

Н.Ю. Лук'янова¹
Т.В. Борікун¹
Т.В. Задворний¹
Т.М. Яловенко¹
В.М. Базась²
О.М. Ключов²
Е.О. Стаховський³
В.Ф. Чехун¹

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

²Київський міський клінічний онкологічний центр, Київ, Україна

³Національний інститут раку МОЗ України, Київ, Україна

Ключові слова: рак передміхурової залози, рак молочної залози, мікроРНК.

ДІАГНОСТИЧНЕ ТА ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ПУХЛИНО-АСОЦІЙОВАНИХ мікроРНК-21, -125b ТА -221 У ПАЦІЄНТІВ З НАЙБІЛЬШ РОЗПОВСЮДЖЕНИМИ ГОРМОНОЗАЛЕЖНИМИ ЗЛОЯКІСНИМИ НОВОУТВОРЕННЯМИ

Одним із актуальних напрямків фундаментальної онкології останніх років є вивчення епігенетичних порушень під час розвитку та прогресії гормонозалежних злоякісних новоутворень, до яких відносять рак молочної (РМЗ) та передміхурової залози (РПЗ). **Мета:** дослідити показники експресії мікроРНК-21, -125b, -221 в пухлинній тканині хворих із доброякісними і злоякісними новоутвореннями молочної та передміхурової залози, а також оцінити можливість їх використання в якості діагностичних та прогностичних маркерів. **Об'єкт і методи:** дослідження проводили на клінічному матеріалі 90 хворих на РМЗ I–III стадії, 20 пацієнтів з доброякісними новоутвореннями молочної залози, 80 хворих на РПЗ II–IV стадії та 20 пацієнтів з з доброякісною гіперплазією передміхурової залози. Рівні мікроРНК визначали за допомогою зворотного-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. **Результати:** встановлено підвищення показників експресії пухлино-асоційованих мікроРНК-21 та -221 у тканині обох досліджених злоякісних гормонозалежних новоутворень порівняно з доброякісними пухлинами. Показано, що ідентифіковані кореляції рівнів досліджених мікроРНК з деякими клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ та РПЗ, які мають прогностичне значення (вік пацієнтів, стадія захворювання, розмір пухлини, наявність метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів, ступінь диференціювання, молекулярний підтип та рівень простатспецифічного антигену в сироватці крові), свідчать про участь цих мікроРНК у формуванні ступеня злоякісності та асоціацію з агресивністю перебігу захворювання. **Висновки:** отримані результати свідчать про зв'язок основних клініко-патологічних характеристик хворих на РМЗ та РПЗ з рівнями експресії мікроРНК-21, -125b та -221, що обґрунтовує необхідність продовження вивчення запропонованої панелі мікроРНК для їх використання як додаткових прогностичних та діагностичних маркерів.

Найбільш розповсюджені гормонозалежні новоутворення, такі як рак молочної залози (РМЗ) та рак передміхурової залози (РПЗ), на сьогодні займають провідні позиції за показниками захворюваності та смертності як в Україні, так і в усьому світі.

За даними Національного канцер-реєстру, РМЗ посідає перше місце за рівнем захворюваності (20,3%) та смертності (20,1%) з-поміж усіх нозологічних форм злоякісних новоутворень жіночого населення України; РПЗ посідає друге місце за рівнем захворюваності (12,4%) та смертності (9,7%) серед чоловіків [1].

Визначення тактики лікування на сьогодні базується на ідентифікації гістологічного типу та молекулярного підтипу новоутворень при РМЗ, а також шляхом визначення рівня простатспецифічного антигену (ПСА) та індексу Глісона при РПЗ. У той же час доведено, що використання в рутинній практиці лише зазначених показників у половині випадків РМЗ та РПЗ може призводити до хибної оцінки ступеня злоякісності та не дозволяє з високою точністю здійснювати прогнозування перебігу пухлинного процесу. Причиною такого клінічного поліморфізму може бути міжпухлинна та внутрішньопухлинна ге-

терогенність найбільш розповсюджених гормонозалежних злоякісних новоутворень, що робить принципово важливою їх детальну характеристику, включаючи визначення нових біологічних маркерів [2].

Одним з актуальних напрямків фундаментальної онкології останніх років є вивчення епігенетичних порушень під час розвитку та прогресії злоякісних новоутворень, у тому числі при РМЗ. Особлива увага приділяється дослідженню мікроРНК, оскільки вони є основними регуляторами генів, задіяних у канцерогенезі [3]. МікроРНК — це малі некодуючі РНК довжиною приблизно 22 нуклеотиди, які регулюють рівень експресії матричних РНК шляхом взаємодії (інтерференції) з їх специфічними регіонами. МікроРНК забезпечують деградацію мРНК і таким чином знижують рівень експресії таргетних білків завдяки зв'язуванню з 3'-некодуючим регіоном мРНК [4].

Загальний рівень мікроРНК у більшості пухлин суттєво знижений порівняно з відповідними нормальними тканинами [5]. Але на фоні загального зниження рівня експресії мікроРНК у клітинах злоякісних новоутворень виявляється патологічне підвищення рівня окремих мікроРНК. Залежно від таргетних генів мікроРНК може бути онкогенною або онкосупресорною.

Роль мікроРНК як онкогенів або онкосупресорів та їх потенційна чутливість і специфічність продемонстровані для злоякісних новоутворень різного генезу: РМЗ, раку товстого кишечника, легені і РПЗ [6].

Оскільки таргетними мРНК багатьох мікроРНК є мРНК білків — регуляторів процесів транскрипції, гормональних рецепторів, то саме аномальні зміни рівня експресії мікроРНК спричиняють виникнення та прогресію гормонозалежних злоякісних новоутворень [7].

Згідно з даними літератури, а також за результатами власних досліджень [8] встановлено, що при різних типах раку експресується набір певних мікроРНК, зміна співвідношення яких корелює з прогресією злоякісних новоутворень. Саме тому визначення рівня пухлино-специфічних онкогенних і онкосупресорних мікроРНК є потенційно важливим для ранньої диференційної діагностики онкологічних захворювань, а також для прогнозування перебігу пухлинного процесу [9].

На сьогодні сформовано бази даних, в яких зібрано потенційні гени-мішені практично всіх відомих на сьогодні мікроРНК (<http://www.microrna.gr/tarbase/>, http://www.targetscan.org/vert_72/), а також експериментально підтверджено дані щодо їх ролі у фізіологічних процесах та при пухлинному рості (<http://www.mirbase.org/>, <http://www.oncomir.org/>). За допомогою вищевказаних ресурсів нами було підібрано панель мікроРНК (-21, -125b та -221), для яких доведено роль у таких ключових процесах, як проліферація, апоптоз, клітинний цикл, інвазія та метастазування, а також встановлено зв'язок з кан-

церогенезом у молочній та передміхуровій залозах. Проте зміни профілю зазначених мікроРНК, асоційовані з агресивністю перебігу РМЗ та РПЗ, на сьогодні остаточно не з'ясовано. Не визначено також доцільність їх використання в якості діагностичних та прогностичних маркерів.

Мета роботи: дослідити показники експресії мікроРНК-21, -125b, -221 в пухлинній тканині хворих із доброякісними і злоякісними новоутвореннями молочної та передміхурової залоз, а також оцінити можливість їх використання в якості діагностичних та прогностичних маркерів.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота базується на результатах комплексних обстежень 90 хворих на РМЗ I—III стадії та 20 пацієнтів з доброякісними новоутвореннями молочної залози (ДНМЗ), які знаходилися на стаціонарному лікуванні в Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2013—2016 рр. Стадію пухлинного процесу визначали згідно з міжнародною класифікацією пухлин (TNM, 6-те видання, 2016 р). Згідно з даними історій хвороб, усім пацієнтам проведено загальні клінічні, біохімічні, лабораторні обстеження, ультразвукове дослідження органів черевної порожнини, мамографію, рентгеноскопію органів грудної порожнини, пункційну біопсію пухлин молочної залози за стандартами діагностики і лікування онкологічних хворих.

Дослідження включають результати обстеження та лікування 80 хворих на РПЗ II—IV стадії та 20 пацієнтів з доброякісними пухлинами (гіперплазія) передміхурової залози (ДГПЗ), які перебували на лікуванні в Національному інституті раку МОЗ України, протягом 2014—2017 рр.

Усім пацієнтам з доброякісними та злоякісними новоутвореннями передміхурової залози проведено клінічні, лабораторні та інструментальні дослідження відповідно до стандартів діагностики та лікування хворих на РПЗ. Клінічний діагноз встановлювали на підставі визначення рівня ПСА в сироватці крові і пальцевого ректального дослідження, результатів комп'ютерної чи магнітно-резонансної томографії, остеосцинтиграфії. Діагноз РПЗ було верифіковано шляхом дослідження гістологічних препаратів після проведення трансректальної мультифокальної біопсії передміхурової залози під ультразвуковим контролем. Стадію пухлинного процесу визначали згідно з міжнародною класифікацією пухлин TNM 7-го (2009 р.) та 8-го видання (2016 р.).

Усі хворі на доброякісні та злоякісні новоутворення молочної та передміхурової залоз дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях.

Гістологічний тип видалених пухлин верифікували під час морфологічного дослідження гістологічних зрізів парафінових блоків пухлин (фарбування зрізів гематоксиліном та еозином) відповідно до Міжнародної гістологічної класифікації

ВООЗ 2006 р. для новоутворень молочної залози та 2016 р. — для новоутворень передміхурової залози. З парафінових блоків готували препарати, які забарвлювали гематоксиліном та еозином, і за допомогою світлооптичної мікроскопії вивчали морфологічні особливості будови пухлин.

Експресію мікроРНК-21, -125b та -221 досліджували за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі на приладі QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System (ThermoScientific, USA).

Для виділення загальної РНК з парафінових блоків біопсійного та операційного матеріалу використовували «RNeasy FFPE Kit» (QIAGEN, Germany). Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі «NanoDrop 2000c Spectrophotometer» (ThermoScientific, USA). кДНК синтезували з використанням набору для зворотної транскрипції TaqMan. Отриману внаслідок зворотної транскриптазної реакції кДНК використовували в кількісній ПЛР, яку проводили в трьох повторах за допомогою Maxima SYBRGreen/ROX qPCR MasterMix (ThermoScientific, USA) у 96-лункових планшетах (AppliedBiosystems, USA). У якості ендogenous контролю для нормалізації показників експресії мікроРНК використовували мікроРНК RNU48. Відносну експресію мікроРНК обраховували за методикою K. Livak (2008). Середнє для триплікатів граничне значення циклу (Ct) досліджуваної мікроРНК нормалізували відносно Ct ендogenous контролю (далі — у.о.). Зміну експресії мікроРНК в певну кількість разів порівнювали з контролем обчислювали за формулами $2^{-\Delta C_t}$ [10].

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми STATISTICA 6.0. Порівняння достовірності відмінностей середніх величин проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Оцінку зв'язку експресії досліджуваних маркерів з клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу проводили з використанням коефіцієнту кореляції Пірсона. Вживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейера (log-rank test). Достовірними вважали розбіжності за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загальна характеристика пацієнтів з гормонозалежними новоутвореннями наведена в табл. 1. Вік хворих на РМЗ коливався в діапазоні 24–74 років (середній вік — $55,2 \pm 4,1$ року). У більшості пацієнток зафіксовано менопаузу (65,6%), збережена менструальна функція — у 31 (34,4%) хворої. Вік хворих на РПЗ коливався від 45 до 82 років (середній вік — $65,2 \pm 6,2$ року).

Кількість хворих на РМЗ I стадії становила 21 (23,3%), II стадії — 52 (57,8%), стадії III — 56 (18,4%). У ході проведеного до початку лікування комплексного обстеження (рентгенологічного, ультразвукового, лабораторного) виявлено у 20 пацієнток (22,2%) метастази (N1–2) у регіонарні лімфа-

тичні вузли (РЛВ), віддалені метастази не відмічено. Морфологічне дослідження операційного матеріалу показало, що частіше діагностували інфільтративний протоковий РМЗ (73,3%), інфільтративний дольковий рак спостерігався у 26,7% хворих. Серед новоутворень РМЗ переважав помірний ступінь диференціювання (51,1%). Високий та низький ступінь диференціювання спостерігався у 28,9 та 20,0% хворих відповідно. У більшій кількості обстежених виявлено люмінальний А молекулярний підтип РМЗ (у 44,4%), люмінальний Б підтип діагностовано у 26,7%, базальний РМЗ — у 17,8%, HER2/neu-позитивний — у 11,1% пацієнток.

Аналіз розподілу хворих на РПЗ за стадією пухлинного процесу показав, що кількість хворих з II стадією становила 26 (32,5%), з III — 24 (30,0%), з IV — 30 (37,5%).

Серед досліджених зразків РПЗ 40,0% були помірно-диференційованими (сума балів за Глісоном <7), а 60,0% — низько диференційованими аденокарциномами (сума балів за Глісоном ≥ 7). За рівнем ПСА хворі були розподілені на 2 групи: I група — рівень ПСА <4 нг/мл (33,7%), та II група — >10 нг/мл (66,3%).

Таблиця 1
Клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ та РПЗ

Показники	Кількість хворих на РМЗ		Кількість хворих на РПЗ	
	п	%	п	%
Загальна кількість хворих	90	100	80	100
Середній вік, роки	55,2 ± 4,1		65,2 ± 6,2	
Коливання віку	24–74		45–82	
Менструальний цикл збережений	31	34,4	–	
Менопауза	59	65,6	–	
Клінічна стадія захворювання				
Стадія I	21	23,3	–	–
Стадія II	52	57,8	26	32,5
Стадія III	17	18,9	24	30,0
Стадія IV	–	–	30	37,5
Категорія T за TNM				
T1	21	23,3		
T2	52	57,8	26	32,5
T3	17	18,9	52	65,0
T4	–	–	2	2,5
Категорія N за TNM				
N1–2	20	22,2	30	37,5
N0	70	77,8	50	62,5
Гістологічний тип				
Інфільтративний протоковий рак	66	73,3	–	–
Інфільтративний дольковий рак	24	26,7	–	–
Ступінь диференціювання				
G1 (високий)	26	28,9	–	–
G2 (помірний)	46	51,1	–	–
G3 (низький)	18	20,0	–	–
Сума балів за Глісоном				
<7 балів	–	–	32	40,0
≥7 балів	–	–	48	60,0
Рівень ПСА				
<10 нг/мл	–	–	27	33,7
>10 нг/мл	–	–	53	66,3
Молекулярний підтип				
Люмінальний А	40	44,4	–	–
Люмінальний Б	24	26,7	–	–
Базальний	16	17,8	–	–
HER2/неu-позитивний	10	11,1	–	–

Під час аналізу показників експресії мікроРНК-21, -221, -125b в тканині доброякісних і злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залоз встановлено ряд закономірностей. Експресія мікроРНК-21 та -221 була у 1,5 та 3,4 рази вищою у зразках РМЗ порівняно з ДНМЗ відповідно. Рівні зазначених мікроРНК у тканині РПЗ також у 1,85 та 2,48 рази перевищували аналогічні показники у тканині доброякісних новоутворень передміхурової залози відповідно (табл. 2). Клітини РМЗ характеризувалися зниженням експресії мікроРНК-125b порівняно зі зразками ДНМЗ.

Таблиця 2

Профіль експресії мікроРНК у пухлинних клітинах доброякісних і злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залоз, у.о.

№	мікроРНК	ДНМЗ	РМЗ	ДГПЗ	РПЗ
1	мікроРНК-21	7,7 ± 0,7	11,6 ± 0,9*	9,6 ± 1,2	17,8 ± 3,7*
2	мікроРНК-125b	6,9 ± 0,8	2,1 ± 0,0*	1,8 ± 0,4	2,6 ± 0,9
3	мікроРНК-221	1,9 ± 0,1	6,5 ± 0,8*	3,7 ± 0,9	9,2 ± 1,4*

*р < 0,05 порівняно з відповідними показниками у клітинах ДНМЗ та ДГПЗ

При зіставленні показників експресії мікроРНК з клініко-морфологічними особливостями пухлинного процесу відзначено односпрямований характер змін рівня мікроРНК-21 та -221 у клітинах обох досліджених гормонозалежних злоякісних новоутворень залежно від ступеня розповсюдженості пухлинного процесу.

Як видно з даних, наведених на рис. 1, підвищення рівня експресії мікроРНК-21 та -221 спостерігалось в пухлинних клітинах хворих на РМЗ III стадії (13,9 ± 0,5 у.о. та 4,8 ± 0,6 у.о.) у порівнянні з пацієнтами II (9,8 ± 0,1 і 3,9 ± 0,1 у.о.) та I (8,5 ± 0,5 і 1,9 ± 0,2 у.о.) стадій; у новоутвореннях категорії Т3 (13,9 ± 0,5 і 4,8 ± 0,6 у.о.) порівняно з новоутвореннями категорії Т2 (9,8 ± 0,1 і 9,9 ± 0,3 у.о.) та Т1 (8,5 ± 0,5 і 1,9 ± 0,2 у.о.); за наявності метастатичного ураження РЛВ (10,3 ± 0,5 і 3,2 ± 0,2 у.о.) у порівнянні з рівнем експресії цих мікроРНК у хворих без метастазів (8,3 ± 0,3 і 1,6 ± 0,2 у.о.); у пухлинах низького ступеня диференціювання (11,8 ± 0,5 і 3,5 ± 0,2 у.о.) порівняно з високо та помірно диференційованими пухлинами (відповідно 9,8 ± 0,3 і 2,5 ± 0,2 у.о. та 11,2 ± 0,5 і 3,5 ± 0,6 у.о.); при базальному молекулярному підтипі РМЗ (12,4 ± 0,3 і 5,9 ± 0,43 у.о.), порівняно з Her2/neu⁺ (8,2 ± 0,7 і 1,4 ± 0,2 у.о.), люмінальним А (9,5 ± 0,4 і 3,2 ± 0,6 у.о.) та люмінальним Б (10,2 ± 0,8 і 5,9 ± 0,5 у.о.) підтипами.

Показники експресії мікроРНК-21 та -221 у пухлинних клітинах були достовірно більшими за IV стадії РПЗ (13,4 ± 0,8 і 8,1 ± 0,6 у.о.) порівняно із такими при III (16,6 ± 0,4 і 6,5 ± 0,4 у.о.) та II (11,5 ± 0,8 і 1,6 ± 0,2 у.о.) стадіях; у па-

цієнтів з Т4 (16,4 ± 0,7 і 9,2 ± 0,5 у.о.) категорією новоутворень порівняно з пацієнтами з Т3 (14,2 ± 0,2 і 7,1 ± 0,8 у.о.) та Т2 категоріями (12,1 ± 0,8 і 5,6 ± 0,16 у.о.). Рівень експресії мікроРНК-21 в пухлинній тканині був у 1,4 раза (р < 0,05) вищим у хворих на РПЗ із метастазами у РЛВ, ніж у хворих за відсутності метастазів.

Поряд із цим визначено залежність між показниками експресії мікроРНК-125b та деякими клініко-морфологічними характеристиками РМЗ та РПЗ (див. рис. 1). Як видно з наведених даних, рівень експресії мікроРНК-125b був достовірно нижчим у хворих на РМЗ III стадії, порівняно з такими при стадіях I та II (r = -0,59, р < 0,05); у хворих із категорією Т3 порівняно з пацієнтами з категоріями Т1 та Т2 (r = -0,59, р < 0,05); у пацієнтів з метастазами у лімфатичні вузли порівняно з пацієнтами категорії N0 (r = -0,55, р < 0,05); у пухлинах низького ступеня диференціювання порівняно з високо та помірно диференційованими (r = -0,54, р < 0,05). Крім того, у пухлинах базального молекулярного підтипу показники експресії мікроРНК-125b були значно нижчими порівняно з Her2/neu⁺, люмінальним А та люмінальним Б підтипами (r = 0,61, р < 0,05) (див. рис. 1).

На противагу цьому, підвищення рівня експресії мікроРНК-125b виявляли при підвищенні стадії РПЗ (r = 0,60, р < 0,05), збільшенні категорії Т та N (r = 0,58 та 0,55, р < 0,05), підвищенні індексу Глісона (r = 0,62, р < 0,05) та рівня ПСА у сироватці крові хворих (r = 0,62, р < 0,05) (див. рис. 1).

Таким чином, нами встановлено, що підвищення рівня експресії пухлино-асоційованих мікроРНК-21 та -221 на тлі зниження експресії -125b

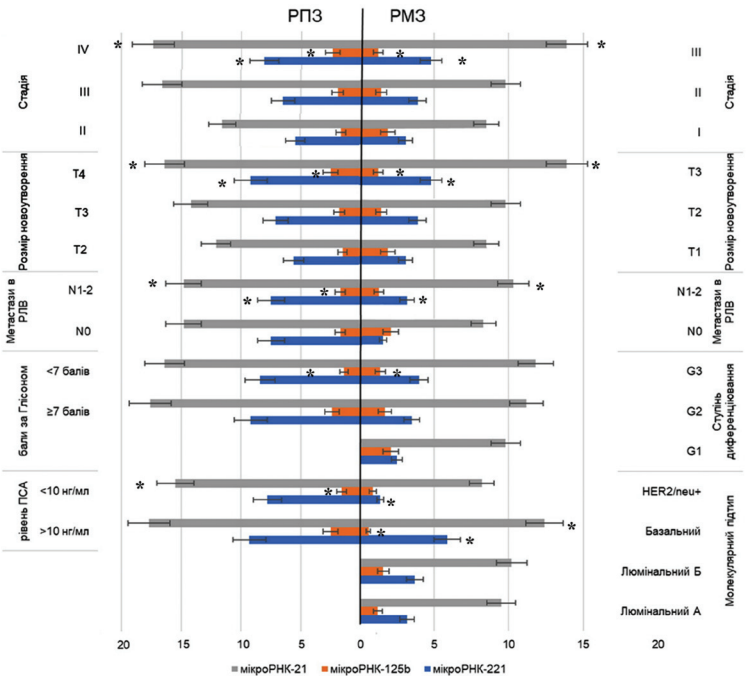


Рис. 1. Показники експресії мікроРНК-21, -221 та -125b у пухлинній тканині хворих на РМЗ та РПЗ

*р < 0,05 порівняно з відповідними клініко-патологічними характеристиками

корелює з такими показниками злоякісності РМЗ, як стадія, розмір пухлини, наявність метастазів у РЛВ, ступінь диференціювання пухлини та молекулярний підтип. У пацієнтів з РПЗ виявлено пряму кореляцію між рівнем експресії усіх трьох досліджених мікроРНК (-21, -125b та -221) зі ступенем розповсюдженості пухлинного процесу, категоріями Т та N, сумою балів за Глісоном та рівнем ПСА в сироватці крові хворих.

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії досліджених мікроРНК з такими показниками агресивності пухлинного процесу, як стадія, наявність метастатичного ураження РЛВ, ступінь диференціювання, молекулярний підтип новоутворень, індекс Глісона та рівень ПСА у сироватці крові, ми проаналізували безрецидивну виживаність пацієнтів з РМЗ та РПЗ з урахуванням рівнів зазначених мікроРНК у пухлинних клітинах.

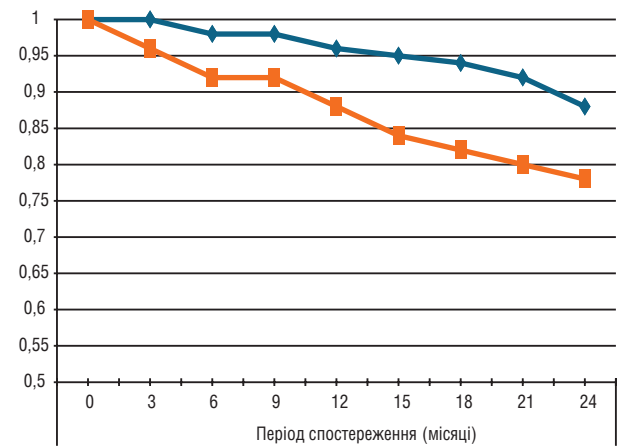
Встановлені нами профілі експресії мікроРНК-21, -125b та -221 дозволяють визначити ризик розвитку рецидиву РМЗ у 3-річний та РПЗ у 2-річний терміни. Як видно з даних, наведених на рис. 2, достовірне зниження показників 3-річної безрецидивної виживаності на 30,0% встановлено у хворих на РМЗ із профілем експресії мікроРНК-21 >11,1; мікроРНК-221 >3,5; мікроРНК-125b <1,7 у.о. у пухлинних клітинах порівняно з групою хворих з показниками експресії мікроРНК-21 <9,2; мікроРНК-221 <3,3; мікроРНК-125b >1,9 у.о. у пухлинних клітинах.

Певні відмінності нами встановлено і при дослідженні показників безрецидивної виживаності хворих на РПЗ залежно від рівнів експресії досліджених пухлино-асоційованих мікроРНК. Так, 2-річна безрецидивна виживаність за наявності експресії мікроРНК-21 >17,0; мікроРНК-221 >9,0; мікроРНК-125b >2,4 у.о. у пухлинних клітинах була нижчою, ніж при показниках експресії мікроРНК-21 <16,0; мікроРНК-221 <7,0; мікроРНК-125b <1,7 у.о. (див. рис. 2б): рецидиви захворювання у першій групі пацієнтів визначалися у 2,3 рази частіше.

Таким чином, високий рівень експресії мікроРНК-21 та -221 і низький рівень експресії мікроРНК-125b у пухлинних клітинах РМЗ асоціюється з несприятливим перебігом захворювання, який вирізняється високим ступенем злоякісності. Найвищі показники експресії мікроРНК-21, -125b та -221 визначено у пухлинних клітинах РПЗ хворих з високим ризиком виникнення рецидиву у 2-річний термін.

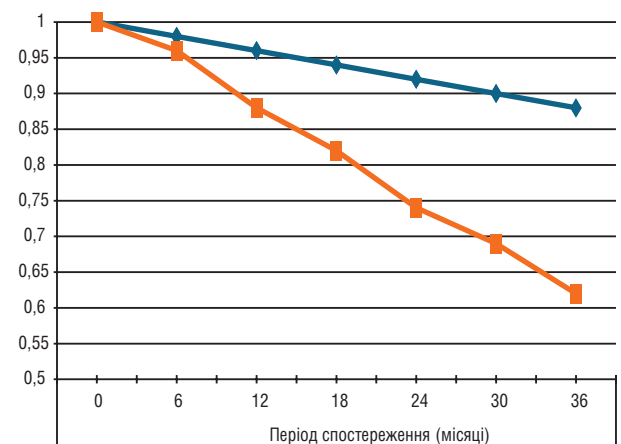
Дослідження останніх десятиліть показали, що мікроРНК є перспективними біомаркерами пухлинного процесу, оскільки профіль їх експресії є тканиноспецифічним та залежить від клініко-патологічних особливостей новоутворень. Уже ідентифіковані мікроРНК, які мають високий прогностичний потенціал для моніторингу перебігу РМЗ та РПЗ, проте клінічні дані на різних вибірках часто є суперечливими. З огляду на це існує необхідність їх валідації в якості маркерів гормонозалежних злоякісних новоутворень.

МікроРНК відіграють надважливу роль практично в усіх життєво важливих процесах, а їх порушення є складовою патогенезу більшості захворювань, у тому числі гормонозалежних. Згідно з даними літератури певні мікроРНК можуть проявляти як онкосупресорні, так і онкогенні властивості.



■ — мікроРНК-21 <9,2, мікроРНК-221 <3,3, мікроРНК-125b >1,9 у.о.
 ■ — мікроРНК-21 >11,1, мікроРНК-221 >3,5, мікроРНК-125b <1,7 у.о.

а



■ — мікроРНК-21 <16, мікроРНК-221 <7, мікроРНК-125b <1,7 у.о.
 ■ — мікроРНК-21 >17, мікроРНК-221 >9, мікроРНК-125b >2,4 у.о.

б

Рис. 2. Безрецидивна виживаність хворих на РМЗ (а) та РПЗ (б) залежно від експресії мікроРНК-21, -221 та 125b у пухлинній тканині, у.о.

Для дослідження нами було підібрано панель мікроРНК, для яких показана участь у гормональному канцерогенезі. Зокрема, мішенями мікроРНК-21 є рецептори андрогенів, вона залучена в регуляцію відповіді на естрогенові та прогестеронові сигнали, підвищення її рівнів асоційоване з неконтрольованим ростом пухлинних клітин. МікроРНК-221 пригнічує експресію рецепторів естрогену-альфа у пухлинних клітинах РМЗ, а зміни її показників також асоціюються з ростом, підвищеною інвазивністю та метастазуванням гормон-рефрактерних пухлин передміхурової залози. Експресія мікроРНК-125b напряму залежить від реакції клітин на стероїдні гормони, оскільки її експресія регулюється гормон-опосередкованими сигнальними каскада-

ми. Досить суперечливою є інформація, яка стоюється прогностичного значення мікроРНК-21, -125b та -221 при найбільш розповсюджених гормонозалежних злоякісних новоутвореннях. Досі не з'ясовано як їх онкосупресорні, так і онкогенні властивості при РМЗ та РПЗ та не існує єдиного погляду на роль цих мікроРНК у розвитку новоутворень такого генезу.

Зафіксоване нами підвищення показників експресії пухлино-асоційованих мікроРНК-21 та -221 у тканині обох досліджених злоякісних гормонозалежних новоутворень порівняно з доброякісними пухлинами, а також суттєве зниження мікроРНК-125b у клітинах РМЗ є підтвердженням участі цих мікроРНК у гормональному канцерогенезі. Ідентифіковані кореляції рівнів досліджених мікроРНК з деякими клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ та РПЗ, які мають прогностичне значення (вік пацієнтів, стадія захворювання, розмір пухлини, наявність метастатичного ураження РЛВ, ступінь диференціювання, молекулярний підтип та рівень ПСА в сироватці крові), свідчать про участь цих мікроРНК у формуванні ступеня злоякісності РПЗ та їх асоціацію з агресивністю перебігу захворювання. Отримані нами дані щодо онкосупресорних властивостей мікроРНК-125b та онкогенних властивостей мікроРНК-21 та -221 при РМЗ, а також онкогенних властивостей усіх трьох досліджених мікроРНК у хворих на РПЗ узгоджуються з поодинокими опублікованими роботами наших зарубіжних колег та потребують подальшого дослідження [11–13].

Отже, отримані дані свідчать про доцільність дослідження запропонованої панелі мікроРНК-21, -125b та -221 для поглибленої характеристики пухлинного процесу в молочній та передміхуровій залозах та визначення ризику виникнення рецидивів у пацієнтів з гормонозалежними злоякісними новоутвореннями, що забезпечить вчасну корекцію схем терапії, дозволить покращити віддалені результати лікування і показники виживаності цього контингенту хворих.

ВИСНОВКИ

1. Продемонстровано, що розвиток злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залоз супроводжується достовірним підвищенням експресії мікроРНК-21 та -221 у пухлинних клітинах хворих.

2. Встановлено, що рівень експресії пухлино-асоційованих мікроРНК-21 та -221 прямо корелює з такими показниками злоякісності РМЗ, як стадія пухлинного процесу ($r = 0,54$ і $0,51$ відповідно), розмір новоутворень ($r = 0,53$ і $-0,50$ відповідно), наявність метастазів у РЛВ ($r = 0,58$ і $-0,57$ відповідно), ступінь диференціювання пухлин ($r = 0,56$ і $0,57$ відповідно) та їх молекулярний підтип ($r = 0,59$ і $0,61$ відповідно).

3. Виявлено кореляційний зв'язок між рівнем експресії пухлино-асоційованих мікроРНК-21 і -221 та такими клініко-патологічними характерис-

тиками РПЗ, як доопераційний рівень ПСА в сироватці крові ($r = 0,59$ і $0,56$ відповідно), категорія Т за TNM ($r = 0,58$ і $0,57$ відповідно), наявність метастазів у РЛВ ($r = 0,56$ і $0,55$ відповідно) та індекс Глісона ($r = 0,52$ і $0,53$ відповідно).

4. Відзначено різноспрямований характер зміни рівнів експресії мікроРНК-125b у тканині РМЗ та РПЗ залежно від клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу. У пухлинній тканині РМЗ показники мікроРНК-125b обернено корелюють зі стадією ($r = -0,59$), категоріями Т та N ($r = -0,59$ і $-0,55$ відповідно), ступенем диференціювання та молекулярним підтипом новоутворень ($r = -0,54$ і $-0,61$ відповідно). У зразках РПЗ рівень експресії мікроРНК-125b, навпаки, прямо корелює зі стадією пухлинного процесу ($r = 0,60$), категоріями Т та N ($r = 0,58$ і $-0,55$ відповідно), ступенем диференціювання та доопераційним рівнем ПСА в сироватці крові хворих ($r = 0,62$ і $-0,62$ відповідно).

5. Безрецидивна 3-річна виживаність хворих на РМЗ є достовірно меншою у пацієнтів з рівнями експресії мікроРНК-21 $>11,1$, мікроРНК-221 $>3,5$, мікроРНК-125b $<1,7$ у.о. у пухлинних клітинах. Рецидиви захворювання в 2-річний термін спостерігалися частіше у пацієнтів з РПЗ з експресією мікроРНК-21 >17 , мікроРНК-221 >9 , мікроРНК-125b $>2,4$ у.о. у пухлинних клітинах.

6. Обгрунтовано доцільність використання панелі мікроРНК-21, -125b та -221 для прогнозування агресивності перебігу та ризику виникнення рецидиву захворювання у хворих на РМЗ та РПЗ.

Робота виконувалася в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (0117U002034) за фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології Національної академії наук України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Cancer in Ukraine, 2016–2017. Incidence, mortality, activities of oncological service. Bull Natl Cancer Registry of Ukr. Kyiv 2018; **19**: 136 p. (in Ukrainian).
2. Lukianova N, Borikun T, Yalovenko T, Chekhun V. Role of miRNA-122 and miRNA-200b in intratumor heterogeneity formation and human breast cancer prognosis. International. J Current Res Rev 2016; **8** (17): 50.
3. Lukianova N, Borikun T, Bazas V, et al. Circulating microRNAs: prospects of use for early diagnostics and monitoring of tumor process. Oncology 2019; **21** (3): 181–91 (in Ukrainian).
4. Chekhun VF, Lukianova NY, Borikun TV, et al. The clinical significance of tumor miR-122, -155, -182, and -200b expression in patients with breast cancer. Science and Innovation 2017; **13** (5): 63–9 (in Ukrainian).
5. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nature reviews cancer 2006; **6** (11): 857–66.
6. Kisseljev FL. MicroRNAs and cancer. Mol Biol 2014; **48** (2): 197–206.

7. Zadvorny TV, Borikun TV, Lukianova NYu, *et al.* Expression of miRNA-126, -205 and -214 in benign and malignant neoplasms of the prostate gland: possible diagnostic and prognostic significance. *Oncology* 2018; **21** (1): 10–16 (in Ukrainian).
8. Chekhun V, Lukianova N, Chekhun S, *et al.* Association of CD44⁺ CD24^{-/low} with markers of aggressiveness and plasticity of cell lines and tumors of patients with breast cancer. *Exp Oncol* 2017; **39**: 203–11.
9. Chekhun VF. MicroRNAs are a key factor in the globalization of tumor-host relationships. *Exp Oncol* 2019; **41**: 188–94.
10. Lukianova NY, Borikun TV, Chekhun VF. Tumor microenvironment-derived miRNAs as prognostic markers of breast cancer. *Exp Oncol* 2019; **41**: 242–7.
11. Peng B, Theng PY, Le MT. Essential functions of miR-125b in cancer. *Cell Proliferation* 2021; **54** (2): e12913.
12. Adhami M, Haghdoust AA, Sadeghi B, Afshar RM. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. *Breast Cancer* 2018; **25** (2): 198–205.
13. Liu K, Wang L, Sun E. Prognostic value of miR-221 in human malignancy: evidence from 3041 subjects. *BMC cancer* 2019; **19** (1): 1–10.

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE OF TUMOR-ASSOCIATED MIRNA-21, -125B AND -221 IN PATIENTS WITH THE MOST COMMON HORMONE-DEPENDENT MALIGNANCIES

N.Yu. Lukianova¹, T.V. Borikun¹, T.V. Zadvorny¹,
T.M. Yalovenko¹, V.M. Bazas², O.M. Kliusov²,
E.O. Stakhovsky³, V.F. Chekhun¹

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

²Kyiv City Clinical Oncology Center, Kyiv, Ukraine

³National Cancer Institute of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. One of the current areas of fundamental oncology in recent years is the study of epigenetic disorders in the development and progression of hormone-dependent malignancies, which include breast cancer (BC) and prostate cancer (PCa). **Aim:** to investigate the ex-

pression of miRNA-21, -125b and -221 in tumor tissue of patients with benign and malignant neoplasms of the breast and prostate glands and to evaluate the possibility of their use as diagnostic and prognostic markers. **Object and methods:** the study was performed on clinical material of 90 patients with stage I–III breast cancer, 20 patients with benign breast tumors, 80 patients with stage II–IV prostate cancer and 20 patients with benign prostatic hyperplasia. MicroRNA levels were determined by real-time reverse transcription PCR. **Results:** an increase in the expression of tumor-associated miRNA-21 and -221 in the tissues of both studied malignant hormone-dependent cancers compared with benign tumors was established. We showed the correlations of the studied miRNA levels with some clinical and pathological characteristics of patients with BC and PCa, which have prognostic value (age of patients, stage of the disease, tumor size, presence of lymph node lesion, degree of differentiation, molecular subtype and PSA level in patients' serum), indicate the participation of these miRNAs in the formation of the BC malignancy degree of and the association with the aggressiveness of studied diseases. **Conclusion:** the results indicate the relationship of the main clinical and pathological characteristics of patients with BC and PCa with expression levels of miRNA-21, -125b and -221, which justifies the need to continue studying the proposed panel of miRNAs for use as additional prognostic and diagnostic markers.

Key Words: prostate cancer, breast cancer, miRNA.

Адреса для листування:

Лук'янова Н.Ю.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

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

E-mail: nataluk10@gmail.com

Одержано: 11.10.2021