

УДК 618.19-007.61-06:575.113.1

Abstract**Lukavenko I.M.,*****Andriushchenko V.V.,****Yazykov O.V.***Sumy State University,**2 Rymskogo-Korsakova St., Sumy,**40007, Ukraine***POLYMORPHISM PvuII GENE EsR α WITH DEGREES PROLIFERATIVE ACTIVITY AND EXPRESSION OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA (ESRA) IN BENIGN MAMMARY DYSPLASIA**

With the development of modern technologies committed step in the study of the pathogenesis of breast tumors. However, despite the advances of science, diagnosis of benign mammary dysplasia remains difficult. A promising direction is to develop methods by which a forecast of possible pretumor pathology. Important in the progression of cell proliferation in the mammary gland is the receptor cell state as a violation of the expression of steroid hormone receptors is associated with risk of breast cancer. To date, there are no clear criteria for the expression of estrogen receptor interactions with the degree of proliferation in the mammary gland during its dysplasia. Meeting this challenge will not only help to explain the pathogenesis of breast dysplasia, but also help to build the circuit of individual treatment, justify the appropriateness of hormone therapy. The level of expression depends on many factors including the structure of the gene that encodes it. Nowadays many published papers about the association of single nucleotide polymorphism PvuII gene EsR α with breast pathology. However, the information collected mainly in the study of breast cancer. The question of influence on the development of PvuII mammary dysplasia remains relevant.

Purpose - to analyze the association PvuII polymorphism of the gene EsR α with the degree of proliferation and expression of EsR α in breast tissue with its benign dysplasia.

To achieve the goal of an analysis of surgical treatment of 84 patients with benign mammary dysplasia. Separately studied 134 morphological sample of breast tissue in operated patients. Used molecular genetic, immunohistochemical methods. Statistical analysis was performed using the program SPSS-17. Thus the significance of differences was determined by the χ^2 -test. The value of $P < 0,05$ was considered significant. It is shown that there is a connection between the PvuII polymorphism EsR α with different levels of expression EsR α ($\chi^2 = 51,041$; $P < 0,0001$) and the degree proliferation ($\chi^2 = 43,142$; $P < 0,0001$) in breast tissue with its benign dysplasia. This information may be useful to clinicians considering the fact that the proliferative changes in the breast are considered as background for the development of cancer, and (C/C) homozygous for the PvuII polymorphism of the gene EsR α - a reliable indicator of increased proliferation with a penchant for atypia in breast tissue when it dysplasia.

Keywords: estrogen receptor alpha, benign mammary dysplasia, genetic polymorphism, genetic medicine.

Corresponding author: * *Doctorlv@ukr.net*

Резюме

Лукавенко І.М.,*
Андриющенко В.В.,
Язык О.В.

Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова, 2,
Суми, 40007, Україна

ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ RvuII ГЕНА EsRα НА СТУПІНЬ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ЕКСПРЕСІЇ РЕЦЕПТОРА ЕСТРОГЕНУ АЛЬФА ПРИ ДОБРОЯКІСНІЙ ДИСПЛАЗІЇ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

З метою аналізу асоціації алейного поліморфізму RvuII гена EsRα зі ступенем проліферативних змін і експресією EsRα, визначено та порівняно між собою зазначені показники в тканині молочної залози у пацієнтів з доброякісною дисплазією при хірургічному лікуванні. Для досягнення мети використовували молекулярно-генетичні, імуногістохімічні методи дослідження. Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 –критерієм. Значення $P < 0,05$ вважали достовірними. Показано, що існує зв'язок між RvuII поліморфізмом гена EsRα з різним рівнем експресії EsRα та ступенем проліферації в тканині молочної залози при її доброякісній дисплазії. Дана інформація може бути корисною для клініцистів з огляду на той факт, що проліферативні зміни молочної залози розглядаються як фон для розвитку раку, а гомозиготний стан (C/C) за поліморфізмом RvuII гена EsRα – достовірний індикатор підвищеної проліферації зі схильністю до атипичних змін в тканині молочної залози при її дисплазії.

Ключові слова: рецептор естрогену альфа, доброякісна дисплазія молочної залози, генетичний поліморфізм, генетична медицина.

Резюме

Лукавенко И.М.,*
Андриющенко В.В.,
Язык А.В.

Сумский государственный университет,
ул. Римского-Корсакова, 2,
Сумы, 40007, Украина

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА RvuII ГЕНА EsRα НА СТЕПЕНЬ ПРОЛІФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА ЭСТРОГЕНА АЛЬФА ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ДИСПЛАЗИИ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ

Цель работы – анализ ассоциации алейного полиморфизма RvuII гена EsRα со степенью пролиферации и экспрессией EsRα в ткани молочной железы при ее доброкачественной дисплазии. Для достижения указанной цели определены указанные показатели и сравнены между собой. Используются молекулярно-генетические, иммуногистохимические методы исследования. Статистический анализ проводили с использованием программы SPSS-17. При этом достоверность различий определяли по χ^2 -критерия. Значение $P < 0,05$ считали достоверными. Показано, что существует связь между RvuII полиморфизмом гена EsRα с различным уровнем экспрессии EsRα и степенью пролиферации в ткани молочной железы при ее доброкачественной дисплазии. Данная информация может быть полезной для клиницистов учитывая тот факт, что пролиферативные изменения молочной железы рассматриваются как фон для развития рака, а гомозиготный состояние (C/C) полиморфизма RvuII гена EsRα – достоверный индикатор повышенной пролиферации со склонностью к атипичности в ткани молочной железы при ее дисплазии.

Ключевые слова: рецептор эстрогена альфа, доброкачественная дисплазия молочной железы, генетический полиморфизм, генетическая медицина.

Автор, відповідальний за листування: * Doctorlv@ukr.net



Вступ

Передпухлинні хвороби молочної залози набули в Україні значної актуальності, про що свідчить високий рівень захворюваності та ризику ускладнень. Частота проліферативних форм доброякісної дисплазії молочної залози (ДДМЗ) в загальній популяції складає 35-50% [1, 2]. Не дивлячись на успіх сучасної науки, діагностика доброякісної дисплазії залишається недостатньо уніфікованою. Особливу актуальність це отримує у зв'язку з тим, що проліферативні форми ДДМЗ розглядаються як фон для розвитку раку молочної залози (РМЗ) [3, 4].

Молочна залоза – орган-мішень для цілого ряду гормонів. Це важлива причина особливостей її будови та суттєвих змін під час вагітності і лактації. Основним етіологічним чинником, який провокує морфологічні та функціональні зміни в структурі молочної залози, визнано зміну балансу естрогенів з розвитком відносної або абсолютної гіперестрогенії. Остання призводить до проліферації епітелію і протоків сполучної тканини, що в свою чергу, викликає порушення гістоструктури [5, 6]. Доведена роль гіперестрогенії в розвитку ДДМЗ і раку [7]. Ці ефекти гормонів пояснюють використання методів імуногістохімії (ІГХ), коли процеси проліферації і вузлоутворення обумовлені не скільки рівнем гормонів крові, скільки рівнем експресії рецепторів до них. Визначення експресії рецепторів стероїдів – важливий критерій гормоночутливості тканини-мішені.

Рівень експресії EsRα, залежить від багатьох факторів, в тому числі і від структури гена, що його кодує. У 1991 з'явилися перші повідомлення про однонуклеотидні поліморфізми в гені EsRα, пов'язані з розвитком РМЗ [8]. З того часу вивченню ролі алельного поліморфізму гена EsRα у виникненні і прогресії пухлинних процесів присвячено значну кількість наукових досліджень [9, 8]. Але інформація про функціональний вплив окремих поліморфізмів на розвиток ДДМЗ залишається малочисельною і переважно стосуються аналізу при дослідженнях РМЗ [10], тому її використання з метою прогнозу доброякісної гормонозалежної патології в даний час обмежене. Іншими словами, однозначної відповіді на питання про зв'язок поліморфізму зі ступенем проліферативних змін при ДДМЗ не отримано.

Серед відомих 2234 поліморфізмів гена EsRα людини найбільш вивченим є RvuII (T1943C). Наукові дослідження описують зв'язок полі-

морфізму RvuII із патологією молочної залози в різних популяціях [10, 11]. Інформації щодо зв'язку поліморфізму RvuII з експресією EsRα в новоутвореннях при ДДМЗ в українській популяції не знайдено. З літературних джерел [11,12,13] відомо про дослідження зв'язку між поліморфізмом RvuII гена EsRα з розвитком патології ендометрія, кісток, РМЗ та інших органів в різних країнах Європи. Цілком імовірно, що такий зв'язок може існувати між поліморфізмом цього гена і ДДМЗ серед українців. Таке припущення ґрунтується на тому, що гіперплазія ендометрію, РМЗ, та остеопороз часто мають спільне походження і зумовлені порушенням обміну естрогенів у відповідних органах.

Потенційна роль у вивченні поліморфізму RvuII гена EsRα, у забезпеченні клініцистів прогностичною інформацією щодо особливостей естроген-позитивного або негативного статусу осередків проліферації при ДДМЗ. Крім того, експресія EsRα, як відомо, є важливим орієнтиром відповідної терапії, зокрема гормонотерапії.

Приймаючи до уваги ріст захворюваності на проліферативні форми мастопатії та молодий вік пацієнтів, важливим є пошук механізмів ранньої діагностики та новітніх критеріїв оцінки патологічних змін передпухлинних хвороб молочної залози.

Мета дослідження – провести аналіз асоціації алельного поліморфізму RvuII гена EsRα зі ступенем проліферативних змін і експресією EsRα в тканині молочної залози при проліферативних формах ДДМЗ.

Об'єкт та методи дослідження.

Об'єктом дослідження були жителі Сумської області від 16 до 62 років. Це 82 (97,6%) жінки з ДДМЗ із групи ризику на РМЗ та 2 (2,4%) чоловіка, що страждали на гінекомастію з вузлоутворенням. Обстеження пацієнтів проводили в різних лікувальних закладах на базах медичного інституту Сумського державного університету з 2012 по 2013 р.р. (2 повні роки). Середній вік у досліджуваній групі 32,3±1,1 роки. Постановку діагнозу та обстеження пацієнтів, які взяли участь у дослідженні, проводили згідно діючих наказів МОЗ України № 624 від 03.11.2008 р. та № 645 від 30.07.2010 р. Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи виконання наукових медичних досліджень за участю людини і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.



Всі пацієнти підписали інформовану згоду пацієнта на участь у дослідженні із наступним заборою венозної крові на генетичний аналіз.

Критеріями відбору пацієнтів у дослідження були ознаки генетичної схильності до хвороб молочної залози: множинні первинні пухлини в одному органі; білатеральні первинні пухлини в парних органах; мультифокальність в середині одного органу; поява пухлини в ранньому віці (до 21 року); один і більше близьких родичів з тим же типом пухлин; дві рідні людини і більше з тим же типом пухлини; три рідні людини і більше в двох поколіннях з пухлинами однієї локалізації. Критеріями виключення були: не-проліферативній зміні та відсутність ознак генетичної схильності до хвороб молочної залози, відмова пацієнта брати участь у дослідженні.

Всі хворі проліковані хірургічно – видалені новоутворення молочної залози. У 44 (52,4%) виявлено одне новоутворення, у 34 (40,5%) – два новоутворення, у 6 (7,1%) – три. Однобічне ураження зустрічали 54 (64,3%), двобічне – у 30 (35,7%), обтяжений сімейний анамнез на РМЗ зустрічався в 33 (39,3%). Новоутворення розміщували в тару з формаліном та направляли на морфологічні та імуногістохімічні дослідження. Вивченні 134 новоутворення різного типу проліферативних змін, отриманих від 84 оперованих пацієнтів. Визначено переважний тип проліферації та експресію EsR α . Також проведено молекулярно-генетичні дослідження, а саме – визначення поліморфізму PvuII гена EsR α .

Імуногістохімічна реакція (ІГХ) проводилась на серійних парафінових зрізах завтовшки 4-5 мкм, які поміщалися на скельцях, вкритих APES (амінопропілтриетоксисілан) – шаром. Після депарафінування та зневоднення препарати проходили всі етапи стандартного імуногістохімічного дослідження. Результати ІГХ реакцій експресії EsR α оцінювали напівкількісним способом за Allred D.C. et al. [12]. Вважали негативною реакцію при сумі балів 0-2, слабкопозитивною – 3-4 бали, позитивною – 5-6 і сильнопозитивною – 7-8 балів. До новоутворень з позитивною ІГХ реакцією відносили ті, що мали 3 і більше балів, решту вважали рецептор-негативними.

Для генетичного дослідження венозну кров набирали до чи після видалення новоутворів за стандартною методикою в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю ети-

лендіамінтетраоцтової кислоти (11.7 мМ) в якості антикоагулянту (“Sarstedt”, Німеччина), заморожували та зберігали при температурі - 20°C. ДНК виділяли з цільної крові із використанням наборів DIAtom DNA Prep 100 («Iso-gene», Росія) згідно протоколів, наведених у комерційному наборі. PvuII (rs2234693) поліморфізм визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP).

Статистичний аналіз проводили з використанням спеціалізованої програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 –критерієм. Значення P< 0,05 вважали достовірними.

Результати власних досліджень.

Визначення експресії EsR α в морфологічних зразках та генотипування пацієнтів за поліморфізмом PvuII гена EsR α дало змогу встановити частоту з якою зустрічається окремі варіанти цього гена, а також порівняти ці показники між собою.

Серед обстежених новоутворень молочної залози більшість – 48,5% склали зразки з фібро-епітеліальним типом проліферації, досить часто зустрічався епітеліальний тип проліферативних змін (долькова – 18,6%, протокова – 21,7%), міоепітеліальний тип був присутній в 11,2% випадків.

Результати аналізу частот окремих генотипів за поліморфізмом PvuII засвідчили відсутність достовірної різниці в розподілі алейних варіантів у пацієнтів з різним типом проліферації в молочної залозі (P=0,167). Також не знайдено залежності в розподілі пацієнтів з різним рецепторним статусом при різних типах проліферативних змін у новоутворах при ДДМЗ (P=0,525). Таким чином, тип проліферації не залежить від рецепторного статусу новоутворення молочної залози та генотипу за поліморфізмом PvuII.

У табл. 1 представлено результати аналізу частот окремих генотипів за поліморфізмом PvuII залежно від EsR α статусу новоутворення молочної залози.

Таблиця 1

Зв'язок аельних варіантів гена EsRα за поліморфізмом PvuII залежно від рецепторного статусу в морфологічних зразків у пацієнтів з проліферативною формою ДДМЗ

Генотип	EsRα-, n (%)	EsRα+, n (%)
T/T	32 (53,3)	4 (5,4)
T/C	28 (46,7)	43 (58,1)
C/C	0 (0)	27 (36,5)
Разом	60 (100)	74 (100)

$\chi^2 = 51,041$; P < 0,0001

Примітка: n - кількість морфологічних зразків; EsRα- - рецепторнегативні зразки за експресією EsRα; EsRα+ - рецепторпозитивні зразки за експресією EsRα.

Аналіз розподілу, наведений в табл. 1 доводить, що гомозиготний стан за мінорним алелем (C/C) поліморфізму PvuII асоційований з більшою інтенсивністю та пропорційним розподілом EsRα в препаратах проліферативної дисплазії. Показник P, визначений за χ^2 -критерієм Пірсона, був меншим за 0,0001, що свідчить про достовірну різницю вивчених показників.

Застосувавши критерій Фішера вдалося обчислити статистичний зв'язок середніх показ-

ників рівня експресії EsRα залежно від варіантів аельного поліморфізму PvuII (табл. 2).

Серед гомозигот за основним алелем (T/T) середній рівень експресії склав 2,42±0,171 бали, у гетерозигот (T/C) – 2,83±0,08 бали і гомозигот за мінорним алелем (C/C) – 6,33±0,131 бали. Однофакторний дисперсійний аналіз вказав, що показник P був меншим за 0,0001. Це свідчить про достовірну різницю у розподілі аельних варіантів гена EsRα за поліморфізмом PvuII у пацієнтів з різним рівнем експресії EsRα.

Таблиця 2

Характеристики новоутворів у пацієнтів, хворих на ДДМЗ залежно від варіанту генотипу за PvuII поліморфізмом гена EsRα

Показник	T/T	T/C	C/C	F	P
	(n=36)	(n=71)	(n=27)		
Експресія EsRα, (бали)	2,42±0,171	2,83±0,08	6,33±0,131	189,25 0	<0, 001

Примітка: n-кількість досліджених морфологічних зразків

Обчислення за критерієм Дункана показало, що пацієнти-гомозиготи за основним алелем (T/T) мали новоутворення з меншим ступенем експресії EsRα (2,42±0,171), ніж пацієнти-гетерозиготи (T/C - 2,83±0,08). У пацієнтів-гомозигот за мінорним алелем (C/C) рівень експресії EsRα в проліфератах при ДДМЗ був найбільшим (6,33±0,131) і достовірно відрізнявся від носіїв генотипів T/T і T/C (P<0,001).

Різноманітність морфологічних структур, притаманних ДДМЗ, напряму залежить від ступеня проліферативних змін. Тому в дослідженні було вивчено крім типу проліферації ще і

ступінь трансформації типових гістологічних структур та порівняли ці показники з рецепторним статусом тканини (табл. 3) і аельним розподілом поліморфізму PvuII гена EsRα (табл. 4).

Як впливає з наведених даних, розподіл морфологічних препаратів з різним рецепторним статусом достовірно відрізняється у пацієнтів залежно від ступеня проліферативних змін у новоутворах серед пацієнтів хворих на ДДМЗ. Обчислення за χ^2 – критерієм Пірсона показало, що серед гістологічних препаратів ДДМЗ з проліферацією 3-4 ступеня 34 (70,8%) зразки мали



рецепторпозитивний статус. Це значно більше ніж серед зразків з рецепторнегативним статусом – 14 (29,2%) ($\chi^2 = 7,370$; $P = 0,007$).

Таким чином, можна припустити, що проліферативна активність при ДДМЗ залежить від рівня експресії EsR α і зростає при збільшенні експресії цього рецептора в тканині молочної залози.

Оскільки визначений статистичний зв'язок між ступенем проліферативних змін та рецепторним статусом, то цікавим є визначити зв'язок між генотипами за поліморфізмом RvuII та ступенем проліферації (табл. 4).

Як видно з таблиці 4, у зразках 3-4 ступеня проліферації співвідношення гомозигот за основним алелем (Т/Т), гетерозигот (Т/С) і гомозигот за мінорним алелем (С/С) становило 10,4%, 39,6% і 50,0%, у випадку з аналізом морфологічних препаратів з 1-2 ступенем проліферації – відповідні показники дорівнювали 36,0%, 60,5% і 3,5%. Показник P був меншим за 0,0001, що свідчить про достовірну різницю у розподілі алельних варіантів гена EsR α за поліморфізмом RvuII у пацієнтів з різним ступенем проліферації.

Таблиця 3

Експресія EsR α	Зв'язок експресії EsR α зі ступенем проліферативних змін при ДДМЗ	
	Ступінь проліферації, n (%)	
	Значна проліферативна активність, метаплазія в окремих ділянках, та/або з тенденцією до атипових змін (3,4 ст)	Невиражена проліферація без атиpii (1,2 ст)
EsR α -	14 (29,2)	46 (53,5)
EsR α +	34 (70,8)	40 (46,5)
Разом	48 (100)	86 (100)
$\chi^2 = 7,370$; $P = 0,007$		

Примітка: n - кількість морфологічних зразків, EsR α - - рецепторнегативні зразки за експресією EsR α ; EsR α + - рецепторпозитивні зразки за експресією EsR α .

Таблиця 4

Зв'язок алельних варіантів гена EsR α за поліморфізмом RvuII зі ступенем проліферації в морфологічних зразках у пацієнтів з проліферативною формою ДДМЗ		
Генотип	Значна проліферативна активність, метаплазія в окремих ділянках, та/або з тенденцією до атипових змін (3,4 ст)	Невиражена проліферація без атипових ознак (1,2 ст)
Т/Т	5 (10,4)	31 (36,0)
Т/С	19 (39,6)	52 (60,5)
С/С	24 (50,0)	3 (3,5)
Разом	48 (100)	86 (100)
$\chi^2 = 43,142$; $P < 0,0001$		
Примітка: n - кількість морфологічних зразків		

Таким чином, ми можемо стверджувати, що серед вивчених зразків існує зв'язок між поліморфізмом RvuII гена EsR α і ступенем проліферативних змін новоутворення: генотип Т/Т характерний для осередків з проліферацією 1-2 ступеня, а генотип С/С – для ДДМЗ з вираженими проліферативними змінами 3-4 ступеня.

Обговорення Результати наших досліджень співпадають з даними Cericatto et al. та демон-

струють поєднання підвищеної проліферативної активності з високим рівнем експресії EsR α при ДДМЗ [14]. З іншої сторони, автори [14, 15] не знайшли статистично значимої різниці в експресії EsR α у хворих на ДДМЗ.

У результаті проведених досліджень Holst F. et al. зробили висновок, про те що посилення експресії EsR α при ДДМЗ може бути загальним механізмом в патогенезі проліферативних захворювань та ранньою ознакою розвитку РМЗ



[16]. З огляду на можливий вплив поліморфізму PvuII, а саме зміна якісного і/або кількісного рівня EsRα в клітині, ми припустили, що різні алельні варіанти можуть впливати на рівень експресії EsRα в осередках проліферації молочної залози. Так, аналіз результатів дослідження доводить, що гомозиготний стан за мінорним алелем (C/C) поліморфізму PvuII асоційований з більшою інтенсивністю та пропорційним розподілом EsRα в препаратах проліферативної форми ДДМЗ. На нашу думку виявлення зв'язку між морфологічними, ІГХ характеристиками тканини та генетичними особливостями кожного індивідууму, можуть бути корисними для ранньої діагностики та скринінгу ДДМЗ.

На існування зв'язку між певними поліморфізмами EsRα та патології грудей вказують патентні дослідження окремих авторів [17]. Lisa Gallicchio et al. довели, що серед жінок кавказької національності поліморфізми гена EsRα можуть відігравати роль у схильності та прогресуванні ДДМЗ [18].

У виконаній нами роботі вперше в Україні проаналізовано асоціацію поліморфізму PvuII гена EsRα з рівнем експресії EsRα та ступенем проліферації у пацієнтів з проліферативними формами ДДМЗ і виявлено зв'язок. Досліджуваний генетичний чинник асоційований зі зростанням експресії EsRα та вираженою проліферацією у пацієнтів групи ризику на РМЗ в українській популяції.

Висновки

При типовій гістологічній структурі різних типів проліферації при ДДМЗ, встановлено різний рівень експресії EsRα в усіх, без винятку, варіантах вивченої патології. Наявність поліморфізму PvuII не обумовлювала тип проліферації ДДМЗ ($\chi^2 = 9,123$; $P = 0,167$), який, в свою чергу, не залежав від рецепторного статусу за експресією EsRα ($\chi^2 = 2,236$; $P = 0,525$).

Достовірний індикатор підвищеної проліферативної активності зі схильністю до атипичних змін є гомозиготний стан (C/C) за поліморфізмом PvuII гена EsRα ($\chi^2 = 43,142$; $P < 0,0001$), що можна використовувати як додатковий критерій високої проліферативної активності при ДДМЗ.

Збільшення рівня експресії підвищує проліферацію в новоутвореннях при ДДМЗ ($\chi^2 = 7,370$; $P = 0,007$). У хворих з гомозиготним станом (C/C) поліморфізму PvuII гена EsRα крім стандартного морфологічного дослідження ви-

правданим є проведення імуногістохімічного дослідження з визначенням рівня експресії EsRα.

References (список літератури)

1. Neyshtadt E. L. Patologiya molochnoy zhelezy / E. L. Neyshtadt, O. A. Vorobeva. – Spb. : Foliant, 2003. – 208 p.
2. Pinder S. E. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)-current definition and classification / S. E. Pinder, I. O. Ellis // Breast Cancer Res. – 2003. – № 5. – P. 254–257.
3. McCormack V. A. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis / V. A. McCormack, Silva I. dos Santos // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2006. – № 15. – P. 1159–1169.
4. Smolanka I. I. Disgormonalnyie giperplazii molochnoy zhelezy: etiologiya, klinicheskie formy, printsipy terapii / I. I. Smolanka, I. V. Dosenko // Meditsinskie aspektyi zdorovya zhenschiny. – 2007. – № 3 (6). – P. 42–43.
5. Lutsenko N. S. Mastopatiya: problemy i resheniya / N. S. Lutsenko // Reproductivnoe zdorove zhenschiny. – 2006. – № 1 (25). – P. 55–57.
6. Vliyanie preparatov gestagennoho ryada na morfofunktsionalnoe sostoyanie molochnyih zhelez / E. F. Kira, S. V. Beskrovnyiy, A. B. Ilin i dr. // Zhurnal akusherstva i zhenskih boleznay. – 2000. – Т. 49, № 2. – P. 75–84.
7. Genetic polymorphisms of ESR1 and ESR2 that may influence estrogen activity and the risk of hypospadias / S. Ban, F. Sata, N. Kurahashi et al. // Hum. Reprod. – 2008. – № 23. – P. 1466–1471.
8. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with left ventricular mass and wall thickness in women / I. Peter, A. M. Shearman, R. S. Vasan et al. // Am. J. Hypertens. – 2005. – № 18. – P. 1388–1395.
9. Analysis of the ERalpha germline PvuII marker in breast cancer risk / R. Gonza'lez-Mancha, J. J. Gala'n, C. Crespo et al. // Med. Sci. Monit. – 2008. – № 14 (3). – CR136–CR143.
10. Estrogen receptor alpha polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk / A. M. Gonza'lez-Zuloeta Ladd, A. A. Va'squez, F. Rivadeneira et al. // Breast Cancer Res. Treat.



- 2008, Feb. – № 107 (3). – P. 415–419. – ePub. 2007. – Apr. 24.
11. Estrogen receptor alpha gene polymorphism and endometrial cancer risk-a case-control study / S. Wedre'n, L. Lovmar, K. Humphreys et al. // *BMC Cancer*. – 2008. – № 8. – P. 322.
 12. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis / D. C. Allred, J. M. Harvey, M. Berardo, G. M. Clark // *Modern Pathology*. – 1998. – Vol. 11, № 2. – P. 155–168.
 13. Estrogen receptor-alpha, bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: association with nodule size, hormonal and reproductive features / R. Cericatto, A. Pozzobon, D. M. Morsch et al. // *Steroids*. – 2005. – Vol. 70, № 3. – P. 153–160.
 14. Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue and fibroadenomas / G. Branchini, L. Schneider, R. Cericatto et al. // *Endocrine*. – 2009. – Vol. 35, № 3. – P. 459–466.
 15. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer / F. Holst, P. R. Stahl, C. Ruiz et al. – Department of Pathology, University Medical Center Hamburg Eppendorf, D-20246. – Hamburg, Germany, 2007, May. – № 39 (5). – P. 655–660. – ePub. 2007. – Apr. 8.
 16. Patent JP2012034633A1. Method for determining estrogen-related disease / Inventors: Mizukami, Yoichi; Applicant: Yamaguchi univ; Priority Number: EP20070121810 ; Publication date: February 23, 2012.
 17. Polymorphisms in estrogen-metabolizing and estrogen receptor genes and the risk of developing breast cancer among a cohort of women with benign breast disease / L. Gallicchio, S. L. Berndt, M. A. McSorley et al. // *BMC Cancer*. – 2006. – Vol. 29, № 6. – P. 173–184.

(received 12.11.2014, published online 23.12.2014)

(отримано 12.11.2014, опубліковано 23.12.2014)

