Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
European Journal of Medicine. Series B
Has been issued since 2014.
ISSN: 2409-6296
Vol. 1, No. 1, pp. 20-26, 2014

DOI: 10.13187/ejm.s.b.2014.1.20
www.ejournal27.com

UDC 618.19-007.61-06:575.113.1

Association PvuII Estradiol Receptor Alpha (EsRα) Gene Polymorphism With Expressionon EsRα in Benign Breast Dysplasia

[1] Ivan M. Lukavenko
[2] Vladimir V. Andrjushenko
[3] Victoriia Yu. Garbuzova
[4] Alexander V. Yazykov

[1] Sumy State University, Ukraine
Department of Surgery and Pediatric Surgery with Course of Urology
Postgraduate
[2] Sumy State University, Ukraine
Department of Surgery and Pediatric Surgery with Course of Urology
Ph.D, Associate Professor
[3] Sumy State University, Ukraine
Department of Physiology and Pathophysiology
Doctor of Biological science, Associate Professor
[4] Sumy State University, Ukraine
Department of Surgery and Pediatric Surgery with Course of Urology
Postgraduate
E-mail: doctorlv@ukr.net

Abstract

PvuII polymorphism (rs2234693) of EsRα gene in 84 patients with benign breast dysplasia (BBD) was determinated. Review 134 samples of histological material (mammary gland tissue) from 84 women with BBD has been carried out. The level of EsRα expression has been defined. Was shown that there is a connection between the PvuII polymorphism of the gene EsRα with different EsRα expression in breast tissue with BBD. Genotype T/T is characterized by a low level of expression and genotype C/C – high.

Link between the type of proliferative changes of the investigated polymorphism and receptor status of the tumor was not found.

Keywords: diagnosis; benign breast dysplasia; allelic polymorphism; genetic medicine.

Введение

С развитием рентгенологических, биохимических, молекулярно-генетических и иммуногистохимических (ИГХ) методов исследования сделан существенный шаг в изучении патогенеза опухолевых процессов в молочной железе. Однако несмотря на успехи современной науки, диагностика доброкачественной дисплазии молочной железы (ДДМЖ) остается недостаточно унифицированной. Ведущим направлением является разработка методов, на основе которых можно прогнозировать развитие предопухолевой патологии, и таким образом проводить профилактику рака молочной железы (РМЖ).

Важное значение в прогрессии пролиферации ткани молочной железы имеет эстроген-рецепторный статус клеток, поэтому нарушение экспрессии рецепторов стероидных гормонов связывают с рисками развития пролиферативной дисплазии. Однако сегодня отсутствуют четкие и объективные критерии о распределении, уровне и функциональной активности эстрогеновых рецепторов альфа (EsRα) в тканях молочной железы, их связь с гистологической формой болезни при пролиферативной дисплазии. Решение этой задачи может не только объяснить патогенетические механизмы развития ДДМЖ, но и предложить схемы индивидуального комплексного лечения, обосновать целесообразность гормонотерапии, определить корректные меры профилактики [1, 2].

Уровень экспрессии EsRα, зависит от многих факторов, в том числе и от структуры гена, который кодирует этот белок. В 1991 году появились первые и неоднозначные сообщения об однонуклеотидных полиморфизмах в гене EsRα, связанных с развитием малигнизации [2]. С того времени изучению роли аллельного полиморфизма гена EsRα в возникновении и прогрессии опухолевых процессов посвящено значительное количество научных исследований. Однако однозначного ответа на вопрос о связи эстрогенового статуса с ДДМЖ не получено.

Среди известных 2234 полиморфизмов гена EsRα человека наиболее изученным является PvuII (T1943C). В ряде работ доказано влияние полиморфизма PvuII на развитие дисгормональных болезней. Информации о связи полиморфизма PvuII с экспрессией EsRα в новообразованиях при ДДМЖ в украинской популяции не найдено.

Цель работы – провести анализ ассоциации аллельного PvuII полиморфизма гена EsRα со степенью пролиферации и экспрессией EsRα у пациентов с ДДМЖ.

Материалы и методы

Объектом исследования были жители Сумской области от 16 до 62 лет. Это 82 (97,6 %) женщины с ДДМЖ из группы риска РМЖ и 2 (2,4 %) мужчин, страдающие гинекомастией с узлообразованием и тенденцией к атипии. Средний возраст в исследуемой группе 32,3 ± 1,1 года. Критериями отбора пациентов в исследование были признаки генетической предрасположенности к болезням молочной железы, а именно: множественные первичные опухоли в одном органе; билатеральные первичные опухоли в парных органах; мультифокальность в одном органе; появление опухоли в раннем возрасте (до 21 года); один и более близких родственников с тем же типом опухолей; два родных человека и более с тем же типом опухоли; три родных человека и более в двух поколениях с опухолями одной локализации. Критериями исключения были: отказ пациента принимать участие в исследовании; непролиферативные изменения и отсутствие признаков генетической предрасположенности к болезням молочной железы.

Постановку диагноза и обследования пациентов, принимавших участие в исследовании, проводили согласно действующих приказов Министерства здравоохранения Украины № 624 от 03.11.2008 и № 645 от 30.07.2010 г. Исследование проводили с соблюдением основных положений Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине, Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации об этических принципах выполнения научных медицинских исследований с участием человека и приказа Министерства здравоохранения Украины № 690 от 23.09.2009 г. Пациенты подписали информированное согласие на обработку персональных данных и участие в исследовании с последующим забором венозной крови на генетический анализ.

Все больные подлежали хирургическому лечению – удалены очаги пролиферации ДДМЖ. У 44 (52,4 %) пациентов выявлено одно новообразование, у 34 (40,5 %) – два, у 6 (7,1 %) – три. Одностороннее поражение наблюдали у 54 (64,3 %) больных, двустороннее – у 30 (35,7 %). Отягощенный семейный анамнез по РМЖ встречался у 33 (39,3 %) человек. Удаленные новообразования размещали в тару с формалином и направляли на морфологические и иммуногистохимические исследования.

Изучены 134 новообразования ДДМЖ, полученных от 84 прооперированных пациентов. Выявлен преобладающий тип пролиферации, изучена экспрессия EsRα, проведены молекулярно-генетические исследования по определению PvuII полиморфизма гена EsRα.

ИГХ реакция проводилась на серийных парафиновых срезах толщиной 4–5 мкм, которые помещались на стеклах, покрытых APES-слоем. После депарафинизации и обезвоживания препараты проходили все этапы стандартного иммуногистохимического исследования. Для подтверждения достоверности ИГХ реакции использовали положительный и отрицательный контроли. В качестве негативного контроля брали образцы из исследуемых срезов, подлежащих стандартной процедуре ИГХ реакции, но без добавления первичных антител. Положительные контроли для каждого антитела выбирали в соответствии со спецификациями от фирмы производителя. Результаты иммуногистохимических реакций экспрессии EsRα оценивали полуколичественным способом с 8 бальной шкале с учетом доли окраски ядер и интенсивности их окраски по Allred D. C. [3]. Считали отрицательной реакцией сумму баллов 0–2, слабо положительной – 3–4 балла, положительной – 5–6 и сильнопозитивной – 7–8 баллов. К новообразованиям с эстрогенположительной (EsRα $^{+}$) ИГХ реакцией относили те, которые имели 3 и более баллов, остальные считали рецепторнегативными (EsRα^{-}).

PvuII (rs2234693) полиморфизм определяли методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP). В смесь для амплификации брали по 15 рМ специфичных праймеров: прямой - 5'CACACATCACCATTCTCAGC3' и обратный - 5' TCTAGACCACACTCAGGGTCTC3' ("Metabion", Германия), 50–100 нг ДНК, 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 ммоль сульфата магния, 200 мкм смеси четырех нуклеотидтрифосфатив, и 0,75 ЕД Taq-полимеразы ("Thermo Scientific", США), объем доводили до 25 мкл деионизированной водой. PCR проводили в термоциклере GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Амплификация состояла из 33 циклов: денатурация – 94° С (50 с), гибридизация праймеров – 64,5° С (45 с) и эллонгация – 72° С (1 мин). Для рестрикции использовали 3 ЕД рестриктазы Pvull ("Thermo Scientific", США) и 6 мкл амплификата. Инкубацию проводили при 37 ° С в течение 18 часов. Если в 1943 позиции гена EsRα находился тимин, амплификат, который состоял из 392 п.о., расщеплялся рестриктазой Pvull на два фрагмента – 342 и 50 п.о. В случае замены тимина на цитозин сайт рестрикции для Pvull исчезал и образовывался один фрагмент размером 392 п.о. Амплификаты и продукты рестрикции разделяли в 2,5 % агарозном геле, содержащем 10 мкг/мл бромистого этидия. Горизонтальный электрофорез (0,13А; 200V) проводили в течение 35 мин. Визуализацию ДНК после электрофореза осуществляли с помощью трансиллюминатора ("Биоком", Россия).

Статистический анализ проводили с использованием программы SPSS-17. При этом достоверность различий определяли по χ^2 -критерию. Значение $P < 0,05$ считали достоверными.

Результаты и их обсуждение

Определение экспрессии EsRα в морфологических образцах и генотипирование пациентов позволило установить частоту, с которой встречаются различные варианты этого гена, а также сравнить эти показатели между собой.

Среди обследованных новообразований молочной железы большинство – 48,5 % – составили образцы с фиброэпителиальным типом пролиферации, довольно часто встречался эпителиальный тип пролиферативных изменений (дольковая – 18,6 %, протоковая – 21,7 %), миоэпителиальный тип присутствовал в 11,2 % случаев.

В табл. 1 приведены результаты анализа частот генотипов по полиморфизму PvuII в зависимости от типа пролиферативных изменений в ткани молочной железы. Показатель P, расчитанный по χ^2-критерию Пирсона, равен 0,167, что свидетельствует об отсутствии достоверной разницы в распределении аллельных вариантов гена EsRα по полиморфизму PvuII у пациентов с разным типом пролиферации. Таким образом, связи между полиморфизмом PvuII и типом пролиферации в исследуемых новообразованиях не найдено.

Распределение новообразований по уровню экспрессии EsRα и типу пролиферативных изменений приведено в табл. 2. Как следует из полученных данных, распределение новообразований ДДМЖ с различным рецепторным статусом достоверно не отличается при различных типах пролиферации ($P = 0,525$). Таким образом, тип пролиферации в ткани молочной железы не зависит от рецепторного статуса новообразования.

В табл. 3 представлены результаты анализа частот отдельных генотипов по полиморфизму PvuII в зависимости от уровня экспрессии EsRα. Все образцы с минимальным уровнем экспрессии соответствовали генотипу T/T, а с сильнопозитивним – C/C. Соотношение гомозигот по основному аллелю (T/T), гетерозигот (T/C) и гомозигот по минорному аллелю (C/C) в образцах со слабонегативним уровнем экспрессии составило 21,8 %, 78,2 % и 0 %, с умереннопозитивным – 0 %, 34,5 %, 65,5 %. Показатель P, расчитанный по χ^2 критерию Пирсона, был меньше 0,0001, что свидетельствует о достоверной разнице в распределении аллельных вариантов гена EsRα по полиморфизму PvuII у пациентов с различным уровнем экспрессии рецептора. Таким образом, существует связь между полиморфизмом PvuII и уровнем экспрессии EsRα: генотип T/T характеризуется низким уровнем экспрессии, а генотип C/C – высоким.

На рисунке изображены результаты анализа частот отдельных генотипов по полиморфизму PvuII в зависимости от рецепторного статуса новообразований.

Можно видеть, что в образцах $EsR\alpha^-$ новообразований соотношение гомозигот по основному аллелю (T/T), гетерозигот (T/C) и гомозигот по минорному аллелю (C/C) составило 5,4 %, 58,1 % и 36,5 %, при $EsR\alpha^+$ реакции – соответствующие показатели были равны 53,3 %, 46,7 % и 0 %. Показатель P, определенный по χ^2-критерию Пирсона, был меньше 0,0001, что свидетельствует о достоверной разнице в распределении аллельных вариантов гена EsRα по полиморфизму PvuII у пациентов с различным рецепторным статусом. Таким образом, существует связь между полиморфизмом PvuII и рецепторным статусом новообразования: генотип T/T характерен для $EsR\alpha^-$новообразований молочной железы, а генотип C/C – для $EsR\alpha^+$.

Информация о содержании EsRα в ткани молочной железы противоречива. Так, Ильчева Т.Н. и соавт. в своей работе показали, что в неизмененной ткани молочной железы и при доброкачественных заболеваниях рецепторы стероидных гормонов определяются значительно реже и в меньшем количестве, чем в тканях злокачественной трансформации [4]. К подобным выводам пришли и Diag S. G. et al. [5]. Однако Шашова Е. Е. и соавт. в своих исследованиях доказали, что в здоровой ткани рецепторный статус положительный в 58 % случаев, а экспрессия EsRα в ней достоверно выше, чем в опухолях молочных желез [6]. Результаты наших исследований совпадают с такими выводами. Так, среди проанализированных морфологических образцов ДДМЖ 55,2 % имели положительный рецепторный статус, а 44,8 % – отрицательный. Уровень экспрессии EsRα не зависел от типа пролиферативных изменений ДДМЖ.

В результате проведенных исследований Holst F. et al. пришли к выводу, о том, что усиление экспрессии EsRα при ДДМЖ может быть общим механизмом в патогенезе пролиферативных заболеваний и ранним признаком развития РМЖ [7]. Различная степень экспрессии EsRα на поверхности клетки обусловлена многими причинами и в определенной степени зависит от структуры гена, который кодирует этот белок. Информация о функциональном влиянии отдельных полиморфизмов остается немногочисленной и в основном касается исследований по РМЖ [8], поэтому ее использование в целях прогноза доброкачественной гормонозависимой патологии в настоящее время ограничено.

Изучение связи полиморфных локусов гена EsRα с клиническими и лабораторными показателями у больных с предопухолевой патологией молочной железы предоставляет полезную информацию о ее патогенезе. В выполненной нами работе впервые проанализирована ассоциация полиморфизма PvuII гена EsRα с уровнем экспрессии EsRα у пациентов с пролиферативными формами ДДМЖ и выявлена связь исследуемого генетического фактора с ростом экспрессии EsRα у пациентов группы риска РМЖ. На существование связи между определенными полиморфизмами EsRα и патологией молочной железы указывают патентные исследования отдельных авторов [9]. Lisa Gallicchio et al. доказали, что некоторые полиморфизмы гена EsRα могут играть роль в склонности к ДДМЖ и ее прогрессировании среди женщин кавказской национальности [10].

Нами показано, что существует связь между полиморфизмом PvuII гена EsRα с различным уровнем экспрессии EsRα в ткани молочной железы при ее доброкачественной дисплазии. Генотип T/T характеризуется низким уровнем экспрессии, а генотип C/C – высоким. Связи между типом пролиферативных изменений и исследуемым полиморфизмом, а также рецепторным статусом опухоли не найдено.

Таким образом, генетические маркеры могут использоваться как один из критериев в идентификации женщин, страдающих пролиферативной дисплазией и находящихся в группе риска по РМЖ.

Примечания:

1. Peter I. 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. Vol.18. №11. P. 1388–1395.

2. Ban S. 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. Vol. 23. №6. P. 1466–1471.

3. Allred D.C. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis / D. C. Allred, J. M. Harvey, M. Berardo, et al. // Modern Pathology. 1998. Vol. 11. № 2. P. 155–168.

4. Ильичева Т.Н. Содержание рецепторов прогестерона, глюкокортикоидов и глицирризиновой кислоты в опухолевой и нормальной ткани молочной железы человека / Т.Н. Ильичева, Т.Р. Проняева, А.А. Сметанников и др. // Вопросы онкологии. 1998. Т. 44, № 4. С. 390–394.

5. Diag S.G. Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas / S. G. Diag, G. M. Clark, C. K. Osborn, et al. // J Clin Oncol. 1999. Vol. 17. №5. P. 1442–1448.

6. Шашова Е.Е. Сравнительное изучение содержания рецепторов эстрогенов и прогестерона в неизмененной, опухолевой и метастатической тканях при раке молочной железы / Е.Е. Шашова, И.В. Кондакова, Е.М. Слонимская, и др. // Сибирский онкологический журнал. 2008. №4 (28). С. 42–45.

7. Holst F. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer / F. Holst, P. R. Stahl, C. Ruiz, et al. // Nat. Genet. 2007. Vol. 39. №5. P. 655-660.

8. Gonza´lez-Mancha R. Analysis of the ERalpha germline PvuII marker in breast cancer risk / R. Gonza´lez-Mancha, C. J. Gala´n, J. Crespo, et al. // Med. Sci. Monit. 2008. Vol. 14. №3. P. 136–143.

9. Patent number: JP2012034633A1. Publication date: February 23, 2012. Inventors: Mizukami, Yoichi., Method for determining estrogen-related disease // Applicant: Yamaguchi univ; Priority Number: EP20070121810.

10. Gallicchio L. 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.

Таблица 1

Частота аллельных вариантов гена EsRα по полиморфизму PvuII у пациентов с различным типом пролиферации в новообразованиях при ДДМЖ

Генотип	Тип пролиферации, n (%)			
	Эпителиальная дольковая	Эпителиальная протоковая	Миоэпителиальная	Фиброэпителиальная
T/T	7 (28,0)	10 (34,5)	2 (13,3)	17 (26,2)
T/C	10 (40,0)	12 (41,4)	12 (80,0)	37 (56,9)
C/C	8 (32,0)	7 (24,1)	1 (6,7)	11 (16,9)

Всего	25 (100)	29 (100)	15 (100)	65 (100)
$\chi^2 = 9{,}123$; P = 0,167				
Примечание: n – количество морфологических образцов				

Таблица 2

Связь рецепторного статуса по EsRα с типом пролиферативных изменений в новообразованиях у пациентов с ДДМЖ

Рецепторный статус	Тип пролиферации, n (%)			
	Эпителиальная дольковая	Эпителиальная протоковая	Миоэпителиальная	Фиброэпителиальная
EsRα -	10 (40,0)	11 (37,9)	9 (60,0)	30 (46,2)
EsRα+	15 (60,0)	18 (62,1)	6 (40,0)	35 (53,8)
Всего	25 (100)	29 (100)	15 (100)	65 (100)
$\chi^2 = 2{,}236$; P = 0,525				
Примечания: n – количество морфологических образцов; $EsR\alpha^-$ – эстрогеннегативные новообразования; $EsR\alpha^+$ – эстрогенпозитивные новообразования				

Таблица 3

Связь аллельных вариантов гена EsRα по полиморфизму PvuII у пациентов с разной степенью экспрессии EsRα в новообразованиях при ДДМЖ

Генотип	Экспрессия EsRα, n (%)			
	Негативная	Слабопозитивная	Умереннопозитивная	Сильнопозитивная
T/T	19 (100)	17 (21,8)	0 (0)	0 (0)
T/C	0 (0)	61 (78,2)	10 (34,5)	0 (0)
C/C	(0)	0 (0)	19 (65,5)	8 (100)
Всего	19 (100)	78 (100)	29 (100)	8 (100)
$\chi^2 = 148{,}541$; P < 0,0001				
Примечание: n – количество морфологических образцов				

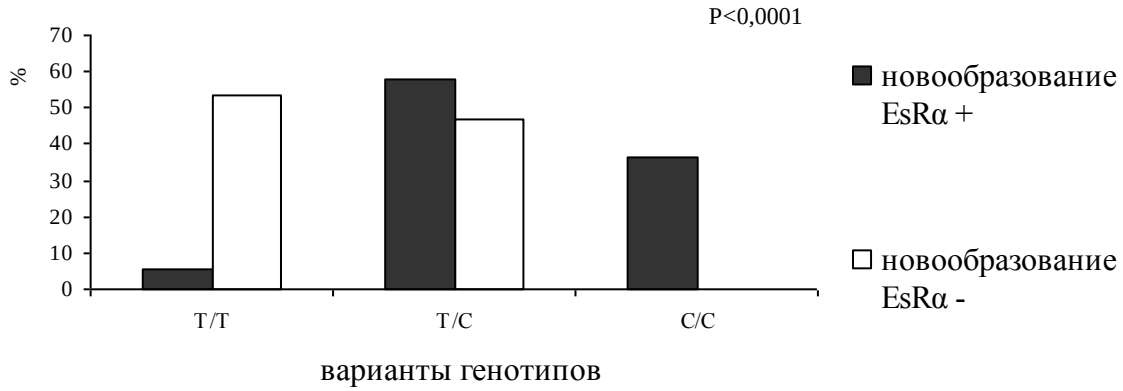

Рис. Распределение аллельных вариантов гена EsRα по полиморфизму PvuII в зависимости от рецепторного статуса новообразований у пациентов с пролиферативной формой ДДМЖ (рецепторпозитивные новообразования (EsRα $^{+}$) – черные столбики, рецепторнегативные (EsRα^{-}) – белые столбики)

УДК 618.19-007.61-06:575.113.1

Связь полиморфизма PvuII гена рецептора эстрадиола альфа (EsRα) с экспрессией ESRA при доброкачественной дисплазии молочной железы

[1] Иван Михайлович Лукавенко
[2] Владимир Викторович Андрющенко
[3] Виктория Юрьевна Гарбузова
[4] Александр Валериевич Языков

[1-4] Сумский государственный университет, Украина
[1] аспирант
[2] кандидат медицинских наук, доцент
[3] доктор биологических наук, доцент
[4] аспирант
E-mail: doctorlv@ukr.net

Аннотация. Проанализированы результаты хирургического лечения пролиферативной формы доброкачественной дисплазии молочных желез (ДДМЖ) у 84 пациентов с факторами риска рака молочной железы. Определены генетические особенности гена EsRα по PvuII полиморфизму. Отдельно изучены 134 образца гистологического материала удаленных очагов ДДМЖ и установлен уровень экспрессии EsRα. Показано, что существует связь между PvuII полиморфизмом гена EsRα с разным уровнем экспрессии EsRα в ткани молочной железы при ДДМЖ. Генотип T/T характеризуется низким уровнем экспрессии, а генотип C/C – высоким. Связи между типом пролиферативных изменений у пациентов с разными полиморфными вариантами гена EsRα по изученному полиморфизму и рецепторным статусом опухоли не найдено.

Ключевые слова: диагностика; доброкачественная дисплазия молочной железы; генетический полиморфизм; генетическая медицина.