

О.О. Гарашенко

Рівень плазмових міРНК у хворих на рак молочної залози та їх кореляція з клінічною картиною пацієнтів як показник для індивідуалізованого лікування

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

Одержано 19.01.2024

Прийнято до друку 01.02.2024

DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.53-1.31750

Вступ. Рак молочної залози (РМЗ) є найпоширенішим онкологічним захворюванням серед жінок. Рівень експресії малих інтерферуючих РНК (міРНК) та зміни їх кореляції в динаміці лікування розглядається як потенційний прогностичний маркер патології. **Мета.** Вивчити рівні міРНК у плазмі крові хворих на РМЗ, кореляцію між міРНК, зв'язок із віком, стадією та молекулярним типом захворювання. **Матеріали та методи.** Досліджено рівні 10 міРНК (міРНК-25, -27, -30, -139, -155, -200, -205, -335, -497, -663) у плазмі крові 70 пацієнтів з РМЗ та 18 здорових осіб, оцінено фактор віку (<45 і >45 років), молекулярний тип раку, виявлено кореляційні зв'язки між парами міРНК. **Результати.** Рівень міРНК-25, -205, -335, -497 і -663 був достовірно вищим у хворих на РМЗ, встановлено залежність зниженого рівня міРНК-27 і міРНК-335 у пацієнтів <45 років і підвищеного рівня міРНК-27 і міРНК-205 у хворих >45 років, а достовірно підвищений рівень міРНК-205 у обох вікових категоріях. Тенденцію залежності підвищеного рівня міРНК-200 і міРНК-497 виявлено у осіб з РМЗ III-IV стадій, а міРНК-335 з люмінальним А типом РМЗ. Встановлено множинні позитивні та негативні кореляції в парах міРНК з міРНК-25 у хворих на РМЗ (7 проти 3 у здорових осіб). Після неoad'ювантної хіміотерапії встановлено зниження рівнів міРНК-25 і міРНК-335. **Висновки.** У результатах зафіксовано, що міРНК-25, -27, -335, -497 і -663 заслуговують на увагу як прогностичний показник РМЗ, а міРНК-25 є найбільш перспективною з 10 щодо чутливості до поліхіміотерапії (ПХТ). Проведене дослідження відкриває перспективи використання даних аналізу експресії зазначених міРНК з метою оцінки ефективності лікування та прогнозу клінічного перебігу патології у хворих на РМЗ.

Ключові слова: рак молочної залози; міРНК; кореляція; плазма крові; вік; стадія; хіміотерапія; результати лікування.

ВСТУП

РМЗ є найпоширенішим онкозахворюванням серед жінок, яке стало причиною 6–20% усіх смертей жінок через онкологічні захворювання [1]. Незважаючи на те що останнім часом кількість діагнозів РМЗ зростає, досягнуто певної стабілізації показників смертності, а прогноз захворювання значно покращився завдяки впровадженню сучасних методів лікування [2].

Великий інтерес становить вивчення ролі міРНК в онкогенезі та їх оцінка як потенційного прогностичного маркера перебігу захворювання [3]. Це некодуючі короткі послідовності РНК, які мають складну структуру і залучені до регуляції експресії генів [4]. міРНК можуть впливати на процеси інвазії та метастазування ракових клітин різними способами. Наприклад, вони можуть регулювати виділення факторів, таких як TGF- β , який впливає на зростання та проліферацію пухлинних клітин на ранніх стадіях і сприяє епітеліально-мезенхімальній трансформації (EMT). Також вони можуть взаємодіяти зі шляхом Wnt/ β -catenin, що пригнічує експресію білка E-кадгерин, втрата якого пов'язана з онкогенезом [5]. Деякі мікроРНК, які сприяють цим процесам, включають міРНК-21 і міРНК-191 (через TGF- β та EGF), міРНК-10b (за підтримки TGF- β 1, який підвищує експресію E-кадгерину), міРНК-155 (спрямовує RhoA) [5].

Деякі міРНК ідентифіковано як достовірні біомаркери РМЗ, зокрема міРНК-30a, -27a, -193b та -361-5p [4]. Велика кількість міРНК, такі як міРНК-17, -20b, -21, -23, -24, -27, -199, -200, -342, -484, -638, пов'язані з хіміорезистентністю [1, 6]. Розглядається потенційний зв'язок між рівнем експресії міРНК та віком хворих з урахуванням молекулярного типу РМЗ, інвазивності пухлин та здатності до метастазування [4, 7]. Тобто міРНК відкривають новий напрям досліджень, який може доповнити використання традиційних біомаркерів РМЗ, підвищуючи точність і специфічність діагностики, особливо їх поєднані панелі [5]. Проте, щоб з'ясувати зв'язок між змінами експресії міРНК при РМЗ, необхідно провести мультиточкові і багаторазові дослідження.

Мета. Вивчити рівні міРНК у плазмі крові хворих на РМЗ, кореляцію між міРНК, залежність від віку, стадії та молекулярного типу захворювання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження базується на результатах оцінки рівнів 10 міРНК (міРНК-25, -27, -30, -139, -155, -200, -205, -335, -497, -663) у хворих на РМЗ та виявленні кореляційних зв'язків між міРНК, їх залежності від клінічної характеристики захворювання.

Досліджено серії з 10 міРНК у 18 здорових осіб та 70 пацієнтів з РМЗ. Середній вік на час встановлення діагнозу — 48 років. Хворі пройшли від 4 до 6 курсів ПХТ (40 неoad'ювантної та 30 ад'ювантної ПХТ). Здійснено розподіл жінок за віком до 45 років (пременопаузальний вік) та 45 і старше (постменопаузальний вік).

Молекулярний тип РМЗ встановлювали за результатами імуногістохімічного дослідження. У здорових та хворих осіб одержували зразки крові й одержували РНК для дослідження. Екстракцію РНК проводили згідно з інструкцією виробника Zymo Research (США) Quick-RNA Miniprep Kit (кат. № R1055). Екзогенний внутрішній контроль A035 «Набір реагентів для визначення кількісного вмісту РНК», ТОВ «Укрентех» (Україна); ендогенний внутрішній контроль — фрагменти гена *TBP* та *YWHAZ*, що охоплюють діапазон від найменшого до найдовшого фрагментів.

Однокроковий мікс з ревертазою та полімеразою — M08 «Однокроковий мікс 3Т з інтеркалюючим барвником SYBR Green», ТОВ «Укрентех» (Україна). Ампліфікація згідно з інструкцією виробника. Для аналізу використовувалася ампліфікатор Bio-Rad CFX-96 (Singapore). Програма аналізу та кількісної оцінки Bio-Rad CFX Maestro. Калібратори кількісної оцінки внутрішніх контролів:

1 — TCCTTTGCTTGCATCCACAGACTATTTCCTCATC
СТАТТТАCTGCAGCAAATCTCTCC — 60 п.о.

2 — TGCACAGGAGCCAAAGAGTGAAGAACAGTCCAGAC
TGGCAGCAAGAAAATATGCTAGAGTTGTACAGAAGTTGG
GTTTTCCAGCTAAGTTCTTGGACTTCAAGATTCAGAATAT
GGTGGGGAGCTGTGATGTG — 132 п.о.

Методика оцінки кількості:

1. Для оцінки рівня екстракції використовували екзогенний (доданий у зразок перед екстракцією у відомій концентрації) синтетичний внутрішній контроль A035 шляхом зіставлення внесеної концентрації та концентрації після проходження екстракції

в кількісних показниках, розрахованих за допомогою програмного забезпечення Bio-Rad CFX Maestro. У підсумку визначали коефіцієнт, він становив від 0,7 до 0,9, а зразки, де коефіцієнт екстракції був нижчим за 0,7, підлягали повторній екстракції.

2. Для кількісної оцінки в якості позитивних контролів використовували синтетичні калібратори для кожної групи реакцій окремо в дублях та 2 розведеннях з різницею у 2 порядки 100 і 10 000 копій відповідно і за допомогою програмного забезпечення Bio-Rad CFX Maestro отримана копійність на реакцію (дубль, зразки ставилися в дублях).

3. Для визначення копійності на мілілітр: копії/мл = кількість міРНК у реакції (дані приладу в копіях/реакціях)/коефіцієнт екстракції • кількість реакцій з одного елюату • кількість екстракцій з одного мл — фрагмента гена.

Статистичні дослідження проводили за допомогою програмного пакета StatPlus (7.0) (AnalystSoft Inc.). Для перевірки гіпотези нормального розподілу даних використано критерій Шапіро — Уїлка, значущості міжгрупових відмінностей застосовано непараметричний критерій Манна — Уїтні (Mann — Whitney U-test), непараметричний критерій Вілкоксона, однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA, Bonferroni post hoc test, апостеріальний критерій Фішера LSD).

Дані середнього рівня міРНК представлені як середнє ± SEM. Низький та високий рівень експресії міРНК трактували на основі аналізу квартильного розподілу даних у варіативних рядах. Визначали 4 квартилі у групі здорових осіб, де Q1—Q2 оцінювали як низький, а Q3—Q4 — як високий рівень експресії. Межі квартилів обрали як контрольні значення для групи хворих на РМЗ. Кореляції між парними наборами міРНК у пацієнтів визначали за допомогою лінійної кореляції Пірсона (r) та рангового коефіцієнта кореляції Спірмена (Rho). Відмінності вважалися статистично значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Рівень міРНК залежно від віку

Проведено аналіз плазмових рівнів міРНК у здорових жінок та хворих на РМЗ (табл. 1). Ми не виявили статистично значущої різниці рівнів кожної з 10 міРНК між групами здорових та хворих на РМЗ жінок. Разом з тим, врахування фактора віку встановило деякі залежності та різницю між групами.

У здорових жінок виявлено наступний зв'язок: плазмовий рівень у 9 з 10 міРНК мав тенденцію до зниження у жінок у період постменопаузи, а рівень міРНК-205 достовірно був вищим у жінок у період пременопаузи, та тільки міРНК-25 зростає з віком.

У жінок з РМЗ виявлено дещо інші тенденції: достовірно зростає рівень міРНК-27, -205, -335 і -663 під час постменопаузи, тенденцію до росту відмічено щодо міРНК-139, -155, -200 і -663. При цьому рівень міРНК-335 у хворих у період пременопаузи був істотно вищим порівняно із таким у здорових жінок, а міРНК-663 — навпаки під час постменопаузи.

Ми зробили спробу виявити залежність між рівнем міРНК, тактикою лікування та фактором віку (табл. 2). Так, зафіксована в загальній вибірці хворих зміна рівня міРНК-27 між здоровими та хворими жінками була підтверджена, враховуючи лікування ад'ювантною ПХТ (АПХТ) і неoad'ювантною (НПХТ), хоча у останньої у жінок у період пременопаузи; збільшення кількості міРНК-205 виявлено у жінок у період постменопаузи з НПХТ; кількість міРНК-205 була більшою під час постменопаузи у пацієнток з НПХТ; міРНК-497 була більшою у хворих у період пременопаузи щодо контрольної групи. Фактор віку гіпотетично мав значення щодо зміни експресії міРНК-27 та міРНК-497 рівною мірою як для групи, яка проходила АПХТ, так і після НПХТ. При цьому експресія цих 2 міРНК мала протилежну залежність, міРНК-27 достовірно була меншою у жінок під час пременопаузи і зростала з віком, а міРНК-497 була достовірно більшою незалежно від віку.

Рівень міРНК залежно від стадії РМЗ

Проведено аналіз плазмового рівня 10 міРНК з урахуванням стадії РМЗ (Grade) (рис. 1). Зважаючи на інформацію, представлену в графіках, можна відмітити деякі залежності. Наприклад, порівняно зі здоровими жінками у пацієнтів з РМЗ є тенденція до зростання міРНК-497 при IIIA—IV стадіях і міРНК-200 при IV стадії, або зменшення міРНК-27 при IВ—IV стадіях. Але виявлені тенденції для деяких стадій патології не мали достовірної різниці щодо контролю, тому аналіз тільки на основі фактора стадії не був чутливим щодо поставленої задачі в роботі.

Кореляція між міРНК у здорових та хворих на РМЗ

З огляду на виявлену різницю плазмового рівня міРНК-25, -27 та -497 між здоровими особами та жінками із захворюванням і деяку залежність від віку хворих проведено аналіз кореляції між досліджуваними 10 міРНК (табл. 3, 4).

Таблиця 1. Середній рівень міРНК у плазмі крові здорових осіб та хворих на РМЗ з урахуванням віку (Mean(SEM) • 10³)

Тип міРНК	Здорові (n=18)			Хворі (n=70)		
	пременопауза (n=12)	постменопауза (n=6)	усього (n=18)	пременопауза (n=25)	постменопауза (n=45)	усього (n=70)
міРНК-25	1,2 (0,3)	6,7 (6,7)*	3,0 (2,2)	11,0 (4,3)	35,2 (22,9)	26,2 (14,4)
міРНК-27	2310,0 (2306,5)	1,4 (0,5)	1540,0 (1537,7)	105,1 (72,3)	321,5 (298,3)*	237,5 (187,7)
міРНК-30	100,8 (97,8)	2,8 (2,3)	68,1 (65,2)	233,0 (136,5)	41,4 (17,0)	113,3 (52,8)
міРНК-139	474,2 (465,7)	4,2 (1,2)	317,6 (310,5)	30,9 (11,6)	93,1 (33,3)	69,7 (21,5)
міРНК-155	72,4 (37,9)	3,2 (2,2)	49,3 (26,1)	33,3 (22,0)	62,2 (35,8)	51,3 (23,8)
міРНК-200	88,5 (50,7)	55,4 (31,0)	77,5 (34,9)	172,6 (56,9)	311,9 (169,7)	259,6 (108,0)
міРНК-205	617,4 (487,9)	18,4 (18,2)*	417,7 (327,7)	325,1 (172,3)	273,1 (141,3)**	292,6 (108,7)
міРНК-335	895,3 (823,3)	17,9 (16,6)	602,8 (550,0)	10899,0(10814,0)**	233,0 (136,5)*	6937,3 (6757,6)
міРНК-497	3,0 (1,2)	7,8 (3,2)	4,6 (1,4)	112,0 (52,1)	44,8 (24,3)	70,0 (24,8)
міРНК-663	736,3 (491,7)	68,4 (43,9)	513,7 (332,1)	136,8 (54,6)	1617,6 (1011,5)**	1062,3 (635,6)

* $p < 0,05$ щодо категорії жінок пременопаузального віку за критерієм Манна — Уїтні; ** $p < 0,05$ щодо здорових жінок за критерієм Манна — Уїтні.

Таблиця 2. Середній рівень міРНК у плазмі крові хворих на РМЗ з урахуванням віку та тактики лікування (Mean(SEM) • 10³)

Тип міРНК	Здорові (n=18)		Схема лікування (n=70)			
	пременопауза (n=12)	постменопауза (n=6)	АПХТ (n=23)		НПХТ (n=47)	
			пременопауза (n=9)	постменопауза (n=14)	пременопауза (n=16)	постменопауза (n=31)
міРНК-25	1,2 (0,3)	6,7 (6,7)*	1,6 (1,4)	3,0 (3,5)	17,4 (28,1)**	49,8 (184,5)
міРНК-27	2310,0 (2306,5)	1,4 (0,5)	196,4 (581,0)**	959,9 (3588,4)*	53,8 (145,7)**	33,2 (133,6)
міРНК-30	100,8 (97,8)	2,8 (2,3)	396,3 (1128,3)	12,6 (30,0)	167,0 (409,3)	54,4 (134,7)
міРНК-139	474,2 (465,7)	4,2 (1,2)	16,8 (43,1)	12,9 (20,8)	41,8 (70,8)	129,3 (262,8)
міРНК-155	72,4 (37,9)	3,2 (2,2)	1,0 (0,6)	50,6 (101,0)	36,7 (131,2)	67,4 (283,1)
міРНК-200	88,5 (50,7)	55,4 (31,0)	45,7 (75,1)	128,9 (288,5)	265,4 (355,0)	394,5 (1357,3)**
міРНК-205	617,4 (487,9)	18,4 (18,2)*	226,7 (679,7)	58,5 (100,1)†	386,6 (1062,7)	370,0 (1132,6)**
міРНК-335	895,3 (823,3)	17,9 (16,6)	577,1 (1136,3)	121,0 (377,3)	145,2 (369,5)**	15 766,4 (87 404,0)
міРНК-497	3,0 (1,2)	7,8 (3,2)	11,3 (19,2)	34,9 (116,0)*	176,7 (340,3)	49,2 (182,2)*
міРНК-663	736,3 (491,7)	68,4 (43,9)	174,8 (309,6)	107,9 (201,2)	132,1 (292,0)	2299,5 (8122,6)†

* $p < 0,05$ щодо категорії жінок пременопаузального віку за критерієм Манна — Уїтні; ** $p < 0,05$ щодо здорових жінок за критерієм Манна — Уїтні; † $p < 0,06$ щодо категорії жінок контрольної групи за критерієм Манна — Уїтні.

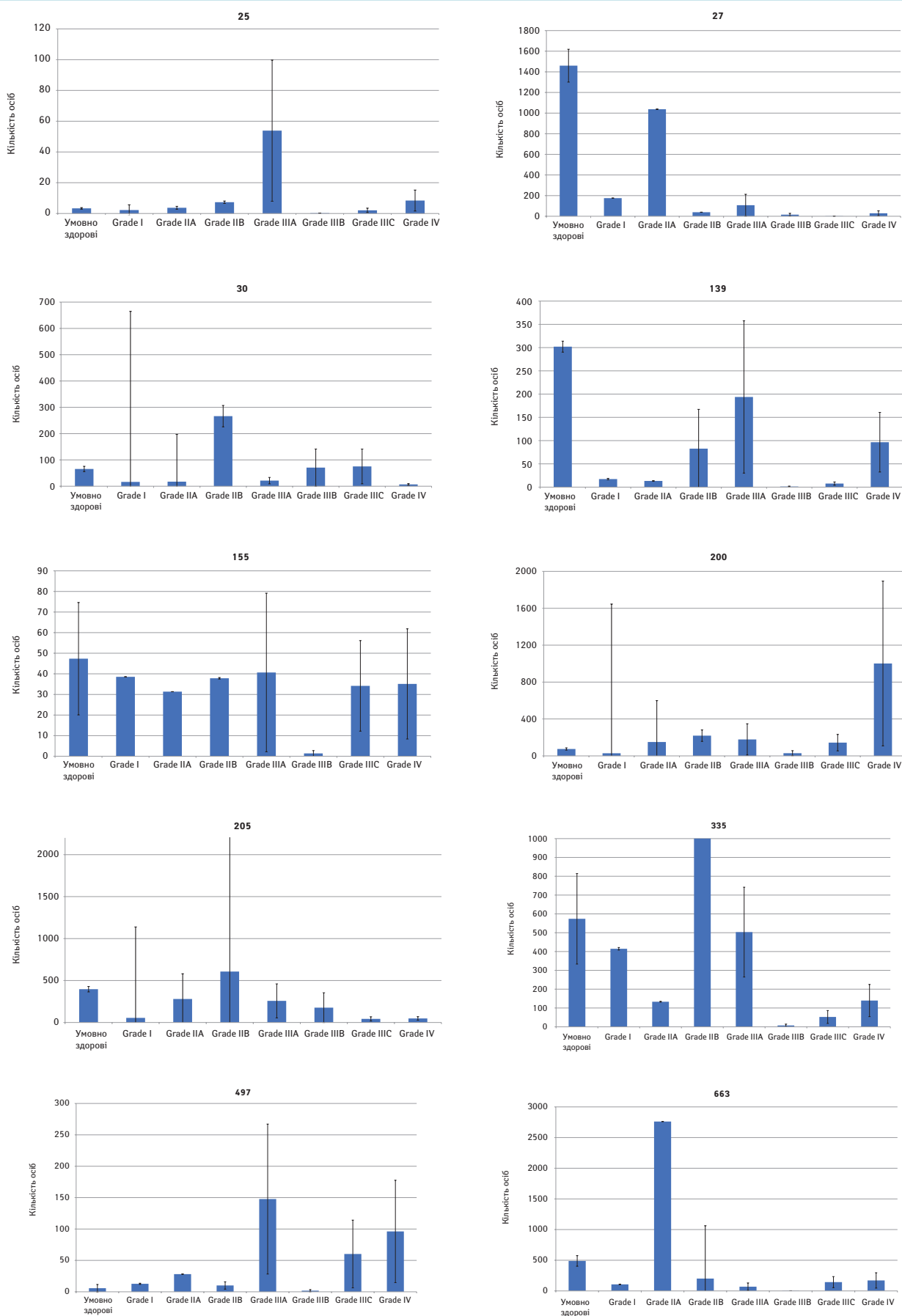


Рис. 1. Зміни рівнів мiРНК залежно від стадії PM3 (Mean±SEM • 10³)

Згідно з результатами визначення критерію Шапіро — Уїлка варіаційні ряди мiРНК у здорових та хворих осіб мали розподіл, відмінний від нормального. Для визначення коефіцієнта кореляції проведено аналіз 44 пар досліджуваних мiРНК у здорових та хворих пацієнтів. У 3,4% (24 з 700 даних) пар порівнюваних мiРНК хворих РМЗ мали викиди, де один з показників у парі був рівний 0 [8]. За цими умовами застосовано критерій рангової кореляції Спірмена, який частіше за інші використовується при роботі з не-параметричними вибірками, але коефіцієнт Пірсона додатково використано як частий спосіб вивчення лінійного взаємозв'язку 2 змінних.

У здорових жінок встановлено кореляції за критерієм Спірмена (Rho) між деякими показниками, і тому ми їх виділили у кластери:

- Кластер I: позитивна кореляція між мiРНК-25 та мiРНК-205, мiРНК-25 та мiРНК-663, мiРНК-205 та мiРНК-663 (рис. 2);
- Кластер II: негативна кореляція між мiРНК-335 і мiРНК-139, мiРНК-335 і мiРНК-200, мiРНК-200 і мiРНК-205, мiРНК-200 і мiРНК-30.

За критерієм Пірсона (r), у здорових жінок виявлено тільки кореляції позитивного напрямку: мiРНК-25 і мiРНК-497, зв'язок між мiРНК-205 і мiРНК-335, мiРНК-497 і мiРНК-335, мiРНК-663 і мiРНК-335, мiРНК-139 і мiРНК-200 був достовірним, тоді як Rho-коефіцієнт не був статистично значущим, а r-коефіцієнт мiРНК-205 і мiРНК-663 був достовірним, як і Rho-коефіцієнт.

Тобто у здорових осіб заслуговують на увагу мiРНК-25, -205 і -663, так як обидва методи виявлення кореляційних зв'язків встановили позитивні залежності з іншими парами мiРНК або між собою.

У хворих на РМЗ кластер I був подібним і кореляційні зв'язки за критерієм Спірмена між зазначеними мiРНК були позитивні-

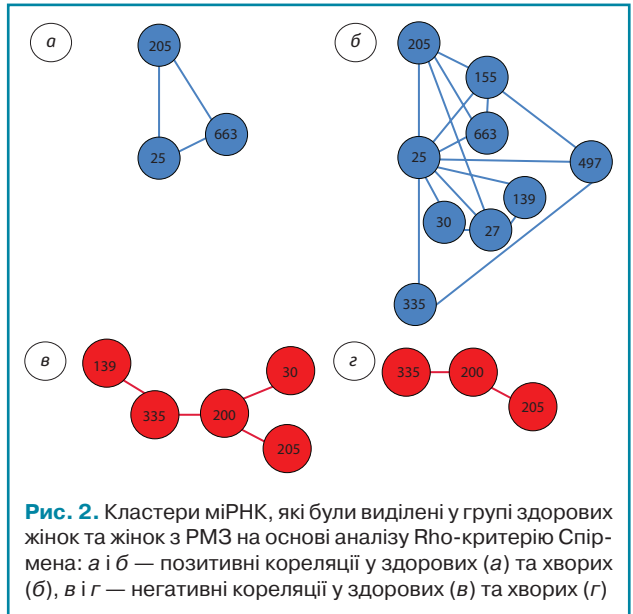


Рис. 2. Кластери мiРНК, які були виділені у групі здорових жінок та жінок з РМЗ на основі аналізу Rho-критерію Спірмена: а і б — позитивні кореляції у здорових (а) та хворих (б), в і г — негативні кореляції у здорових (в) та хворих (г)

ми. При цьому кластер II змінився: відсутня залежність у парах мiРНК-335 та мiРНК-139, -335 та -200, але розвинулися інші залежності.

У хворих з РМЗ встановлено появу множинних позитивних кореляцій за критерієм Спірмена між багатьма мiРНК:

- 1) додатково з кластером I мали позитивну кореляцію ще 6 мiРНК;

Таблиця 3. Кореляція між мiРНК у групі здорових жінок (n=18)

n=18	Критерій	мiРНК-25	мiРНК-27	мiРНК-30	мiРНК-139	мiРНК-155	мiРНК-200	мiРНК-205	мiРНК-335	мiРНК-497	мiРНК-663
мiРНК-25	Rho	1,0									
	r	1,0									
мiРНК-27	Rho	0,09	1,0								
	r	-0,03	1,0								
мiРНК-30	Rho	0,43	0,35	1,0							
	r	0,00	-0,06	1,0							
мiРНК-139	Rho	-0,25	0,24	0,18	1,0						
	r	0,01	-0,06	-0,06	1,0						
мiРНК-155	Rho	0,02	-0,37	-0,10	-0,02	1,0					
	r	-0,09	-0,11	-0,10	-0,11	1,0					
мiРНК-200	Rho	-0,38	-0,40	-0,53	0,40	0,18	1,0				
	r	-0,09	-0,13	-0,13	0,88	-0,01	1,0				
мiРНК-205	Rho	0,69	0,27	0,28	-0,41	0,28	-0,52	1,0			
	r	-0,06	-0,01	0,05	-0,08	-0,08	-0,15	1,0			
мiРНК-335	Rho	0,35	0,20	0,28	-0,70	-0,33	-0,48	0,44	1,0		
	r	-0,07	0,00	-0,06	-0,07	-0,12	-0,14	0,99	1,0		
мiРНК-497	Rho	-0,06	0,33	0,20	-0,19	-0,14	-0,40	-0,01	0,40	1,0	
	r	0,59	-0,01	-0,17	-0,18	-0,20	-0,33	0,45	0,47	1,0	
мiРНК-663	Rho	0,51	0,33	0,30	0,07	-0,08	-0,13	0,61	0,29	0,05	1,0
	r	-0,05	0,13	-0,08	0,10	-0,09	0,00	0,96	0,97	0,44	1,0

Таблиця 4. Кореляція між мiРНК у групі жінок з РМЗ (n=70)

n=70	Критерій	мiРНК-25	мiРНК-27	мiРНК-30	мiРНК-139	мiРНК-155	мiРНК-200	мiРНК-205	мiРНК-335	мiРНК-497	мiРНК-663
мiРНК-25	Rho	1,0									
	r	1,0									
мiРНК-27	Rho	0,32	1,0								
	r	-0,02	1,0								
мiРНК-30	Rho	0,31	0,40	1,0							
	r	0,09	-0,03	1,0							
мiРНК-139	Rho	0,07	0,31	0,16	1,0						
	r	0,31	0,00	-0,02	1,0						
мiРНК-155	Rho	0,30	0,08	0,24	0,20	1,0					
	r	0,05	-0,01	-0,03	0,03	1,0					
мiРНК-200	Rho	-0,19	0,13	-0,26	0,35	-0,01	1,0				
	r	-0,03	0,08	-0,06	-0,04	-0,04	1,0				
мiРНК-205	Rho	0,39	0,32	0,65	-0,03	0,60	-0,39	1,0			
	r	0,02	-0,03	0,36	0,10	-0,02	-0,09	1,0			
мiРНК-335	Rho	0,36	0,20	0,19	0,16	0,10	-0,03	0,06	1,0		
	r	-0,03	-0,02	-0,03	0,19	-0,03	0,07	-0,04	1,0		
мiРНК-497	Rho	0,49	0,22	0,20	0,31	0,24	-0,02	0,20	0,43	1,0	
	r	0,54	-0,04	0,01	0,24	-0,03	0,01	-0,04	-0,04	1,0	
мiРНК-663	Rho	0,34	0,21	0,45	0,17	0,39	-0,23	0,50	0,07	0,31	1,0
	r	-0,03	-0,03	-0,04	0,11	-0,04	-0,05	0,12	-0,02	-0,04	1,0

- 2) до мiPHK-205 доєдналися кореляції з мiPHK-27 і мiPHK-155;
- 3) з мiPHK-25 встановлено додаткову кореляцію з мiPHK-30, -139, -335, -155, -497, -27;
- 4) щодо мiPHK-30 виникли позитивні зв'язки з мiPHK-155, -205;
- 5) щодо мiPHK-497 виникли позитивні зв'язки з мiPHK-155;
- 6) виникли позитивні зв'язки між мiPHK-155 щодо мiPHK-497 та мiPHK-663;
- 7) натомість встановлено втрату негативної залежності між мiPHK-139 та мiPHK-335, -30 та -200.

При цьому г-коефіцієнт Пірсона виявився менш чутливим в аналізі зв'язків між парами мiPHK: мiPHK-497 мала зв'язки з мiPHK-139, -25, а мiPHK-205 — з мiPHK-30; при цьому встановлено позитивний зв'язок у парі мiPHK-139 та мiPHK-25, тоді як зв'язок за Rho-коефіцієнтом не був статистично значущим.

Тобто у хворих з РМЗ обидва статистичні методи повторили залежність пари мiPHK-30 та мiPHK-205, мiPHK-497 та мiPHK-25 і мiPHK-497 та мiPHK-139, а додаткові залежності зафіксовано методом рангової кореляції Спірмена.

На основі цих залежностей можна розглядати гіпотезу виникнення онкопроцесу як наслідку втрати негативного зв'язку між мiPHK-335, -139 і -200, а натомість появу множинної позитивної залежності експресії між іншими мiPHK, як, наприклад, це було виявлено для мiPHK-25, -27 і -497. Зміни плазмового рівня цих 3 мiPHK на вищій наведено в табл. 1 і 2. Тобто мiPHK-25, -27, -497 та, можливо, мiPHK-205 і -139 (як суміжна з ними в кореляційних зв'язках) потенційно можуть бути залучені в розвиток РМЗ.

Залежність рівня мiPHK від молекулярного типу РМЗ

3 метою виявлення ймовірної залежності зміни експресії мiPHK у хворих із встановленим молекулярним типом раку проведено аналіз рівнів у 4 категоріях пацієнтів. Здійснено порівняння показників здорових осіб і з РМЗ між молекулярними типами РМЗ. Результати середніх значень показників представлені в табл. 5.

Ми не виявили достовірної різниці між підгрупами за жодною з 10 мiPHK. Відмічено тенденцію до підвищення рівня мiPHK-335 у хворих з люмінальним А типом РМЗ (щодо здорових осіб — за критерієм Манна — Утні, $p=0,29$, апостеріальний критерій Фішера LSD, $p=0,02$).

На рис. 3 наведено графіки розподілу хворих (емпірична частота) залежно від рівня досліджуваних показників.

Зважаючи на те що зміни рівня мiPHK у хворих на РМЗ базувалися на аналізі характеристики рівнів 10 мiPHK у здорових осіб, то медіану і середній квартильний розподіл обрано за емпіричну точку відліку. За таким алгоритмом розраховано частоти розподілу здорових осіб і хворих на РМЗ і виявлено деякі закономірності. Так, встановлено більшу кількість хворих, у яких рівень мiPHK-25 було оцінено як підвищений порівняно до контролю і зменшення кількості осіб з низьким рівнем мiPHK-25. Частота розподілу хворих на РМЗ характеризувалася зміщенням показника мiPHK-27 у бік середніх значень, тобто тенденцію до зменшення високоекспресуючих випадків, що співпадає з концепцією зменшення кількості мiPHK-27 у хворих під час премопаузи. Показник рівня мiPHK-497 виявився неоднозначним, оскільки мав тенденцію до збільшення частки хворих із середнім її рівнем, хоча достовірно підвищився загальний рівень і мав тенденцію до росту у пацієнтів з IIIA–IV стадіями. Цікавими виявили результати

аналізу мiPHK-663: частота виявлення хворих з низьким рівнем наближалася до 0, а якщо за критерієм розподілу брати медіану варіаційного ряду, то частота виявлення змищується в бік домінування випадків з високою експресією. Узагальнюючі результати щодо аналізу цих 4 мiPHK, висновки наведено в табл. 6.

Результати оцінки рівнів мiPHK після проведення НПХТ

Зроблено спробу оцінити зміни мiPHK після курсів НПХТ як показник ефективності або чутливості до хіміотерапії. Повторні дослідження рівнів мiPHK було досліджено у 18 з 47 пацієнтів. У табл. 7 наведено результати 1-го та 2-го вимірювання, статистичну різницю розраховано на основі непараметричного критерію Вілкоксона. Виявлено статистично значуще зниження рівня мiPHK-25 після лікування за критерієм Вілкоксона і тенденцію до зниження рівня мiPHK-335 (за критерієм Фішера LSD різниця була достовірною, $p<0,05$). Показники мiPHK-25 і мiPHK-335 були вищими до лікування порівняно з показником у здорових осіб (тенденція або достовірно відмінні). У 7 з 18 встановлено розвиток метастазів (у 5 осіб — люмінальний В і у 2 пацієнтів — тричі негативний рак), зафіксовано 1 летальний випадок, у 2 — негативну динаміку, у 1 — рецидив, у 14 оцінено стан як стабілізований.

Таблиця 6. Виникнення залежностей у найбільш значущих мiPHK у хворих на РМЗ

Тип мiPHK	Показник залежності		
	Зв'язок з клінічною картиною РМЗ	Зв'язок зі стадією РМЗ	Зв'язок з іншими мiPHK у хворих
мiPHK-25	Збільшення випадків з підвищеним рівнем	Підвищені показники у пацієнтів з IIIA стадією	Виникнення множинних позитивних кореляцій, мiPHK-155, -497, -139, -27, -30, -335
мiPHK-27	Тенденція до зменшення у період премопаузи	Підвищення рівня у хворих з I–IV стадіями, крім IIA	Виникнення позитивних кореляцій з мiPHK-30, -139, -25, -205
мiPHK-497	Достовірно зростає у хворих	Тенденція до підвищення у хворих з IIIA–IV стадіями	Виникнення позитивних кореляцій з мiPHK-155, -25, -335
мiPHK-663	Тенденція до збільшення, в постменопаузі зростає достовірно	Тенденція до збільшення у хворих з IIA стадією	Виникнення позитивної кореляції з мiPHK-155

Таблиця 7. Рівні мiPHK після проведення НПХТ (Mean±SEM • 10³)

Тип мiPHK	Здорові (n=18)	Хворі на РМЗ	
		Дослідження I (n=18)	Дослідження II (n=18)
мiPHK-25	3,0 (2,2)	61,1 (54,5)	1,6 (0,4)*
мiPHK-27	1540,0 (1537,7)	12,7 (7,1)	3083,6 (2121,0)
мiPHK-30	68,1 (65,2)	168,0 (93,4)	6,9 (2,7)
мiPHK-139	317,6 (310,5)	120,0 (50,3)	46,7 (21,9)
мiPHK-155	49,3 (26,1)	94,3 (86,7)	21,5 (12,6)
мiPHK-200	77,5 (34,9)	239,1 (144,0)	243,1 (162,6)
мiPHK-205	417,7 (327,7)	390,3 (235,1)	965,5 (825,5)
мiPHK-335	602,8 (550,0)	27 123,3 (27 034,6)	466,4 (385,1) [†]
мiPHK-497	4,6 (1,4)	79,6 (55,8)	35,0 (23,8)
мiPHK-663	513,7 (332,1)	177,2 (116,1)	34,2 (16,0)

* $p<0,05$ до дослідження I за критерієм Вілкоксона; [†] $p<0,05$ до дослідження I за критерієм Фішера LSD.

Таблиця 5. Рівень мiPHK у групі здорових жінок та хворих на РМЗ з урахуванням молекулярного типу (Mean±SEM • 10³)

Тип мiPHK	Здорові (n=18)	РМЗ (n=70)			
		Люмінальний А (n=13)	Люмінальний Б (n=35)	HER2new (n=4)	Тричі негативний (n=18)
мiPHK-25	3,0 (2,2)	2,4 (0,9)	15,0 (9,0)	0,5 (0,3)	10,1 (4,9)
мiPHK-27	1540,0 (1537,7)	1221,9 (1220,5)	857,6 (788,7)	1,1 (0,7)	39,5 (26,7)
мiPHK-30	68,1 (65,2)	310,1 (309,2)	45,5 (21,5)	47,5 (46,8)	105,0 (71,3)
мiPHK-139	317,6 (310,5)	43,3 (32,3)	54,4 (31,2)	8,7 (6,9)	56,9 (25,8)
мiPHK-155	49,3 (26,1)	28,9 (27,3)	19,0 (9,1)	140,8 (109,8)	37,8 (24,5)
мiPHK-200	77,5 (34,9)	175,0 (102,7)	387,1 (199,8)	5,2 (4,1)	123,4 (48,1)
мiPHK-205	417,7 (327,7)	206,8 (186,3)	600,8 (404,6)	167,6 (101,9)	437,2 (279,1)
мiPHK-335	602,8 (550,0)	44 312,1 (44 240,1)	447,2 (199,2)	0,6 (0,2)	76,6 (63,8)
мiPHK-497	4,6 (1,4)	19,3 (14,7)	49,0 (24,9)	0,06 (0,03)	86,9 (53,3)
мiPHK-663	513,7 (332,1)	9,8 (4,3)	1058,2 (930,4)	92,5 (86,7)	255,1 (126,0)

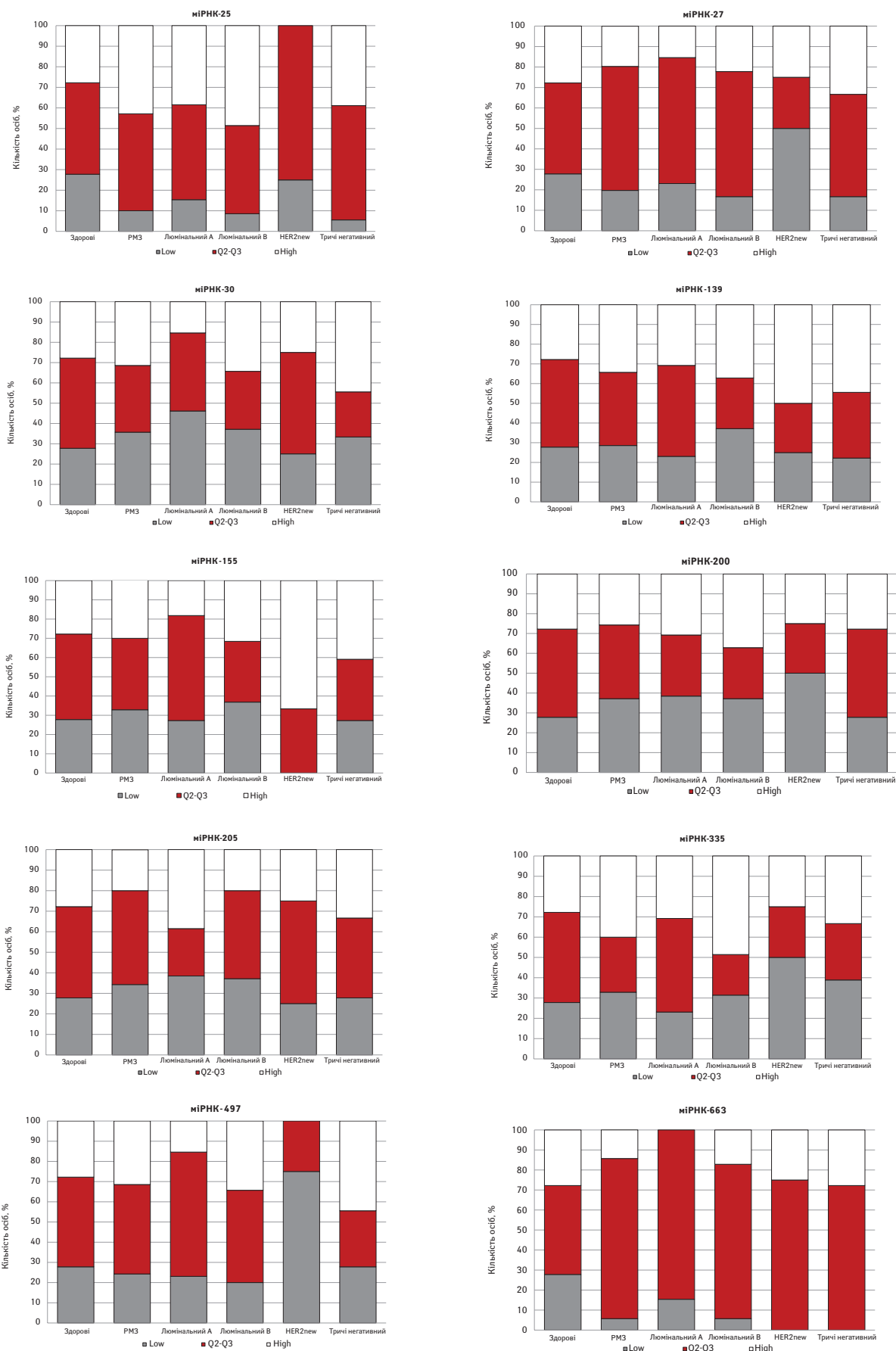


Рис. 3. Розподіл частоти зниженої та підвищеної експресії міРНК у здорових жінок і хворих на РМ3. Розподіл на знижену та підвищену експресію зроблено на основі кватильного розподілу даних здорових осіб (Q1=Low; Q2–Q3=Middle; Q4=High).

ОБГОВОРЕННЯ

Роль міРНК у розвитку РМЗ стає все більш очевидною, і цей зв'язок відкриває можливості для розробки нових діагностичних методів, прогностичних факторів і терапій, що зможуть поліпшити результати лікування та якість життя пацієнтів. міРНК модулюють стоволовість ембріональних стовбурових клітин, зокрема й ракових. Наприклад, міРНК-139-5p оцінено як інгібітор метастазування РМЗ [9]. Підвищена експресія міРНК-29b має зв'язок з такими параметрами, як інвазивний лобулярний рак, IV стадія, наявність метастазів, рецидив [10]. Знижений рівень міРНК-139 може бути пов'язаний з експресією HER2 [11]. Відомо про кореляцію між деякими міРНК (міРНК-9, -21, -126, -200, -205, -335) та підвищеним ризиком метастазування та найбільш несприятливим прогнозом [11–13]. Для підвищення ефективності лікування РМЗ слід активно досліджувати множинні зміни міРНК, розробляти діагностичні панелі найбільш значущих міРНК щодо молекулярного типу РМЗ та їх потенційного зв'язку з чутливістю пухлин до хімотерапії [14]. Загалом молекулярні дослідження і виявлення кореляцій між експресією міРНК та клінічною картиною РМЗ вказує на важливість цього напрямку в лікуванні хворих онкологічного профілю, особливо у молодих жінок. За результатами власних досліджень на увагу заслуговують кореляції між міРНК-25, -30, -139, -205, -335 і -663.

ВИСНОВКИ

На основі аналізу середнього рівня 10 міРНК, частоти розподілу пацієнтів за рівнем міРНК і кореляційних зв'язків можна зробити наступні висновки.

Фактор віку гіпотетично мав значення щодо зміни експресії міРНК-27 та міРНК-497 в рівній мірі як для групи осіб, яким проводили АПХТ, так і після НПХТ. При цьому експресія цих 2 міРНК мала протилежну залежність, у міРНК-27 достовірно була нижчою у жінок у пременопаузальний період і зростала з віком, а у міРНК-497 була достовірно вищою незалежно від віку.

Порівняно зі здоровими жінками у хворих на РМЗ є тенденція до зростання міРНК-497 при IIIA–IV стадіях і міРНК-200 при IV стадії, або зниження міРНК-27 при IIB–IV стадіях. Виявлено статистично значуще зниження рівня міРНК-25 після лікування за критерієм Вілкоксона і тенденцію до зниження рівня міРНК-335.

Також слід зазначити, що міРНК-25, -27, -335, -497 і -663 заслуговують на увагу щодо вивчення їх ролі в розвитку РМЗ та оцінки як потенційних показників ефективності або чутливості до лікування. За такого підходу міРНК-25 є найбільш перспективною з 10, оскільки має тенденцію до зростання у хворих, особливо при стадії IIIA.

Проведене дослідження відкриває перспективи використання даних аналізу експресії зазначених міРНК з метою оцінки ефективності терапії та прогнозу клінічного перебігу патології у осіб з РМЗ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Singh, S., Saini, H., Sharma, A., Gupta, S., Huddar, V. G., & Tripathi, R. (2023). Breast cancer: miRNAs monitoring chemoresistance and systemic therapy. *Frontiers in Oncology*, 13, 1155254. doi: 10.3389/fonc.2023.1155254.
2. Walsh, E. M., Smith, K. L., & Stearns, V. (2020). Management of hormone receptor-positive, HER2-negative early breast cancer. *Seminars in Oncology*, 47(4), 187–200. doi: 10.1053/j.seminoncol.2020.05.010.
3. Kravets, O., Burtyn, O., Borikun, T., & Rossylina, O. (2023). The study of prognostic value of microRNAs (miR-10b and -155) and CDKN2A/P16INK4A in oral squamous cell carcinoma. *Experimental Oncology*, 45(2), 187–194. doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.02.187.
4. Wu, X., Ding, M., & Lin, J. (2020). Three-microRNA expression signature predicts survival in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*, 19(1), 301–308. doi: 10.3892/ol.2019.11118.
5. Garrido-Palacios, A., Rojas Carvajal, A. M., Núñez-Negrillo, A. M., Cortés-Martin, J., Sánchez-García, J. C., & Aguilar-Cordero, M. J. (2023). MicroRNA dysregulation in early breast cancer diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8270. doi: 10.3390/ijms24098270.
6. Hu, Z., Dong, J., Wang, L. E., Ma, H., Liu, J., Zhao, Y., ... Shen, H. (2012). Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*, 33(4), 828–834. doi: 10.1093/carcin/bgs030.
7. Sun, H., Dai, J., Chen, M., Chen, Q., Xie, Q., Zhang, W., ... Yan, M. (2022). miR-139-5p was identified as biomarker of different molecular subtypes of breast carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 12, 857714. doi: 10.3389/fonc.2022.857714.

8. Гур'янов, В. Г., Лях, Ю. Є., Парій, В. Д., Короткий, О. В., Чалий, О. В., Чалий, К. О., & Цехмістер, Я. В. (2018). *Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакеті EZR (R-statistics): навчальний посібник*. Київ: Вістка.

9. Krishnan, K., Steptoe, A. L., Martin, H. C., Pattabiraman, D. R., Nones, K., Waddell, N., ... Cloonan, N. (2013). miR-139-5p is a regulator of metastatic pathways in breast cancer. *RNA*, 19(12), 1767–1780. doi: 10.1261/rna.042143.113.

10. Abbas, M. A., El Sayed, I. E. T., Kamel Abdu-Allah, A. M., Kalam, A., Al-Sehemi, A. G., Al-Hartomy, O. A., & Salah Abd El-Rahman, M. (2022). Expression of miRNA-29b and miRNA-31 and their diagnostic and prognostic values in Egyptian females with breast cancer. *Noncoding RNA Research*, 7(4), 248–257. doi: 10.1016/j.ncrna.2022.09.003.

11. Peña-Chilet, M., Martínez, M. T., Pérez-Fidalgo, J. A., Peiró-Chova, L., Oltra, S. S., Tormo, E., ... Ribas, G. (2014). MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 529. doi: 10.1186/1471-2407-14-529.

12. Zhang, J., & Ma, L. (2012). MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3–4), 653–662. doi: 10.1007/s10555-012-9368-6.

13. Gomasca, M., Maroni, P., Banfi, G., & Lombardi, G. (2020). microRNAs in the antitumor immune response and in bone metastasis of breast cancer: from biological mechanisms to therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2805. doi: 10.3390/ijms21082805.

14. Bertoli, G., Cava, C., & Castiglioni, I. (2015). MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*, 5(10), 1122–1143. doi: 10.7150/thno.11543.

Plasma miRNA levels in breast cancer patients and their correlation with clinical characteristics as a measure of individualized treatment

O. Harashchenko

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Introduction. Breast cancer (BC) is the most common cancer among women. The level of miRNAs expression and changes in their correlation in the dynamics of treatment is considered as a potential prognostic marker of the disease. **Objective.** To identify the levels of miRNAs in the blood plasma of patients with BC, the correlation between miRNAs, the relationship with age, stage and molecular type of the BC. **Materials and Methods.** The levels of 10 miRNAs (miRNA-25, -27, -30, -139, -155, -200, -205, -335, -497, -663) in blood plasma were studied in 70 patients with BC and 18 healthy individuals, age factor (<45 and >45 years), molecular type of cancer were evaluated, correlations between miRNAs pairs were revealed.

Results. The level of miRNA-25, -205, -335, -497 and -663 was significantly higher in patients with BC, the dependence of the reduced level of miRNA-27 and miRNA-335 in patients <45 years of age and the high level of miRNA-27 and miRNA-205 in patients >45 years old, and the level of miRNA-205 is reliably high in both age categories. The trend of dependence of high levels of miRNA-200 and miRNA-497 was found in patients with stage III–IV BC, and miRNA-335 with luminal A type. Multiple positive and negative correlations were established in miRNAs pairs with miRNA-25 in patients with BC (7 vs 3 in healthy individuals). After neoadjuvant chemotherapy, a decrease in the levels of miRNA-25 and miRNA-335 was established. **Conclusions.** The results show that miRNA-25, -27, -335, -497 and -663 deserve attention as a prognostic indicator of BC, and miRNA-25 is the most promising of the 10 in terms of sensitivity to polychemotherapy. The conducted study opens up the prospects of using data from the expression analysis of the specified miRNAs for the purpose of evaluating the treatment effectiveness and prognosis of the disease clinical course in patients with BC.

Key words: breast cancer; miRNA; correlation; blood plasma; age; stage; chemotherapy; treatment results.

Адреса для листування:

Гаращенко Оксана

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології,

онкології та радіобіології ім. П.Є. Кавецького НАН України

E-mail: harashchenko@gmail.com, oksanaclinic@gmail.com

Correspondence:

Oksana Harashchenko

45 Vasylykivka str., Kyiv, 03022

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,

Oncology and Radiobiology of National Academy of Science of Ukraine

E-mail: harashchenko@gmail.com, oksanaclinic@gmail.com