2D6*4* представлений одонуклеотидною заміною *G1846A* у послідовності гена, за наявності якої продукується фермент зі зниженою або відсутньою каталітичною активністю. У виконаному в Україні дослідженні було встановлено, що наведений поліморфний варіант гена модифікує ризик розвитку доброякісної патології та раку органів жіночої репродуктивної системи (ОЖРС) [3].

У більшості опублікованих на сьогодні робіт досліджувалися механізми зниження чутливості до тамоксифену за наявності певних альтернативних варіантів гена *CYP2D6*. Фермент *CYP2D6* було визнано необхідним для перетворення тамок-

сифену в проміжній активний метаболіт ендоксифен, що має виражену терапевтичну антиестрогенну дію. А генетичні варіанти впливають на швидкість та ефективність утворення активного метаболіту і відповідь на лікування.

Під час попереднього аналізу сімейних випадків злоякісної та доброякісної патології у жінок Черкаського регіону було визначено зростання ризику розвитку пухлин залежно від наявних у пацієнтів поліморфних варіантів за геном *ESR1*, які впливають на зниження чутливості рецепторів та появу гіперестрогенемії [2, 3]. Оцінка поєданого впливу стану естрогенових рецепторів та проканцерогенів навколишнього середовища, що активуються в першій фазі детоксикації, на ризик новоутворень та їхній перебіг і результати лікування досі не вивчалась. Тому, за даними різних авторів, необхідний комбінований аналіз з урахуванням гістологічних особливостей пухлин [6–12].

Мета дослідження: визначення особливостей поліморфізму генів *ESR1*, *CYP2D6* у хворих на РГЗ і РТМ та оцінювання впливу вивчених генетичних особливостей у порівнянні з рецепторним статусом (імуногістохімічне визначення рівнів експресії ER, PR) пухлин і результатами проведеного лікування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Протягом останніх 5 років були проведені клінічні, клініко-генеалогічні та молекулярно-генетичні дослідження у хворих на злоякісні пухлини ОЖРС. Для здійснення поставленої мети було використано анкетний метод одержання клініко-генеалогічних даних, первинні хворі на РГЗ та РТМ заповнювали розроблену нами анкету та у подальшому проходили повне медико-генетичне консультування в онкогенеколога. Після проведення клініко-генеалогічного аналізу родоводів встановлювали наявність чи відсутність сімейного ракового синдрому (СРС). Молекулярно-генетичні методи включали ідентифікацію поліморфних варіантів *T-397C*, *A-351G* за геном *ESR1* та за геном *CYP2D6*4 (G1846A)* у периферійній крові і операційному матеріалі шляхом проведення мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Молекулярно-генетичні дослідження проведені у ДУ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України».

У дослідження залучено 28/100% хворих на рак ОЖРС: 19/67,9% зі злоякісними пухлинами грудної залози та 9/32,1% – хворих на рак ендометрія (РЕ), у тому числі у 5 жінок були виявлені синхронні чи метакронні первинно-

множинні пухлини (ПМП) ОЖРС: 2 хворі на білатеральний РГЗ та метакронний рак яєчника (РЯ) через 2 і 3 роки відповідно; 1 хвора на РГЗ та РЯ, що виник також метакронно через 2 роки; 1 хвора на РГЗ з метакронним РЯ через 7 років; одна хвора на РМЗ, що виник метакронно через 3 роки після лікування з приводу раку щитоподібної залози. Усі обстежені жінки за національністю були українками.

Усі пробанди отримали комплексне обстеження згідно зі стандартами обстеження хворих, прийнятими в Україні. Під час бесіди з пробандом та під час заповнення анкети звертали увагу на наступні дані: кількість родичів I–III ступеня споріднення, які хворіли на рак, їхнє родинне відношення до пробанда. Клініко-генеалогічний аналіз здійснювали за Амстердамськими критеріями II (три або більше родичів з Лінч-асоційованими пухлинами – колоректальний рак, РГЗ, РТМ, РЯ, рак шлунка та інші, при цьому один з онкологічних хворих повинен мати I ступінь споріднення з іншими родичами, а злоякісні пухлини – мінімум у двох поколіннях). У більшості пацієнок із досліджуваної групи як при РГЗ (68,4%), так і при РЕ (55,5%) після аналізу родоводів був виявлений СРС за типом Лінча II (табл. 1). Усі хворі на РГЗ та РЕ, у яких проведено клініко-генеалогічне обстеження, отримали медичну допомогу, у тому числі хірургічне, комплексне або комбіноване лікування при раку згідно із стандартами лікування хворих в Україні у КЗ «Черкаський обласний онкологічний диспансер» ЧОР. Стадію пухлинного процесу у хворих на рак оцінювали за класифікацією FIGO, верифікацію пухлин здійснював морфолог. В операційному матеріалі РГЗ та РЕ всіх хворих були проведені імуногістохімічні дослідження на виявлення рівнів експресії ER та PR. Усі пробанди дали письмову згоду на використання результатів дослідження біологічного матеріалу у наукових розробках.

Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів гена *ESR (A-351G, T-397C)* та гена *CYP2D6*4 (G1846A)* проводили у зразках периферійної крові 28 хворих на РГЗ (n=19) та РЕ (n=9). Забір периферійної крові здійснювали у стерильні пробірки закритої системи «Моновет» об'ємом 2,5 мл з етилендіамінтетрауксусною кислотою (ЕДТА) виробництва фірми «Sarstedt». Стерильні пробірки з отриманим матеріалом зберігали за температури -20°C (не більше 1 міс) у морозильних камерах до транспортування у молекулярно-генетичну лабораторію ДЗ «Референс-центр з

Таблиця 1

Розподіл і характеристика злоякісних пухлин ОЖРС в обстежених пацієнок (n=28)

Злоякісна патологія	Кількість обстежених пацієнок, n (%)	Наявність СРС згідно з аналізом родоводів, n (%)	Без агрегації пухлинної патології у родоводах, n (%)
РГЗ, n=19 (100%)	19 (67,8)	13 (68,4)	6(31,6)
РЕ, n=9 (100%)	9 (32,2)	5 (55,5)	4 (45,5)
Первинно-множинні пухлини (комбінація злоякісних пухлин ОЖРС), n=5 (100%)	+ 5 (17,9)	-	5 (100)

Таблиця 2

Розподіл пробандів (хворі на РГЗ та РЕ) за середнім віком і медіаною віку

Обстежені пацієнтки, n=28 (100%)	Вік, роки					
	29-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-72
Хворі на РГЗ, n (10%)	1 (5,3)	4 (21,1)	11 (57,8)	3 (15,8)	-	-
Медіана Середній вік, роки	44 44,6					
Хворі на РЕ, n (%)	-	1 (11,1)	1 (11,1)	2 (22,2)	5 (55,5)	-
Медіана Середній вік, роки	56 57,2					
Усього, n (%)	1 (3,5)	5 (17,9)	12 (42,8)	5 (17,9)	5 (17,9)	-

Репродуктивно-менструальний статус обстежених хворих (n=28) на РГЗ (n=19) та РЕ (n=9)

Показник		Кількість хворих на рак ОЖРС, n= (%)	
Початок менархе	До 12 років	28 (100)	9 (32,1)
	12-15 років		17 (60,7)
	Понад 15 років		2 (7,1)
Кількість пологів	0	28 (100) (пологи були у 21 пацієнтки)	7 (25)
	1-2 пологів		17 (60,7)
	Більше 3		4 (14,3)
Кількість абортів	0	28 (100)	20 (71,4)
	1-2		1 (3,6)
	Більше 3		7 (25)
Кількість викиднів	0	28	26 (92,9)
	1-2		2 (7,1)
	Більше 3		-
Лактація	Не було	28 (100)	-
	До 6 міс		-
	6-12 міс		21 (75)
	>1 року		-
Кількість днів менструації	До 3днів	19 (100)	-
	4-6 днів		17 (89,5)
	7 днів та більше		2 (10,5)
Тривалість менструального циклу	Регулярний (24-32 доби)	28 (100)	28 (100)
	Нерегулярний (більше 32 днів)		-
Тривалість менопаузи	До 5 років	9 (100)	3 (33,3)
	5-10 років		1 (11,1)
	Більше 10 років		5 (55,6)
Операції на ОЖРС в анамнезі	Не було	-	-
	На придатках матки		-
	На грудних залозах		-
Діагностика пухлин	На профогляді	9 (РТМ після УЗД) 19 (РГЗ)	9 (32,2)
	Самостійно		19 (67,8)
	Онкологом		-

молекулярної діагностики МОЗ України» (м. Київ). Транспортування зразків здійснювали у замороженому стані в холодильних контейнерах. Для виділення ДНК із периферійної крові використовували комерційний набір «ДНК-сорб-В» (відповідно до інструкції, наданої виробником). Визначення поліморфізму досліджуваних генів проводили, використовуючи ПЛР з реагентами фірми ThermoScientific, для постановки ПЛР використовували модифікований протокол з відповідними праймерами. Стан отриманого ампліфікаційного фрагмента аналізували за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі. Амплікони підлягали гідролітичному розщепленню ендонуклеазами рестрикції, отримані фрагменти аналізували методом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Рестрикцію проводили у мікротермостаті при температурі 37 °С протягом 12 год.

Рестрикцію поліморфних варіантів гена *ESR1* зупиняли, зігріваючи 20 хв за температури 65 °С. Отримані фрагменти аналізували, проводячи електрофорез у 2% агарозному гелі з

додаванням бромистого етидію та подальшою візуалізацією за допомогою комп'ютерної системи Vitran.

Для визначення поліморфних варіантів гена *CYP2D6*4 (G1846A)* використовували модифіковані протоколи з олігонуклеотидними праймерами із застосуванням методу ПЛР та наступним аналізом ПДРФ. Специфічні фрагменти гена *CYP2D6*4 (G1846A)* ампліфікували із застосуванням комерційного набору DreamTaqGreen PCR MasterMix (фірма «ThermoScientific», США) з дотриманням умов проведення реакції.

Пробірки з готовою ампліфікаційною сумішшю ставили в ампліфікатор «FlexCyclerBU» (AnalyticJena, Німеччина) для забезпечення відповідного температурного режиму ПЛР.

Рестрикцію проводили у мікротермостаті за температури 37 °С протягом 12 год. Стан ампліфікаційних фрагментів аналізували у 3% агарозному гелі (агароза фірми «ThermoScientific», США) з додаванням бромистого етидію,

Частота виявлення злоякісних пухлин у хворих на рак родичів пробандів за даними родоводів

Дані онкогенетичного консультування та клініко-генеалогічного аналізу родоводів		Хворі на рак ОЖРС (n=28/100%), з них в 11/39,3% був виявлений СРС (47/100% хворих на рак родичів у родовах 28 пробандів)
I ступінь споріднення (носії два та більше родичів)	Материнська лінія	Хворіли на рак 11 (23,4%)
	Батьківська лінія	Хворіли на рак 8 (17,0%)
II ступінь споріднення (два та більше родичів, до шести)	Материнська лінія	Хворіли на рак 19 (40,4%)
	Батьківська лінія	Хворіли на рак 9 (19,2%)

маркера молекулярної маси GeneRuler 50 bpDNALadder («ThermoScientific», США) та подальшою візуалізацією за допомогою комп'ютерної програми Vitran. Візуалізували отримані результати у транслюмінаторі.

Статистичне оброблення виконували із використанням програм MSExcel 2010 та Statistica10. Для аналізу відмінностей отриманих числових показників використовували методи варіаційної статистики, а частот генотипів – критерій Пірсона χ^2 , за об'єму вибірки менше 10 застосовували поправку Йетса та розраховували показник співвідношення шансів (oddsratio, OR) з довірчим інтервалом (95% confidence interval, CI).

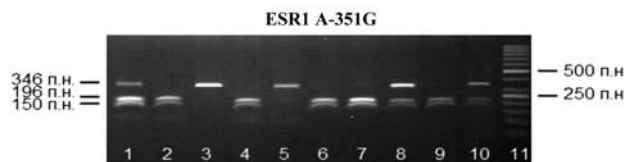
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Серед загальної кількості обстежених (n=28/100%) найбільшою була кількість хворих на РГЗ (n=19/67,8%), РЕ (n=9/32,2%), серед цих хворих у 5 випадках були виявлені метакронні або синхронні ПМП (n=5/17,9%) (див. табл. 1). Вік хворих на рак ОЖРС із обтяжених на рак родин та без агрегації пухлинної патології у родовах коливався в однакових межах – від 29 до 72 років (табл. 2). Значення середнього віку та медіани за 10-річчями мали достовірні відмінності у групах обстежених жінок, хворих на РГЗ та РЕ: РГЗ виникав у пацієнок в середньому більше ніж на 10 років раніше, ніж РТМ (p<0,05).

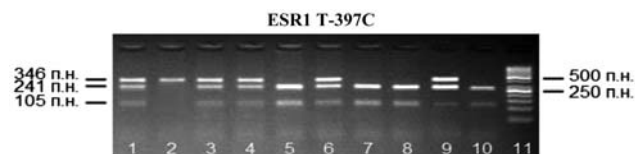
Репродуктивно-менструальний статус обстежених жінок, хворих на рак ОЖРС, наведений у табл. 3 (за даними акушерського анамнезу між групами хворих на РГЗ та РЕ не виявлено статистично достовірних розбіжностей, тому всі вони представлені разом).

Як видно з наведеної таблиці, у хворих на РГЗ та РЕ менархе частіше спостерігалось у віці 12–15 років, також у більшості пацієнок (>70%) не було абортів та викиднів в анамнезі, а пологи спостерігалися у межах 1–2 рази за життя. У 75% жінок були пологи, крім того, тривалість лактації у них становила 6–12 міс, менструальний цикл у всіх обстежених пацієнок був регулярний, операції на придатках та грудних залозах у минулому нікому з них не проводили. Найбільша кількість хворих на РГЗ самостійно виявляли у себе пухлину, яка потім була верифікована під час огляду в онколога. Стосовно РЕ, то у всіх випадках він був виявлений під час проходження профогляду у гінеколога після дообстеження за допомогою УЗД органів малого таза вагінальним датчиком, що в подальшому привело до проведення роздільного діагностичного вишкрібання та верифікації РЕ. Це свідчить про необхідність та важливість санітарно-просвітницької роботи серед населення стосовно своєчасної діагностики раку для збільшення обізнаності жінок за наявності в їхніх родинах хворих на рак родичів. Наведене диктує необхідність проведення клініко-генеалогічного аналізу родоводів на первинному огляді хворих сімейним лікарем, гінекологом чи іншими спеціалістами.

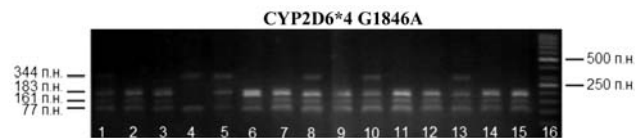
Аналіз клініко-генеалогічних даних у 28 родовах хворих на РГЗ (n=19) та РТМ (n=9) виявив агрегацію злоякісної патології, а саме – 47 (100%) випадків раку у роди-



Мал. 1. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу фрагмента гена ESR1 (A-351G).
Зразки: 1, 8, 10 – генотип AG; 2, 4, 6, 7, 9 – генотип AA; 3, 5 – генотип GG; 11 – маркер молекулярної маси



Мал. 2. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу фрагмента гена ESR1 (T-397C).
Зразки: 1, 3, 4, 6, 9 – генотип TC; 2 – генотип CC; 5, 7, 8, 10 – генотип TT; 11 – маркер молекулярної маси



Мал. 3. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу поліморфізму CYP2D6*4G1846A.
Зразки: 1, 5, 8, 10, 13 – генотип GA; 2, 3, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 15 – генотип GG; 4 – генотип AA; 16 – маркер молекулярної маси

нах, серед яких переважали злоякісні пухлини ОЖРС: РЕ – 8 (17%), РГЗ – 9 (19,1%), РЯ – 2 (4,3%) та 14 (29,8%) випадків раку органів травного тракту (ТТ) – колоректальний рак, рак шлунка, рак підшлункової залози та інші локалізації пухлин (рак шийки матки, рак легень, рак гортані та ін.). Частота раку ОЖРС, гормонозалежних пухлин була достатньо великою і становила 33 (70,2%).

За результатами клініко-генеалогічного аналізу родоводів 28 (100%) хворих на РГЗ та РЕ (віком від 29 до 72 років), у 18 (64,3%) випадках у родинах яких були хворі на рак 2–6 родичів I та II ступенів споріднення (синдром Лінча II), на рак частіше хворіли родичі пробандів по материнській лінії (30/63,8%), ніж по батьківській (17/36,2%), що відображено у табл. 4. При проведенні аналізу родоводів (див. табл. 1) виявлено статистично достовірне підвищення частоти виникнення СРС у хворих на РГЗ порівняно з пацієнтками із РЕ (68,4% та 55,5% відповідно).

Усім первинним хворим на РГЗ та РЕ, яким проведено медико-генетичне консультування, незалежно від наявності або відсутності агрегації злоякісних пухлин у родовах було проведено молекулярно-генетичне дослідження гістологічного матеріалу видалених пухлин чи периферійної

Порівняльний аналіз даних ступеня диференціювання і рецепторного статусу злоякісних пухлин ОЖРС з результатами молекулярно-генетичних досліджень у хворих на РМЗ та РЕ

№ спостереження	Діагноз	Ступінь диференціювання G	ESR1 T397C	ESR1 A351G	BRCA1	BRCA2	Cyp2D6 G1846A	ER	PR
107-ПМП	РГЗ+РЯ	3	CC	GG	+5382insC	-	GG	2+	2+
101	РГЗ	2	TC	AG	-	-	GA	2+	2+
91- ПМП	Білатеральний РГЗ+РЯ	2+2+2	ТТ	АА	-	-	GG	2+	1+
83	РГЗ	2	TC	AG	-	-	GG	2+	2+
76	РГЗ	2	TC	AG	+5382insC	-	GA	1+	1+
70	РГЗ	3	CC	AG	-	-	GA	1+	1+
68	РГЗ	1	CC	AG	-	-	GG	1+	1+
64	РГЗ	2	TC	AG	-	-	GA	2+	3+
63	РГЗ	3	TC	AG	+5382insC	-	GA	1+	1+
60 - ПМП	РГЗ + рак ЩЗ	2	CC	AG	-	-	GG	1+	1+
59	РГЗ	3	TC	AG	-	-	GG	1+	1+
54	РГЗ білатеральний + РЯ	2+2+2	ТТ	АА	+5382insC	-	GA	2+	2+
53	РГЗ	2	TC	AG	-	-	GG	2+	2+
42	РГЗ	1	CC	GG	-	-	GA	-	-
15	РГЗ	1	TC	AG	-	-	GA	1+	1+
27	РГЗ	3	TC	AG	-	-	GG	-	-
24	РГЗ	3	TC	AG	-	-	GG	-	-
23	РГЗ	3	TC	АА	+5382insC	-	GA	1+	-
37	РГЗ	1	TC	AG	-	-	GG	1+	1+
*ПМП (n=5)									
106	РЕ	3	ТТ	АА	-	-	GG	2	2+
96	РЕ	3	ТТ	АА	-	-	GG	1+	2
35	РЕ	1	ТТ	АА	-	-	GG	2+	2+
33	*РМЗ+РЕ	2+1	TC	AG	-	-	GG	1+	2+
28	РЕ	2	ТТ	АА	-	-	GG	2+	2+
20	РЕ	1	TC	AG	-	-	GG	2+	2+
16	РЕ	1	ТТ	АА	-	-	GG	1+	3+
13	РЕ	1	CC	GG	-	-	GA	2+	2+
7	РЕ	1	CC	GG	-	-	GG	2+	2+

Примітки: * РГЗ – 19, з них 5 ПМП (2 – з білатеральним РГЗ+РЯ, 1 – з РГЗ+РЯ, 1 – з РГЗ+РЕ, 1 – хвора з РГЗ та раком щитоподібної щалози), РЕ – 9 (1 з них входить до обох груп пацієнток, позаяк у неї виявлена ПМП РЕ+РГЗ).

крові на виявлення мутацій у генах *BRCA1* (185delAG, 5382insC) та *BRCA2* (6174delT), які були детально описані у літературі [1], і поліморфізмів генів *ESR1* (A-351G, T-397C) та *CYP2D6*4* (G1846A).

Молекулярно-біологічне дослідження поліморфізмів гена *ESR1* (A-351G, T-397C) включало виявлення продуктів рестрикційного аналізу фрагмента гена *ESR1* у матеріалі РГЗ і РЕ, результати якого представлені на мал. 1 і 2.

Рестрикційні фрагменти ДНК гена *CYP2D6*4* G1846A з молекулярною масою 183 п.н., 161 п.н. і 77 п.н. відповідали генотипу GG, з молекулярною масою 344 п.н. і 77 п.н. – генотипу AA, а з молекулярною масою 344 п.н., 183 п.н., 161 п.н. і 77 п.н. – генотипу GA (мал. 3).

За результатами проведених гістологічних та іму-

ногістохімічних досліджень матеріалу видалених пухлин виявлено, що при РГЗ частіше спостерігався G2–3 ступінь диференціювання пухлин (помірно- та низькодиференційовані), а саме – у 15 (78,9%) з 19 (100%) хворих на РГЗ, а при РЕ – G1 (високодиференційований) у 6 (75%) з 8 (100%) хворих на РТМ. Проведене молекулярно-генетичне тестування на мутації у генах *BRCA1,2* обстежених хворих не виявило в жодному з випадків мутації у гені *BRCA2*, але у 5 пацієнток саме з РГЗ та за наявності СРС за даними родоводів була виявлена одна й та сама мутація – 5382insC у гені *BRCA1* (табл. 5).

Молекулярно-генетичне дослідження геномної ДНК периферійної крові та гістологічних зрізів пухлин на SNP генів *ESR1*, *CYP2D6*4* у загальній групі обстежених пацієнток з

Розподіл поліморфних варіантів генів **ESR1 (A-351G, T-397C)** та **CYP2D6*4 (G1846A)** у хворих на РГЗ та РЕ

Хворі на рак ОЖРС, n=28	ESR1 (T-397C)	ESR1 (A-351G)	CYP2D6*4 (G1846A)
РГЗ (n=19/100%)	TT – 2/10,5% TC – 12/63,2% CC – 5/26,3%	AA – 3/15,8% AG – 14/73,7% GG – 2/10,5%	GG – 10/52,6% GA – 9/47,4% AA – 0
РЕ (n=9/100%)	TT – 5/55,5% TC – 2/22,2% CC – 2/22,2%	AA – 5/55,5% AG – 2/22,2% GG – 2/22,2%	GG – 8/88,9% GA – 1/11,1% AA – 0

РГЗ та РЕ не виявило асоціації з імуногістохімічним рецепторним статусом виявлених пухлин. Генотипи, для яких нами було виявлено при попередньому аналізі зв'язок з розвитком злоякісних новоутворень, були однаково поширені у пацієнок з позитивними рівнями експресії ER та PR. Але при РЕ в усіх випадках пацієнтки мали позитивний рецепторний статус за рецепторами естрогену і прогестерону – 9 з 9/100%, а при РГЗ – у 16/84,2% хворих з 19/100% був виявлений позитивний статус за двома рецепторами (10/52,6% випадків РГЗ з молекулярним типом люмінальний тип А та 6/31,6% – з люмінальним типом В). У той самий час у 3/15,8% пацієнок діагностований тричі негативний молекулярний тип РГЗ (з урахуванням даних рівнів експресії мембранного білка рецептора епідермального фактора росту her2/neu, який пов'язують з негативним прогнозом перебігу захворювання), окремо her2/neu-позитивного молекулярного типу РГЗ у групі обстежених виявлено не було.

Під час порівняння поширення генотипів за геном *ESR1* у пацієнок з РГЗ та РЕ було встановлено, що у пацієнок з РТМ частіше виявляли генотипи *397TT* і *351AA* порівняно з пацієнтками з РГЗ (55,55% та 10,5% за генотипом *397TT* і 15,8% за генотипом *351AA* відповідно), що відображено у табл. 6.

У той самий час у пацієнок із РГЗ та ПМП ОЖРС, які були носіями мутацій у гені *BRCA1*, був виявлений в усіх випадках позитивний рецептурний статус за ER та PR і несприятливі комбінації поліморфних варіантів генів *ESR1* (*397CC*, *397TC*) та *CYP2D6*4* (*1846GA*), що свідчить про комбінований вплив зазначених чинників на розвиток злоякісних новоутворень ОЖРС у родинах із обтяженим на рак сімейним анамнезом.

У хворих на РГЗ, які отримували стандартну гормонотерапію тамоксифеном (20 мг на добу протягом 5 років після закінчення комплексного чи комбінованого лікування РГЗ), було виявлено комбінації генотипів *1846GA* за геном *CYP2D6*4* та *ESR1* (*397 TC*, *397CC*; *351 AG*, *351GG*) у 3 (75%) з 4 (100%) пацієнок з рецидивами захворювання (через 2–3 роки після спеціального лікування). Пацієнтка з комбінацією генотипів *CYP2D6*4* (*1846GA*) / *ESR1* (*397CC*, *351GG*) померла внаслідок рецидиву. Одержані результати клінічного використання оцінки частоти поліморфізму генів *ESR1*, *CYP2D6*4* можуть бути використані для підбору індивідуальної схеми хіміотерапевтичного лікування (ураховуючи участь *CYP2D6* у метаболізмі лікарських препаратів, у тому числі цитостатиків) і гормонотерапії (ураховуючи дані про відсутність трансформації тамоксифену в активну субстанцію в організмі людини за наявності несприятливих поліморфізмів гена *CYP2D6*4*) у хворих на РГЗ з метою підвищення ефективності лікування за рахунок його персоналізації та покращення загального прогнозу виживаності у хворих.

Отже, за однакових передумов та генетичної схильності, зумовленої кількома факторами, у пацієнок з генотипом *397TT* частіше виявлятимуть РЕ. Як видно з табл. 5 та 6, було виявлено у гістологічних зрізах мутацію у гені *BRCA1* у 4 пацієнок з РГЗ та ПМП з позитивним статусом рецепторів. У всіх чотирьох пацієнок були виявлені несприятливі поліморфні варіанти генів *ESR1* та *CYP2D6*, а у трьох з них –

їхні комбінації. Виявлені особливості свідчать про комбінований вплив зазначених чинників на розвиток злоякісних новоутворень у родинах із агрегацією злоякісних пухлин та про необхідність комплексного молекулярно-генетичного обстеження таких пацієнок та їхніх родичів.

Отримані результати відкривають перспективу нової стратегії подальших досліджень проблеми ранньої діагностики і профілактики злоякісних пухлин ОЖРС. Її спрямованість полягає не тільки у виявленні родин із накопиченням злоякісних пухлин у родовах, але і у виявленні носіїв мутацій генів-супресорів *BRCA1* та *BRCA2*, поліморфних варіантів генів *ESR1* та *Cyp2D6*4* у родинах із СРС або при виявленні ПМП. Створення клініко-генетичного реєстру таких осіб у межах окремих регіонів України для вирішення питань щодо моніторингу їхнього здоров'я, профілактики та доклінічної діагностики спадкових форм раку ОЖРС та інших пухлин у межах СРС є одним з актуальних завдань клінічної онкології.

ВИСНОВКИ

1. Клініко-генеалогічний аналіз родоводів 28 (100%) хворих на рак грудної залози (РМЗ) та рак ендометрія (РЕ) (віком від 29 до 72 років) виявив асоціацію пухлин у 18 (64,3%) родовах хворих на РГЗ та РЕ, що відповідало сімейному раковому синдрому (синдром Лінча II). Причому на рак частіше хворіли родичі пробандів по материнській лінії (30/63,8%), ніж по батьківській (17/36,2%).

2. Молекулярно-генетичне дослідження геномної ДНК периферійної крові та гістологічних зрізів пухлин на SNP генів *ESR1*, *CYP2D6*4* у порівнянні з результатами імуногістохімічного дослідження пухлин на рецепторний статус ER, PR у загальній групі обстежених не виявило асоціації між ними, але у пацієнок з РЕ частіше виявляли генотипи *397TT* і *351AA* порівняно із хворими на РГЗ (55,55% та 10,5% за генотипом *397TT* і 15,8% за генотипом *351AA* відповідно).

3. Також у пацієнок із РГЗ та первинно-множинними пухлинами органів жіночої репродуктивної системи (ОЖРС), що були носіями мутацій у гені *BRCA1*, був виявлений в усіх випадках позитивний рецептурний статус за ER та PR і несприятливі комбінації поліморфних варіантів генів *ESR1* (*397CC*, *397TC*) та *CYP2D6*4* (*1846GA*), що свідчить про комбінований вплив зазначених чинників на розвиток злоякісних новоутворень грудної залози та тіла матки у родинах із обтяженим на рак сімейним анамнезом.

4. У хворих на РГЗ, що мали рецидив при застосуванні стандартної гормонотерапії тамоксифеном, було виявлено комбінації генотипів *1846GA* за геном *CYP2D6*4* та *ESR1* (*397 TC*, *397CC*; *351 AG*, *351GG*) у 75 % випадків.

5. Одержані результати свідчать про необхідність проведення клініко-генеалогічних та молекулярно-біологічних досліджень у хворих на РГЗ та РЕ з укладенням та не обтяженим сімейним онкоанамнезом з метою покращення ефективності спеціального лікування за рахунок його персоналізації. А визначення SNPs гена *CYP2D6*4*, ураховуючи його участь у метаболізмі не лише канцерогенів, а й лікарських препаратів, у тому числі тамоксифену, допоможе у подальшому також у плануванні індивідуальних схем гормонотерапії та хіміотерапії у хворих на рак ОЖРС.

Возможности клинического использования тестирования на полиморфные варианты генов ESR1 и CYP2D6*4 у больных с раком грудной железы и эндометрия
О.В. Палийчук, Л.З. Полищук, З.Л. Россоха

Mclinical application of polymorphic variants of the genes ESR1 and CYP2D6*4 in patients with breast and endometrial cancer
O.V. Paliychuk, L.Z. Polishchuk, Z.I. Rossokha

Цель исследования: определение особенностей полиморфизма генов ESR1, CYP2D6 у больных раком грудной железы (РГЖ) и раком эндометрия (РЭ) и оценка влияния изученных генетических особенностей по сравнению с рецепторным статусом (иммуногистохимическое определение уровня экспрессии ER, PR) опухолей и результатами проведенного лечения.

Материалы и методы. Было выполнено комплексное клиническое, морфологическое, клинико-генеалогическое и молекулярно-генетическое обследование 28 женщин: 19 – больных РГЖ, 9 – больных РЭ, в том числе 5 больных с первично-множественными опухолями (ПМО), с и без агрегации опухолевой патологии в семьях.

Результаты. Установлено, что в семьях больных наблюдаются злокачественные опухоли преимущественно грудной железы, тела матки и/или яичников и пищеварительного тракта, что соответствует синдрому Линча II типа (семейный раковый синдром). Молекулярно-генетическое исследование геномной ДНК периферической крови и гистологических срезов опухолей на SNP генов ESR1, CYP2D6*4 в сравнении с результатами иммуногистохимического исследования опухоли на рецепторный статус ER, PR в общей группе обследованных не выявило ассоциаций между ними, но у пациенток с РЭ вероятно чаще фиксировали генотипы 397TT и 351AA по сравнению с больными РГЖ (55,55% и 10,5% по генотипу 397TT и 15,8% по генотипу 351AA соответственно). В то же время у пациенток с РГЖ и ПМО органов женской репродуктивной системы (ОЖРС), которые были носителями мутаций в гене BRCA1, был выявлен во всех случаях позитивный рецептурный статус по ER и PR и неблагоприятные комбинации полиморфных вариантов генов ESR1 (397CC, 397TC) и CYP2D6*4 (1846GG, 1846GA). Это свидетельствует о комбинированном влиянии отмеченных причин на развитие злокачественных новообразований ОЖРС в семьях с осложненным раком семейным анамнезом. У больных с РГЖ, которые получали стандартную гормонотерапию тамоксифеном, при наличии генотипа 1846GG гена CYP2D6*4 у 3 (15,8%) из 19 (100%) больных был диагностирован рецидив заболевания.

Заключение. Полученные результаты позволяют клинически использовать оценку частоты полиморфизмов генов ESR1, CYP2D6*4 для подбора индивидуальной схемы гормонотерапии у больных раком грудной железы и повышения эффективности диспансерного наблюдения после окончания специальной терапии таких пациенток и персонализации схем комплексного и комбинированного лечения.

Ключевые слова: рак грудной железы, рак эндометрия, родословные, семейный раковый синдром, однонуклеотидные замены, полиморфизмы (SNP) генов ESR1, CYP2D6*4.

The objective: determining gene polymorphism features ESR1, CYP2D6 in patients with breast cancer (RHZ) and endometrial cancer (EC) and the impact assessment studied genetic characteristics compared to receptor status (immunohistochemical determination of expression levels of ER, PR) tumors and the results of the treatment.

Patients and methods. article presents the results of complex clinical, morphological, clinical-genealogical, and molecular-genetic examination of 28 females: 19 patients with breast cancer (BC), 9 patients with endometrial cancer (EC), including 5 patients with primary-multiple tumors (PMT) with and without tumor pathology aggregation in families.

Results. The It was determined that in patients' families malignant tumors of breast, uterine body and/or ovaries prevail that corresponds to Lynch type II syndrome (family cancer syndrome). Molecular-genetic examination of genomic DNA of peripheral blood and histological sections for the presence of SNPs of ESR and CYP2D6*4 genes comparing with the results of immunohistochemical study of tumors for receptors ER and PR status have not found associations between these characteristics; although among EC patients the occurrence of genotypes 397TT and 351AA was significantly higher comparing with BC patients (55.55% and 10.5% for genotype 397TT, and 15.8% for genotype 351AA, respectively). At the same time the patients with BC and primary-multiple tumors (PMT) of female reproductive system organs (FRSO) that carried mutations in BRCA1 in all the cases demonstrated positive ER and PR receptor status and adverse combinations of polymorphous variants of the genes ESR1 (397CC, 397TC) and CYP2D6*4 (1846G, 1846GA), suggesting combined effect of these factors on the development of malignant neoplasias of FRSO in families with positive family cancer history. In BC patients, receiving standard hormone therapy with tamoxifen, those, who had genotype 1846GG of the gene CYP2D6*4, in 3 patients (15.8%) of 19 (100%) patients disease recurrence was diagnosed.

Conclusion. The obtained results allow clinical use of the assessment of polymorphism frequency of the genes ESR1 and CYP2D6*4 for selection of individual hormone therapy regimens schemes for BC patients, to increase efficacy of dispensary observation after finishing of special therapy for such patients, and also personalization of complex and combined treatment regimens.

Key words: breast cancer, endometrial cancer, family cancer syndrome, single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the genes ESR1, CYP2D6*4.

Сведения об авторах

Палийчук Ольга Владимировна – Онкогинекологический центр КЗ «Черкасский областной онкологический диспансер», 18009, г. Черкассы, ул. Менделеева, 7. E-mail: oncology@2upost.com

Россоха Зоя Ивановна – ГУ «Референс-центр по молекулярной диагностике МЗ Украины», 04112, г. Киев, ул. Дорогожицкая, 9а; тел.: (050) 383-06-98

Полищук Людмила Захаровна – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 45; тел.: (066) 111-71-98

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Палийчук О.В., Россоха З.Л., Галкін Ф.М., Полищук 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.
2. Палийчук О.В., Полищук Л.З., Россоха З.Л., Чехун В.В. Дослідження поліморфізмів гена ESR1 у хворих на рак органів жіночої репродуктивної системи з обтяженим сімейним анамнезом // Онкологія. – 2016. – 18 (70), 4. – С. 316–324.
3. Палийчук О.В., Полищук Л.З., Россоха З.Л., Чехун В.В. Тестування на поліморфні варіанти гена CYP2D6*4 у пациенток з доброякісною патологією та хворих на рак органів жіночої репродуктивної системи з родин із сімейним раковим синдромом // Онкологія. – 2017. – 19 (71), 1.
4. Lee Y.H., Kim J.H., Song G.G. Genome-wide path way analysis of breast cancer. Tumour Biol. 2014; 35(8):7699–705.
5. Mancini-Di Nardo D., Judkins T., Woolstenhulme N. et al. Design and validation of an oligonucleotide microarray for the detection of genomic rearrangements associated with common hereditary cancer syndromes. J Exp Clin Cancer Res. 2014 Sep 11;33:74. doi: 10.1186/s13046-014-0074-9.
6. Hoskins J.M.1, Carey LA., McLeod H.L. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. Nat Rev Cancer. 2009; 9(8):576-86.
7. Hennig E.E., Piatkowska M., Karczmarski J., et al. Limited predictive value of achieving beneficial plasma (Z)-endoxifen threshold level by CYP2D6 genotyping in tamoxifen-treated Polish women with breast cancer // BMC Cancer. 2015; 15: 570. doi: 10.1186/s12885-015-1575-4.
10. Xu Y., Sun Y., Yao L. et al. Association between CYP2D6 *10 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen treatment. Ann Oncol 2008;19:1423-1429.
11. Dezentjé V.O., van Blijderveen N.J., Gelderblom H. et al. Effect of concomitant CYP2D6 inhibitor use and tamoxifen adherence on breast cancer recurrence in early-stage breast cancer. J Clin Oncol 2010; 28: 2423–2429.
12. Hartman M., Loy E.Y., Ku C.S. et al. Molecular epidemiology and its current clinical use in cancer management. The Lancet Oncology. Ukrainian Edition tissue 2010;N3: 41: 01–51.

Статья поступила в редакцию 21.02.17