

Міністерство охорони здоров'я України
Національна академія медичних наук України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи



УЗГОДЖЕНО

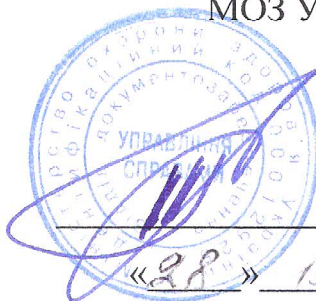
Начальник лікувально-
організаційного
управління НАМН України

І.Д. Шкробанець

«28» 12 2016 р.

УЗГОДЖЕНО

В.о. директора Медичного
департаменту
МОЗ України



А.О. Гаврилюк

«28» 12 2016 р.

АЛГОРИТМ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО
РОЗВИТКУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ У ЖІНОК, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ДІЇ
ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ ВНАСЛІДОК АВАРІЇ НА ЧАЕС
(методичні рекомендації)

Установа - розробник:

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»

Укладачі:

к.м.н. Л.А. Рибченко	(044) 483-72-12
к.м.н. Г.М. Бичкова	(044) 483-72-12
к.б.н. Г.В. Стефанович	(044) 484-18-74
д.м.н. Л.М. Захарцева	(044) 450-75-84
д.м.н. С.В.Клименко	(044) 483-72-12

Рецензент:

Заступник головного лікаря Київського міського онкологічного центру з амбулаторно-поліклінічної роботи, головний спеціаліст ДООЗ КМДА з онкології, д-р мед. наук Д. С. Осинський

Рішення проблемної комісії «Медична генетика», протокол № 4/16
від 12 грудня 2016 р.

Голова проблемної комісії «Медична генетика» МОЗ та НАМН України,
чл.-кор. НАМН України, д.м.н., проф. С.Б. Арбузова.

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	4
Вступ	5
1 Основна частина	
1.1 Методи і підходи до тестування носійства мутації <i>BRCA1</i> та <i>BRCA2</i>	9
1.2 Опрацювання алгоритмів розрахунку ризиків носійства мутацій генів <i>BRCA1</i> та <i>BRCA2</i> для жінок України	12
1.3 Аналіз ефективності алгоритмів Penn II, BOADICEA, Манчестерської бальної системи та Mугіад	17
1.4 Алгоритм визначення генетичної схильності до розвитку РМЗ	22
2 Висновки	25
3 Перелік рекомендованої літератури	26

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

<i>BRCA1/2</i>	- Breast cancer genes (гени, мутації яких призводять до розвитку раку грудної залози)
BOADICEA	- Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm (Алгоритм визначення ризику носійства мутацій та розвитку раку молочної залози та яєчників)
Рос-криві	- приймач операційних характеристик (Receiver Operating Characteristic)
ДІ	- довірчий інтервал
ІПР	- інфільтративний протоковий рак
ІР	- іонізуюча радіація
ЛНА	- ліквідація наслідків аварії
МБС	- Манчестерська бальна система
МГК	- медико-генетичне консультування
ННЦРМ	- ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»
ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція
ППК	- площа під кривою
ПЦПР	- прогностична цінність позитивного результату
ПЦНР	- прогностична цінність негативного результату
РЕ	- рецептор естрогену
РМЗ	- рак молочної залози
РП	- рецептор прогестерону
РПЗ	- рак підшлункової залози
РПМЗ	- рак передміхурової залози
РЯ	- Рак яєчників
	-

ВСТУП

Рак молочної залози (РМЗ) є найбільш поширеним онкологічним захворюванням серед жіночого населення в більшості країн світу. В Україні протягом останніх років на РМЗ щорічно захворює більше 17 тис. жінок та 8 тис. помирає від цієї недуги. З'являються повідомлення про надлишок випадків РМЗ, пов'язаних з Чорнобильською катастрофою, зокрема, у жінок-учасниць ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС, що зумовлює актуальність медико-соціальної проблеми РМЗ в Україні та необхідність пріоритетного скеровування зусиль на її розв'язання.

Однією з причин розвитку РМЗ є спадкова схильність, яка може реалізовуватись внаслідок дії іонізуючої радіації (ІР). Найбільшим досягненням у вивченні спадкових форм РМЗ стало відкриття мутацій *BRCA1/2*, що зумовлюють близько 60-80% таких випадків. Мутації в генах *BRCA1* та *BRCA2* спричиняють високий ризик розвитку РМЗ та раку яєчників (РЯ). За об'єднаними даними 22 досліджень серед випадкової вибірки РМЗ середній кумулятивний ризик розвитку даного захворювання для носіїв мутацій *BRCA1* становить 65%, а для носіїв *BRCA2* патогенних алелей – 45%. Вірогідність захворіти на РЯ у *BRCA1* та *BRCA2*-позитивних осіб складає 39% та 11%, відповідно. В Україні, як і в інших країнах Східної Європи, мажорними мутаціями в гені *BRCA1* вважаються алелі 185delAG, 5382insC, в гені *BRCA2* – алель 6174delT. Виявлення носійства мутацій у генах *BRCA1/2* є важливим для планування профілактичних заходів. Також важливим воно може стати й для лікування жінок з РМЗ, оскільки розроблені окремі протоколи лікування *BRCA*-асоційованих раків.

Найбільш інформативним методом тестування мутацій у генах *BRCA1* та *BRCA2* є їх повне секвенування. Проте, з огляду на великий розмір генів, спектр їх молекулярних варіантів, та вартість секвенування, проведення масового тестування жінок цим методом не є виправданим.

Для забезпечення економічно ефективного та клінічно обґрунтованого медико-генетичного консультування (МГК), визначення мутаційного статусу має бути запроваджено щодо тих осіб, які найбільш ймовірно є носіями патогенних алелей *BRCA1* та *BRCA2*. За кордоном у клінічній практиці для визначення таких осіб застосовують алгоритми розрахунку ймовірності носійства мутацій, зокрема BOADICEA, Penn II, Myriad, Манчестерську бальну систему (МБС). В розвинених країнах затверджені бюджетні програми виявлення груп ризику осіб щодо розвитку РМЗ, передусім *BRCA*-позитивних. Згідно цих програм, на генетичне тестування *BRCA1* и *BRCA2* мутацій спрямовують осіб, які мають ризик носійства патогенних алелей 10% або 20%. Американське товариство клінічних онкологів рекомендує скеровувати на тестування мутацій *BRCA1* та *BRCA2* жінок з ризиком їх носійства 10% та більше, тоді як в рекомендаціях Національного інституту здоров'я Великобританії цей поріг підвищений до 20%. Подібні відмінності пов'язані зі ступенем фінансового забезпечення процесу тестування, оскільки зниження порогу ймовірності носійства патогенних алелей вимагає істотного збільшення бюджету програми.

В Україні дотепер не досліджувалась ефективність алгоритмів генетичного тестування мутацій *BRCA1* та *BRCA2*, не проводилося визначення дискримінаційних порогів зі встановленням ризику носійства мутаційних алелей. Впровадження найбільш ефективних алгоритмів прогнозу носійства мутацій *BRCA1* та *BRCA2* дасть можливість з найменшими витратами забезпечувати обстеження значної кількості осіб.

У методичних рекомендаціях вперше в Україні наводяться результати апробації алгоритму діагностики носійства мутацій *BRCA1* та *BRCA2* у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС та пацієнтів без радіаційного анамнезу, який продемонстрував високу дискримінаційну здатність. Алгоритм розроблено на основі результатів проведеного комплексного аналізу генеалогічних, молекулярно-генетичних, морфологічних та імуногістохімічних даних, показників тестування ймовірності носійства

мутацій *BRCA1/2* за допомогою алгоритмів BOADICEA, Penn II, Myriad, МБС.

Тест на наявність мутації *BRCA1* та *BRCA2* проведено в 425 осіб, із них 146 хворих на РМЗ та 279 практично здорових осіб.

Згідно з нашими даними, найкращу дискримінаційну здатність щодо ідентифікування вірогідних *BRCA*-позитивних та *BRCA*-негативних осіб у когортах хворих на РМЗ та пацієнтів без злоякісних новоутворень в молочній залозі мали моделі BOADICEA та МБС. Алгоритми Penn II та Myriad виявилися недостатньо ефективними у використанні для українських пацієнтів. Для хворих на РМЗ жінок за рівень позитивності носійства *BRCA1* патогенних алелей слід використовувати поріг $\geq 6,7\%$ для алгоритму BOADICEA та ≥ 5 балів для МБС. Для хворих з 2 та більше випадками РМЗ та/або РЯ у родоводі – $\geq 7,7\%$ та ≥ 6 балів, відповідно. Для прогнозування високого комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій у осіб з РМЗ, незалежно від сімейного анамнезу, варто застосовувати поріг позитивності не менше, ніж 9% за моделлю BOADICEA та ≥ 13 балів за МБС. Рекомендовано до групи високого ризику носійства *BRCA1* мутацій відносити осіб без РМЗ з 1 та більше випадками РМЗ серед родичів першого, другого та третього рівнів споріднення при досягненні дискримінаційного порогу $\geq 0,4\%$ та ≥ 5 балів при тестуванні за допомогою алгоритму BOADICEA та МБС, відповідно. Для передбачення високого комбінованого ризику носійства *BRCA1/2* мутаційних алелей слід використовувати предиктивний рівень позитивності $\geq 1,3\%$ для алгоритму BOADICEA та ≥ 12 балів для МБС.

Матеріали систематизовані науковцями відділу медичної генетики ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (ННЦРМ) у відповідності до сучасних міжнародних стандартів, у рамках виконання науково-дослідних робіт: “Розробка рекомендацій щодо генетичного тестування схильності до розвитку раку грудної залози та медико-генетичного консультування жінок, які зазнали дії іонізуючої

радіації внаслідок аварії на ЧАЕС” (2011-2013 рр., № держреєстрації 0111U000754) та “Порівняльне дослідження генетичної схильності до розвитку раку молочної залози у жінок, які зазнали дії іонізуючої радіації внаслідок аварії на ЧАЕС” (2014-2016 рр., № держреєстрації 0114U002848).

Використання запропонованих методичних рекомендацій для скринінгу та визначення мутаційного статусу *BRCA1* та *BRCA2* удосконалисть діагностику лікування та профілактику РМЗ як в осіб, опромінених внаслідок аварії на ЧАЕС, так і в пацієнтів без радіаційного анамнезу, відповідно до сучасного рівня медичної науки.

Методичні рекомендації адресовано лікарям-генетикам та лікарям-лаборантам-генетикам, онкологам.

Методичні рекомендації з даної проблеми видаються в Україні вперше.

1.1 Методи і підходи до тестування носійства мутації *BRCA1* та *BRCA2*

В дослідженні для виявлення ймовірних носіїв мутацій *BRCA1* та *BRCA2* використані наступні алгоритми: МБС, Penn II, BOADICEA та Myriad, які є найбільш поширеними у світовій практиці. Вони базуються на використанні клініко-генетичних критеріїв і бальних систем з одного боку, та емпіричного підходу, що ґрунтується на досвіді крупних центрів, з іншого, статистичних підходах. Кожна модель розраховує ризик носійства патогенних алелей *BRCA1* і *BRCA2* на основі включення випадків діагнозу раку в сім'ї. Всі моделі включають сімейний анамнез РМЗ і РЯ. Крім того, МБС, моделі BOADICEA і Penn II враховують випадки раку підшлункової залози (РПЗ) та раку передміхурової залози (РПМЗ). Порівняльний аналіз моделей наведено в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1 - Застосування та використання моделей оцінки ризику носійства мутацій генів *BRCA1/2*

Алгоритми	Метод введення та розрахунок даних	Включення даних про онкопатологію	Застосованість	Сімейний анамнез включає родичів
Myriad	on-line	РМЗ у жінок та чоловіків, РЯ	для усіх осіб	I та II рівнів споріднення
МБС	ручний підрахунок балів	РМЗ у жінок та чоловіків, РЯ, РПЗ, РПМЗ	за виключенням євреїв-ашкеназі	I, II та III рівнів споріднення
Penn II	on-line	РМЗ у жінок та чоловіків, РЯ, РПЗ, РПМЗ	для жінок з сімейними випадками РМЗ.	I, II та III рівнів споріднення
BOADICEA	on-line	білатеральний РМЗ, РМЗ у жінок та чоловіків, РЯ, РПЗ, РПМЗ	для усіх осіб незалежно від статі та онкологічного статусу	I, II та III рівнів споріднення

МБС – це система балів для ручного підрахунку, яка враховує вікові особливості захворювання членів родини першого, другого та третього рівнів споріднення на РМЗ у жінок та чоловіків, РЯ, РПЗ та

РПМЗ, не застосовується для євреїв-ашкеназі. На відміну від інших алгоритмів не вимагає наявності комп'ютера та інтернету.

Модель Myriad для проведення розрахунку враховує наступні параметри: наявність або відсутність РМЗ у пацієнта і / або у родичів першого або другого рівня споріднення, вік маніфестації захворювання (<50 або ≥ 50 років), наявність або відсутність РЯ у пацієнта і / або у родичів першого або другого рівня споріднення та факту етнічної приналежності пацієнта до євреїв-ашкеназі.

Модель Penn II включає наступні відомості про родичів пацієнтки у трьох поколіннях: кількість жінок в родині з діагнозом РМЗ та РЯ, окремі випадки РЯ або раку фаллопієвих труб за відсутності РМЗ, кількість випадків РМЗ у віці 50 років, наявність злоякісної пухлини молочної залози у матері та доньки, наявність білатерального РМЗ, чоловічого РМЗ, а також випадки РПЗ та РПМЗ в родині. Модель Penn II також враховує приналежність жінок до євреїв-ашкеназі. Важливо зазначити, що ця модель не використовується для розрахунку ризику носійства мутацій для жінок, в родині котрих немає випадків РМЗ.

Алгоритм BOADICEA – комп'ютерна програма, яка крім розрахунку ймовірності носійства мутацій, визначає ризик розвитку РМЗ і РЯ у здорових осіб протягом усього життя, вимагає введення віку на момент консультування або смерті, року народження, інформації відносно білатерального РМЗ для всіх членів сім'ї; включає результати генетичного тестування мутацій *BRCA1* і *BRCA2*, якщо воно проводилося. Нова версія BOADICEA 2013 року включає інформацію про результати гістохімічного дослідження клітин пухлини молочної залози, зокрема щодо рецептору естрогену (РЕ), рецептору прогестерону (РП), HER-2/neu, цитокератину 14 та 5/6.

Розрахунки та аналіз ризиків проводилися ретроспективно в 2012-2016 роках з використанням МБС (версії 2009 року), 3-ої версії

BOADICEA, Penn II, IBIS і Myriad з оцінкою ризиків окремо для генів *BRCA1* і *BRCA2*, а також комбіновано для обох генів.

Згідно сучасних вимог доказової медицини, аналіз ефективності алгоритмів розрахунку вірогідності носійства мутацій генів *BRCA1* та *BRCA2* повинен враховувати їх операційні характеристики – чутливість та специфічність, а також інтегральні критерії – прогностичну цінність позитивного та негативного результатів. Для забезпечення точної оцінки ризику РМЗ алгоритми ймовірності носійства мутацій *BRCA1* і *BRCA2* повинні мати високу чутливість та специфічність. З точки зору статистики, операційні характеристики моделей найкраще представляти у вигляді ROC-кривих. ROC-криві є визначальними при оцінці ефективності будь-якої моделі тим більше, якщо використання алгоритмів для певної популяції раніше не проводилося. Тому для оцінки здатності алгоритмів визначати вірогідність носійства мутацій *BRCA1* і *BRCA2* на індивідуальному рівні у пацієнтів з мутацією та осіб без мутантних алелів з наявністю, або без РМЗ, в нашому дослідженні був проведений дискримінаційний аналіз із використанням ROC-кривих з 95% довірчим інтервалом (ДІ). Ефективність роботи досліджуваних моделей оцінювали за величиною площі під кривою (ППК). Чим ближче ППК до 1, тим вище ефективність роботи досліджуваного алгоритму. Якщо ППК алгоритмів дорівнює 1, це означає, що дані моделі є ідеально точні, тоді як 0,5 (нейтральна площа) та менше – вказує на відсутність дискримінаційних здібностей моделі. Якість досліджуваних алгоритмів оцінювали за експертною шкалою для значень ППК (таблиця 1.2).

Таблиця 1.2 - Оцінка значень ППК

Інтервал ППК	Якість моделі
0,9-1,0	відмінна
0,8-0,9	дуже гарна
0,7-0,8	хороша
0,6-0,7	середня
0,5-0,6	незадовільна

Визначення ППК алгоритмів, проведення їх порівняльного аналізу та побудову ROC-кривих здійснювали за допомогою статистичних програм, що знаходяться у вільному доступі в мережі Інтернет.

1.2 Опрацювання алгоритмів розрахунку ризиків носійства мутацій генів *BRCA1* та *BRCA2* для жінок України

Для розрахунку ймовірності носійства мутацій *BRCA1/2* за допомогою алгоритмів BOADICEA, МБС, Penn II та Myriad було проведено генеалогічні, молекулярно-генетичні дослідження, здійснено збір та аналіз клінічних, патогістологічних, імуногістохімічних даних. В когорті дослідження увійшло 425 пацієток: 146 хворих на РМЗ (73 особи з радіаційним анамнезом та 73 особи без радіаційного анамнезу) та 279 жінок без РМЗ (177 жінок, які приймали участь у ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС та 102 особи без радіаційного анамнезу). Пацієнти були відібрані для дослідження відповідно до принципів Гельсінської декларації після затвердження дослідження Комітетом з медичної етики ННЦРМ.

Для кожної пацієнтки складали родовід, виходячи із даних про 3-4 покоління, включаючи відомості про батьків, дітей, сибсів та прабатьків, з подальшим проведенням клініко-генеалогічного аналізу. Акцентували увагу на членах родини з онкологічною патологією, зокрема з РМЗ та РЯ (рис. 1.1).

При вивченні родоводів встановлено високу частоту обтяженого сімейного анамнезу щодо РМЗ та/або РЯ (2 та більше випадків) ($p < 0,001$) у когорті хворих на РМЗ порівняно з групою пацієнтів без даної патології як в опромінених внаслідок аварії на ЧАЕС осіб (25,4% проти 1,7%), так і серед пацієнтів без радіаційного анамнезу (27,1% проти 2%).

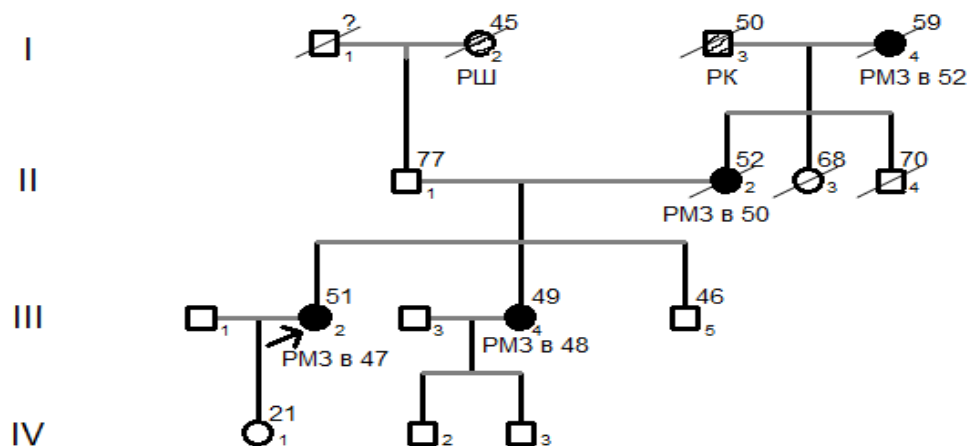


Рисунок 1.1 - Родовід хворої на РМЗ пацієнтки С з обтяженим сімейним анамнезом щодо РМЗ

Примітки:

- - РМЗ (рак молочної залози)
- ⊗ ⊠ - інша онкологічна патологія: РШ - рак шлунку, РК - рак кишківника
- □ - померлі

Молекулярно-генеалогічні дослідження, а саме, виділення геномної ДНК, ампліфікацію ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), електрофорез продуктів виділення ДНК і ампліфікатів ПЛР проводили на базі відділу медичної генетики ННЦРМ. Геномну ДНК виділяли зі зразків периферичної крові з використанням набору Nucleospin DNA Mini-Kit (Duren, Німеччина) та із фіксованих формаліном і залитих парафіном зразків тканини пухлини з використанням набору для виділення ДНК Quiamp DNA Micro Kit (Quiagen, Німеччина) відповідно до інструкцій виробників. Визначення мутантних алелей 5382insC і 185delAG гену *BRCA1* та 6174delT гену *BRCA2* проводили за допомогою алель-специфічної мультиплексної ПЛР з використанням умов ампліфікації ДНК і послідовності праймерів для ідентифікації цих мутацій, опублікованих Chan зі співавторами (1999). Ампліфікацію ДНК здійснювали за допомогою термоциклеру Gene-Amp PCR 2400 (Applied Biosystems, США)

та суміші для ПЛР GoTaq Green PCR Master Mix (Promega, США). Продукти ПЛР для візуалізації розділяли відповідно молекулярній вазі за допомогою електрофорезу у 2,5% агарозному гелі з забарвленням бромистим етидієм.

Визначення мутаційного статусу генів *BRCA1/2* виконано у 420 пацієнтів. Частота мутацій в групі осіб з РМЗ, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС, склала 5,7% (у 4 з 70), у трьох випадках виявлено мутацію 5382insC гена *BRCA1*, в одному – 185delAG гена *BRCA1*. У контрольній групі неопромінених осіб з РМЗ мутації визначено у 8,4% (6 з 71) пацієнтів, усі випадки представлені алельним варіантом 5382insC гена *BRCA1*. При молекулярно-генетичному дослідженні осіб без РМЗ, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС, частота мутацій склала 1,1% (2 зі 177), в групі здорових осіб без радіаційного анамнезу – 1% (1 зі 102) та представлені алельним варіантом 5382insC. Досліджені мутації суттєво частіше зустрічались у хворих на РМЗ порівняно із практично здоровими жінками (10 із 141 проти 3 із 279 випадків відповідно, $p=0,001$).

Серед досліджуваного спектру мутацій в групах дослідження ідентифіковано 13 мутацій в гені *BRCA1*, 12 з яких представлено алельним варіантом 5382insC і лише 1 – 185delAG. Натомість, мутації 6174delT у гені *BRCA2* не виявлено. Таким чином, мутація 5382insC переважає серед досліджуваного спектру мутацій (рис. 1.2)

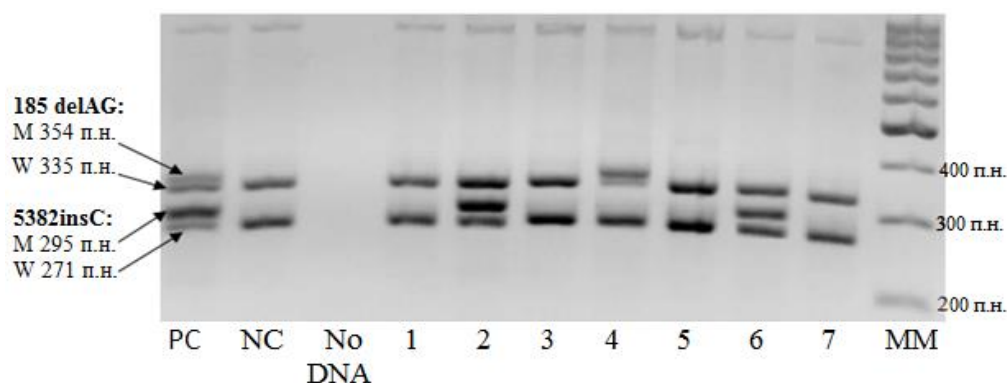


Рисунок 1.2 - Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянок гену *BRCA1*

W – алель дикого типу; М – мутантна алель; РС – позитивний контроль; NC – негативний контроль; No DNA – відсутність матриці ДНК; 1-7 – зразки, що вивчались: доріжки 2, 6 – мутація 5382insC, доріжка 4 – мутація 185delAG; MM – маркер молекулярної ваги.

Наявність мутації, визначеної за допомогою алель-специфічної мультиплексної ПЛР підтверджували автоматичним ферментативним секвенуванням за Сенгером (рис. 1.3) на базі відділу геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

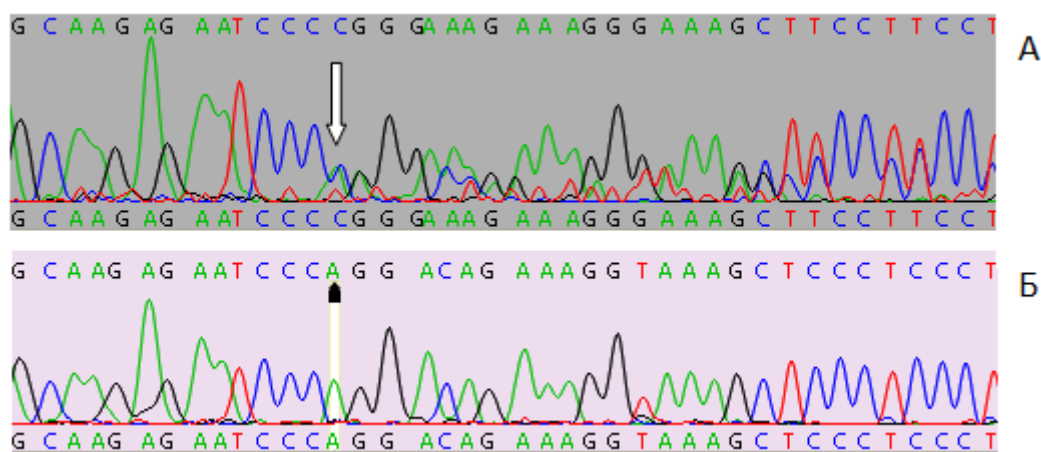


Рисунок 1.3 - Послідовність гена *BRCA1* у хворих на РМЗ, визначена за допомогою автоматичного ферментативного секвенування за Сенгером

А – зразок результатів секвенування ДНК з мутацією 5382insC. Стрілкою позначене місце мутації зі вставкою додаткового цитозину. Мутація була виявлена у пацієнтки з білатеральним РМЗ, перший з яких розвинувся у віці 39 років, другий у 51 рік та яка має родичку другого ступеня споріднення з раком матки.

Б – зразок результатів секвенування ДНК без мутації 5382insC у хворої на РМЗ жінки з маніфестацією захворювання у віці 56 років без обтяженого сімейного анамнезу. Стрілкою позначене місце, де при мутації вставляється додатковий цитозин.

Зіставляючи дані генеалогічного та молекулярно-генетичного досліджень когорт хворих та осіб без РМЗ, обтяжений сімейний анамнез щодо РМЗ та/або РЯ частіше зустрічався серед осіб з *BRCA*-позитивним

статусом порівняно з пацієнтами без мутацій (табл. 1.3).

Таблиця 1.3 - Розподіл мутацій в досліджуваних когортах в залежності від обтяженості родоводу РМЗ та/або РЯ

Особиста історія	Сімейний анамнез	Хворі на РМЗ (n=146)		Пацієнти без РМЗ (279)	
		BRCA+	BRCA-	BRCA+	BRCA-
РМЗ у віці ≤ 40 р.	без РМЗ та РЯ	0	15	-	-
РМЗ у віці 41-50 р.	без РМЗ та РЯ	0	41	-	-
РМЗ у віці ≤ 50 р.	1 РМЗ у віці ≤ 50 р. та/або РЯ в будь-якому віці	4	4	-	-
РМЗ у віці ≤ 50 р.	≥ 1 РМЗ у віці за 50 років	2	3	-	-
РМЗ у віці 51-60 р.	без РМЗ та РЯ	1	41	-	-
РМЗ у віці 51-60 р.	1 РМЗ або РЯ в будь-якому віці	0	14	-	-
РМЗ в будь-якому віці	не відомо	0	9	-	-
РМЗ в будь-якому віці	≥ 2 РМЗ та/або ≥ 1 РЯ в будь-якому віці	1	4	-	-
РМЗ в будь-якому віці	РМЗ у чоловіків	0	1	-	-
РМЗ в будь-якому віці	білатеральний РМЗ	1	2	-	-
Білатеральний РМЗ	будь-який	1	2	-	-
Відсутня	відсутній	-	-	1	248
Відсутня	1 РМЗ	-	-	0	20
Відсутня	1 РЯ	-	-	0	5
Відсутня	2 РМЗ	-	-	1	1
Відсутня	1 РМЗ+1 РЯ	-	-	0	1
Відсутня	білатеральний РМЗ	-	-	0	1
Відсутня	синдром РМЗ та РЯ	-	-	1	0

Обтяжений сімейний анамнез щодо РМЗ та/або РЯ асоціюється з *BRCA*-позитивним статусом як у хворих на РМЗ, так і у осіб без захворювання. Загалом обтяжений генеалогічний анамнез встановлено у 76,9% всіх випадків *BRCA*-позитивних осіб та у 7,7% всіх пацієнтів без патологічних алелей.

Оскільки деякі алгоритми визначення ризику носійства мутацій *BRCA1/2* у хворих на РМЗ включали характеристики пухлин молочної залози, одним із завдань нашого дослідження було визначення клініко-

морфологічних та імуногістохімічних особливостей РМЗ, асоційованого з *BRCA*-позитивним статусом.

Аналізуючи гістологічний тип *BRCA*-позитивних пухлин було встановлено, що у 90% (9 з 10) хворих переважав інфільтративний протоковий рак (ІПР). У 77,1% (101 зі 131) хворих без мутацій також переважав ІПР.

При вивченні ступеню злоякісності визначено достовірно більшу різницю низькодиференційованих пухлин серед *BRCA*-асоційованих випадків, порівняно з *BRCA*-негативними раками (6 з 10 проти 14 зі 131 осіб, $p < 0,001$). Відмінностей щодо розміру пухлин, статусу регіонарних лімфатичних вузлів та метастазування у віддалені від пухлини органи під час встановлення діагнозу між особами з *BRCA*-позитивним РМЗ та хворими без мутацій відмічено не було.

Зіставляючи дані рецепторного статусу пухлин та молекулярно-генетичного дослідження, встановлено, що в когорті хворих *BRCA1*-позитивний рак частіше мав негативний статус РЕ та РП, ніж *BRCA1*-негативний: 10 з 10 проти 35 зі 131 та 9 з 10 проти 38 зі 131, відповідно. Пухлини з відсутністю гіперекспресії HER2/neu переважали серед хворих з мутаціями та без них (у 8 з 10 проти 116 зі 131), статистичної різниці між групами за даним показником не визначено. Потрійно-негативний статус пухлин за експресією РЕ, РП та HER-2/neu в групі хворих з *BRCA1*-асоційованим РМЗ зустрічався достовірно частіше, ніж у осіб без мутації (7 з 10 проти 26 зі 131 пацієнтів). Статистичних відмінностей при дослідженні інших імуногістохімічних показників, зокрема С-kit, цитокератину 5/6, p53, Ki-67 між групами дослідження не визначено.

1.3 Аналіз ефективності алгоритмів Penn II, BOADICEA, Манчестерської бальної системи та Myriad

Розрахунок ризику носійства мутацій *BRCA1* та *BRCA2* за допомогою досліджуваних моделей проводили як для хворих на РМЗ осіб,

так і для пацієнтів без РМЗ, в родоводі яких присутній принаймні 1 випадок РМЗ.

Ефективність тестування вірогідних носіїв *BRCA1/2* мутацій серед всіх хворих на РМЗ представлено на рис. 1.4.

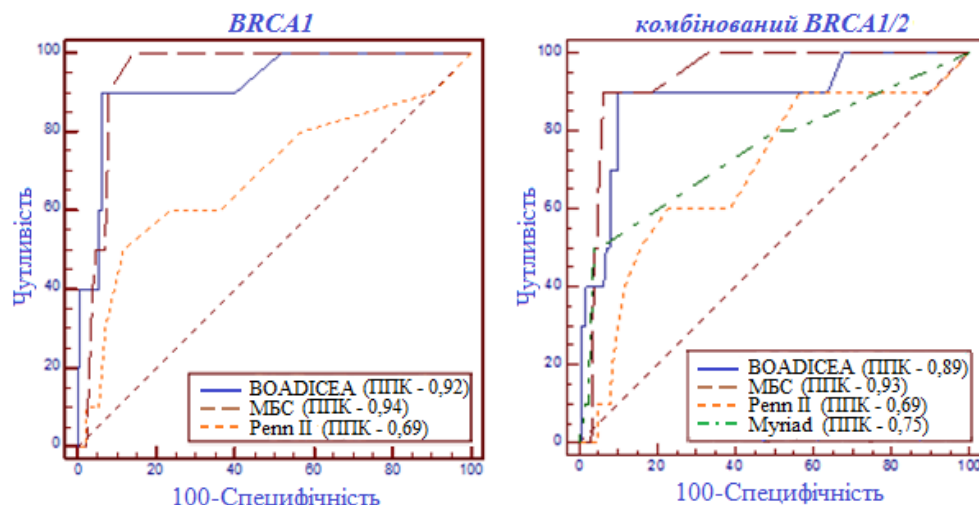


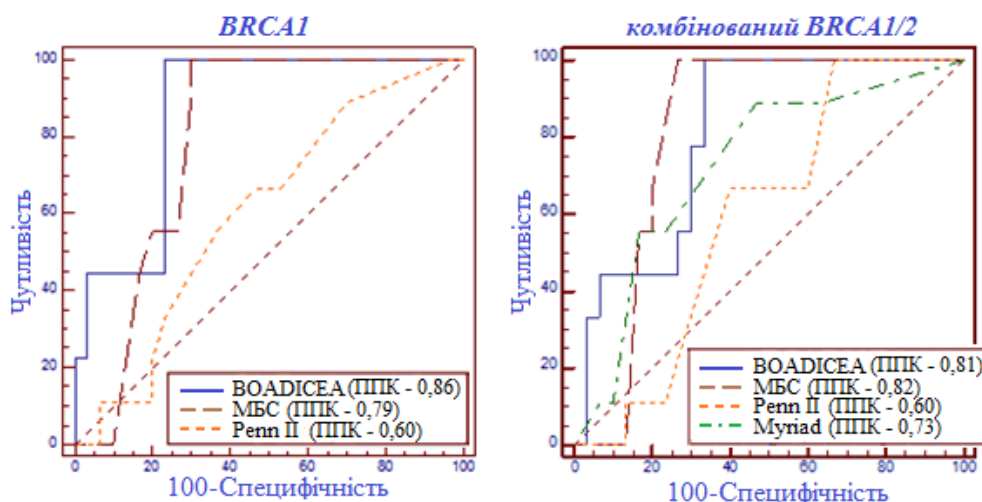
Рисунок 1.4 - ROC-криві алгоритмів розрахунку ризику носійства мутацій для хворих на РМЗ

При порівнянні ППК моделі Penn II з алгоритмом BOADICEA та МБС, визначена дискримінаційна відмінність щодо кращого прогнозування *BRCA1* і комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій останніми. Також достовірно кращою ППК для передбачення комбінованого ризику *BRCA1/2* патогенних алелей, визнано МБС порівняно до Myriad. Під час зіставлення ППК алгоритмів BOADICEA та Myriad знайдено тенденцію щодо кращого прогнозування комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій першим з них. Різниці між ППК моделей BOADICEA та МБС для виявлення як *BRCA1*, так і комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій не знайдено, що може свідчити про однаково високу дискримінаційну їх здатність в когорті хворих. Оптимальні пороги та операційні характеристики найкращих за дискримінуючою потужністю алгоритмів для хворих на РМЗ представлено в табл. 1.4

Таблиця 1.4 - Показники ефективності найкращих за дискримінуючою потужністю алгоритмів для хворих на РМЗ

Параметри	Для прогнозу <i>BRCA1</i> мутацій		Для прогнозу <i>BRCA1/2</i> мутацій	
	BOADICEA	МБС	BOADICEA	МБС
Оптимальний поріг	$\geq 6,7\%$	≥ 5 бали	$\geq 9\%$	≥ 13 балів
Чутливість, %	90,0	100	90,0	90,0
Специфічність, %	93,7	85,8	91,3	93,7
ПЦПР, %	52,9	35,7	45,0	52,9
ПЦНР, %	99,2	100	99,1	99,2

Також дискримінаційна потужність досліджуваних алгоритмів була оцінена окремо для хворих на РМЗ з обтяженими родовами щодо РМЗ та/або РЯ (рис. 1.5).



Риунок 1.5 - ROC-криві алгоритмів розрахунку ризику носійства *BRCA1/2* мутацій для групи хворих на РМЗ з обтяженими родовами

Порівнюючи ППК алгоритмів для прогнозування *BRCA1* патогенних алелей в групі хворих з родовами, обтяженими РМЗ та/або РЯ, визначено кращі дискримінаційні характеристики для моделі BOADICEA у порівнянні з алгоритмом Penn II. Спостерігається тенденція до більшої ППК для МБС на противагу моделі Penn II. Різниці між ППК моделей BOADICEA та МБС не знайдено, що свідчить про однаково високу їх дискримінаційну здатність щодо виявлення носіїв мутацій *BRCA1* в когорті хворих із обтяженими родовами, не залежно від наявності або відсутності у них Чорнобильського статусу.

Стосовно передбачення комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій в групі хворих із обтяженими родовами, кращу дискримінаційну відмінність знайдено для алгоритму BOADICEA та МБС порівняно до моделі Penn II. Різниці між ППК інших алгоритмів щодо прогнозування комбінованого носійства патогенних алелей *BRCA1/2* в групі хворих на РМЗ з обтяженими родовами не виявлено.

Для подальшого визначення ефективності досліджуваних алгоритмів їх ППК було порівняно з нейтральною площею. Встановлено, що серед досліджуваних алгоритмів, модель BOADICEA та МБС мають статистично значущу дискримінаційну цінність як для прогнозу носіїв *BRCA1* мутацій, так і для визначення вірогідності комбінованого ризику *BRCA1/2* патогенних алелей у хворих з обтяженими родовами щодо РМЗ та/або РЯ. Оптимальні дискримінаційні рівні даних алгоритмів показано в табл. 1.5.

Таблиця 1.5 - Показники ефективності найкращих за дискримінуючою потужністю алгоритмів для хворих з обтяженими родовами

Параметри	Для прогнозу <i>BRCA1</i> мутацій		Для прогнозу <i>BRCA1/2</i> мутацій	
	BOADICEA	МБС	BOADICEA	МБС
Оптимальний поріг	$\geq 7,7\%$	≥ 6 балів	$\geq 9\%$	≥ 13 балів
Чутливість, %	100	100	100	100
Специфічність, %	76,7	70,0	66,7	73,3
ПЦПР, %	56,3	50,0	47,4	52,9
ПЦНР, %	100	100	100	100

Ефективність алгоритмів у практично здорових осіб, в родовах яких присутній хоча б 1 випадок РМЗ поміж родичів I, II та III-го рівнів споріднення, наведена на рис. 1.6.

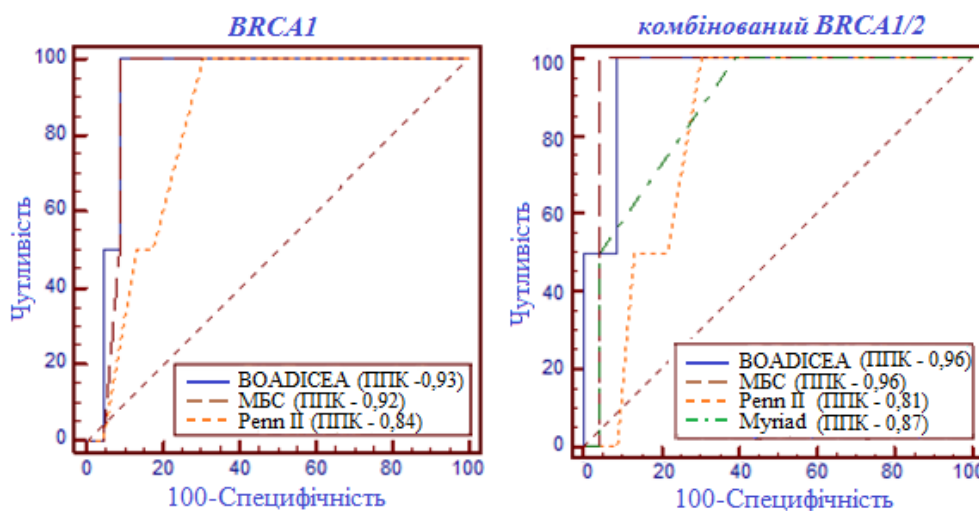


Рисунок 1.6 - ROC-криві алгоритмів розрахунку ризику носійства *BRCA1/2* мутацій для осіб без РМЗ з наявністю в родоводі принаймні 1 випадку РМЗ

При порівнянні ППК різних алгоритмів, статистичної різниці між ними не знайдено, як для передбачення *BRCA1*, так і для комбінованого ризику носійства *BRCA1/2* патогенних алелей. Це може вказувати на однакову дискримінаційну потужність алгоритмів у досліджуваній когорті осіб без РМЗ. При порівнянні ППК кожного алгоритму з їх нейтральною площею дискримінаційну цінність знайдено для всіх досліджуваних алгоритмів. Проте, порівнюючи операційні характеристики моделей щодо прогнозування комбінованого ризику мутацій, виявлена достовірно краща специфічність МБС та алгоритму BOADICEA по відношенню до алгоритму Myriad. Також знайдена краща здатність МБС ідентифікувати осіб з відсутністю носійства *BRCA1/2* патологічних алелей на відміну від моделі Penn II. Гірша специфічність унеможливило застосування даних моделей для визначення вірогідних носіїв комбінованого ризику мутацій в когорті осіб без РМЗ з 1 або більше випадками РМЗ в родоводі.

Оптимальні дискримінаційні рівні з операційними характеристиками найкращих за прогнозуванням мутацій алгоритмів досліджуваної когорти представлено в табл. 1.6.

Таблиця 1.6 - Показники ефективності найкращих за дискримінуючою потужністю алгоритмів для осіб без РМЗ з наявністю в родоводі принаймні 1 випадку РМЗ

Параметри	Для прогнозу <i>BRCA1</i> мутацій			Для прогнозу <i>BRCA1/2</i> мутацій	
	BOADICEA	МБС	Penn II	BOADICEA	МБС
Оптимальний поріг	$\geq 7,7\%$	≥ 6 балів	$\geq 2\%$	$\geq 9\%$	≥ 13 балів
Чутливість, %	100	100	100	100	100
Специфічність, %	76,7	70,0	69,6	66,7	73,3
ПЦПР, %	56,3	50,0	22,2	47,4	52,9
ПЦНР, %	100	100	100	100	100

Виходячи з результатів прогнозування мутаційних алелей, найліпшу дискримінаційну здатність щодо ідентифікування вірогідних *BRCA*-позитивних та *BRCA*-негативних осіб у когортах хворих на РМЗ та пацієнтів без злоякісних новоутворень в молочній залозі мають лише модель BOADICEA та МБС за встановлених для них оптимальних порогів.

1.4 Алгоритм визначення генетичної схильності до розвитку РМЗ

Результати проведеного комплексного аналізу генеалогічних, молекулярно-генетичних, морфологічних та імуногістохімічних даних та результатів тестування ймовірності носійства мутацій *BRCA1* і *BRCA2* дозволили створити алгоритм визначення схильності до розвитку РМЗ, зокрема *BRCA*-позитивного.

На першому етапі пропонуємо проводити збір анамнестичних даних з акцентуванням уваги на випадках РМЗ та РЯ в родоводі, віку маніфестації даних захворювань. На цьому етапі формується група ризику з підозрою щодо носійства патогенних алелей *BRCA1* та *BRCA2*. Всім особам цієї групи проводиться обов'язкова оцінка ризику носійства даних мутацій за допомогою алгоритмів з найкращою дискримінаційною здатністю – BOADICEA або МБС, що являє собою другий етап

дослідження. На третьому етапі, при досягненні визначених оптимальних порогів моделей, слід проводити молекулярно-генетичне дослідження трьох найбільш поширених патогенних алелей: 5382insC, 185delAG гена *BRCA1* та 6174delT гена *BRCA2* методом ПЛР. Молекулярно-генетичні дослідження є необхідним етапом в діагностиці спадкового РМЗ, оцінці прогнозу його перебігу і відповіді на терапію, профілактиці білатерального РМЗ і лікуванні *BRCA*-позитивного РМЗ у осіб із захворюванням, профілактичних заходів щодо розвитку РМЗ у жінок без патології, та при МГК обтяжених родин щодо РМЗ та/або РЯ. При відсутності мажорних мутацій необхідно провести секвенування всього гену *BRCA1* та гену *BRCA2*. Таким чином можна запровадити раціональний підхід щодо визначення схильності до розвитку *BRCA*-позитивного РМЗ

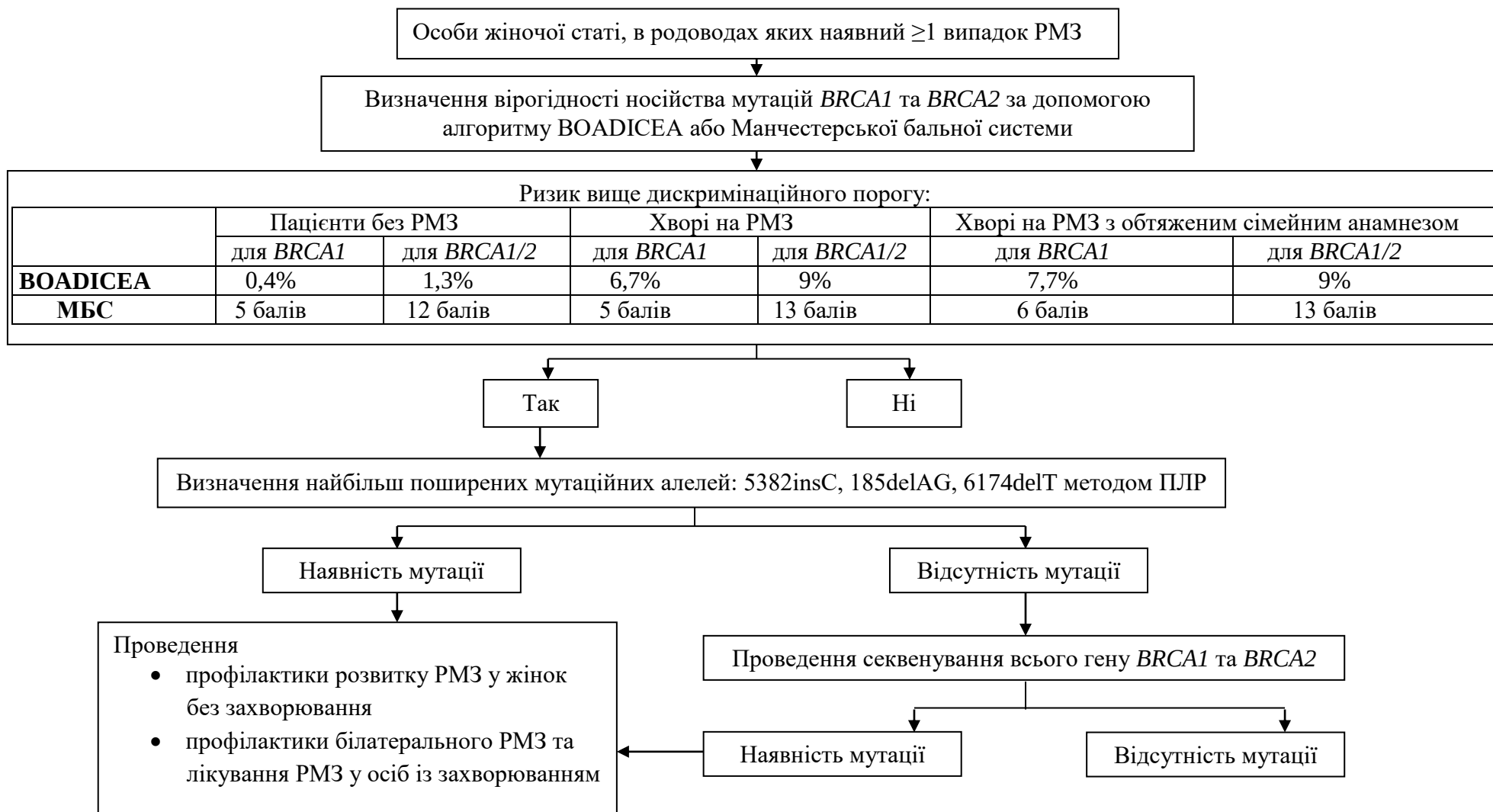


Рис. 1.7 - Алгоритм виявлення носійства мутацій в генах *BRCA1/2*

2 ВИСНОВКИ

1. За результатами прогнозування мутаційних алелей найкращу дискримінаційну здатність щодо ідентифікування вірогідних *BRCA*-позитивних та *BRCA*-негативних осіб у когортах хворих на РМЗ та пацієнтів без злоякісних новоутворень в молочній залозі, мали моделі BOADICEA та МБС. Алгоритми Penn II та Myriad виявилися недостатньо ефективними у використанні для українських пацієнтів.

2. Для прогнозування *BRCA1* мутацій алгоритм BOADICEA характеризується предиктивними рівнями позитивності та ППК $\geq 7,7\%$ та 0,86 для хворих з обтяженими родоводами, $\geq 6,7\%$ та 0,92 для всіх хворих на РМЗ, незалежно від сімейного анамнезу, $\geq 0,4\%$ та 0,95 для практично здорових осіб з 1 та більше випадками РМЗ серед родичів, відповідно. Для прогнозування комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій дані показники склали $\geq 9\%$ та 0,81, $\geq 9\%$ та 0,89, $\geq 1,3\%$ та 0,96, відповідно до зазначених груп.

3. За МБС до групи високого ризику носійства *BRCA1* мутацій слід відносити осіб з сумою балів не менше 5 для жінок без РМЗ з випадками РМЗ серед родичів (ППК=0,92) і для хворих на РМЗ, незалежно від сімейного анамнезу (ППК=0,94), та ≥ 6 балів для хворих з обтяженими родоводами (ППК=0,79). Для передбачення високого комбінованого ризику носійства *BRCA1/2* мутацій слід використовувати суму балів у показниках ≥ 12 для осіб без РМЗ, в родоводі яких наявні випадки РМЗ серед родичів (ППК=0,96), та ≥ 13 балів для всіх хворих на РМЗ (ППК=0,93) і пацієнтів з РМЗ із обтяженим сімейним анамнезом (ППК=0,82).

4. Розроблено алгоритм виявлення мутацій *BRCA* на основі результатів проведеного комплексного аналізу генеалогічних, молекулярно-генетичних, морфологічних та імуногістохімічних даних, показників тестування ймовірності носійства мутацій *BRCA1/2* для забезпечення стратегії раціонального використання молекулярно-генетичного дослідження.

3 ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Имянитов, Е.Н. Наследственный рак молочной железы: Обзор [Текст] / Е. Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2013. – Т. 11. - № 4. – С. 258–264.
2. Рибченко Л.А. Оцінка вірогідності носійства мутації генів *BRCA1/2* за допомогою Манчестерської бальної системи та алгоритму BOADICEA / Л. А. Рибченко, Г. М. Бичкова, Г. В. Скибан, А. М. Тімшина, С. В. Клименко // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. – Київ. – 2013. – Вип. 22, книга 3. – С.415-421.
3. BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of *BRCA1/BRCA2*, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes [Text] / D. A. Berry [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2011. – Vol. 20. – P. 2701-2712.
4. Addition of pathology and biomarker information significantly improves the performance of the Manchester scoring system for *BRCA1* and *BRCA2* testing [Text] / D. G. R. Evans, F. Lalloo, A. Cramer [et al.] // J. Med. Genet. – 2009. – Vol. 46. – P. 811-817.
5. The Penn II *BRCA1* and *BRCA2* mutation risk evaluation model [Electronic resource]. – Mode of access. : <http://www.afcri.upenn.edu/itacc/penn2>.
6. *BRCA* Risk Calculator [Electronic resource]. – Mode of access. : <http://www.myriadtests.com/provider/brca-mutation-prevalence.htm>.
7. IBIS Breast Cancer Risk Evaluation [Electronic resource]. – 2008. – Mode of access. : <http://www.ems-trials.org/riskevaluator>.
8. A Beta version of the new BOADICEA Web program (BWA v3) [Electronic resource]. – Mode of access : <https://pluto.srl.cam.ac.uk/cgi-bin/bd3/v3beta1/bd.cgi>.
9. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer [Text] / A. C. Antoniou [et al.] // Br. J. Cancer. – 2006. - Vol. 91. – P. 1580-1590.
10. National Institute for Health and Clinical Excellence. Familial breast cancer: The classification and care of women at risk of familial breast

cancer in primary, secondary and tertiary care [Text].— London: NICE, 2008.- 240 p.

11. American Congress of Obstetricians and Gynecologists Bulletins «Hereditary breast and ovarian cancer syndrome» [Text] // Gynecologic Oncology. - 2009. - V. 113. - P. 957– 966.

12. Рибченко Л.А. Мутації в генах *BRCA1/2* у жінок з раком молочної залози та відносно здорових жінок, які приймали участь у ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС / Л.А. Рибченко, Г.М. Бичкова, Г.В. Скибан, А.М. Тимшина, С.В. Клименко // Архів клінічної та експериментальної медицини. – 2012. – Т.21, №2. – С.183-185.

13. Рибченко Л.А., Клименко С.В. Визначення імовірних носіїв мутацій *BRCA1* та *BRCA2* серед жінок з раком молочної залози та без нього / Л.А. Рибченко, С.В. Клименко // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології : збірник наукових праць. – Київ-Луганськ, 2014. – Вип. 2, № 122. – С. 40-47.

14. Рибченко Л.А. Порівняння моделей оцінки ризику носійства мутацій *BRCA1* та *BRCA2* у хворих на рак молочної залози // Л.А. Рибченко, Г.М. Бичкова, Г.В. Скибан, С.В. Клименко // Медичні перспективи. – 2013. – Т. 18, № 4. – С.68-74.

15. Рибченко Л.А. Прогнозування вірогідності носійства мутацій *BRCA1* та *BRCA2* у жінок з обтяженим сімейним анамнезом щодо раку молочної залози та/або раку яєчників / Л.А. Рибченко, Г.М. Бичкова, Г.В. Скибан, С.В. Клименко // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології : збірник наукових праць. – Київ, 2013. – Вип.18. – С.253-260.

16. Рибченко Л.А. Аналіз частоти найбільш поширених мутацій генів *BRCA1* та *BRCA2* у жінок, які приймали участь у ліквідації наслідків Чорнобильської катастрофи / Л.А. Рибченко, Г.М. Бичкова, Г.В. Скибан, Н.С. Ярошенко, С.В. Клименко // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології : збірник наукових праць. – Київ, 2012. – Вип.17. – С.267-273.