

Т.В. Борікун¹
В.М. Базась^{1, 2}
Т.В. Задворний¹
Н.Ю. Лук'янова¹

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

²Київський міський клінічний
онкологічний центр,
Київ, Україна

Ключові слова: рак молочної
залози, молекулярний підтип,
мікроРНК, прогнозування
перебігу пухлинного процесу.

ПРОФІЛЬ ЕКСПРЕСІЇ мікроРНК, АСОЦІЙОВАНИЙ З АГРЕСИВНІСТЮ ПЕРЕБІГУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПІВ

Мета: ідентифікувати профіль експресії пухлино-асоційованих мікроРНК та оцінити їх клінічне значення для прогнозування перебігу раку молочної залози (РМЗ) певного молекулярного підтипу. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на клінічному матеріалі 151 хворої на РМЗ стадій I–II віком $55,2 \pm 4,1$ року, які перебували на стаціонарному лікуванні в Київському міському клінічному онкологічному центрі впродовж 2013–2016 рр. Рівень експресії мікроРНК визначали за допомогою зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Дослідження експресії рецепторів стероїдних гормонів, HER2/неи та маркера проліферації Ki-67 у клітинах РМЗ проводили на парафінових зрізах операційного матеріалу з використанням імуногістохімічного методу. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми GraphPad Prism, v.6.05 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) з урахуванням характеру розподілу отриманих даних. **Результати:** встановлено, що характерною ознакою люмінального А підтипу РМЗ є високі рівні експресії мікроРНК-10b, -126, -221 та низькі рівні експресії мікроРНК-34a, -181a, -200b, -205, -320a; люмінального Б — високі рівні експресії мікроРНК-34a, -155, -200b, -205, -320a та низькі — мікроРНК-10b, -126, -221; HER2/неи-позитивного — високі рівні експресії мікроРНК-126, -221 та низькі — мікроРНК-10b, -34a, -200b, -205, -320a; базального — високі рівні експресії мікроРНК-10b, -21, -34a. Визначено наявність кореляційних зв'язків між рівнем експресії пухлино-асоційованих мікроРНК з основними клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ різних молекулярних підтипів. Продemonстровано зв'язок між рівнями експресії досліджуваних мікроРНК та показниками 3-річної безрецидивної, а також 5-річної загальної виживаності у хворих на РМЗ різних молекулярних підтипів. **Висновок:** обґрунтовано можливість використання показників експресії пухлино-асоційованих мікроРНК для прогнозування агресивності перебігу різних молекулярних підтипів РМЗ та оцінки ризику розвитку рецидиву захворювання.

Рак молочної залози (РМЗ) в Україні, так само, як і в більшості країн світу, посідає перше місце в структурі захворюваності і смертності від злоякісних новоутворень серед жінок. Статистичні дані свідчать про неухильне зростання показників захворюваності на РМЗ за останні 20 років без тенденції до їх стабілізації. В останні роки прогноз клінічного перебігу та визначення тактики лікування базується на підставі визначення не лише гістологічної форми РМЗ, але і його молекулярного підтипу. Водночас на сьогодні остаточно доведено, що РМЗ в рамках навіть одного підтипу є достатньо гетерогенним захворюванням як за перебігом пухлинного процесу і чутливістю до медикаментозної терапії, так і за молекулярним фенотипом.

Одним з актуальних напрямків фундаментальної онкології останніх років є вивчення епігенетичних

порушень під час розвитку та прогресування злоякісних новоутворень, у тому числі при РМЗ. Особлива увага приділяється дослідженню мікроРНК, оскільки вони є основними регуляторами генів, задіяних у канцерогенезі [1]. МікроРНК — це малі некодувальні 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 цільових білків завдяки зв'язуванню з 3'-некодувальним регіоном мРНК [2].

МікроРНК регулюють понад 30% генів людини, що беруть участь у багатьох життєво важливих процесах, таких як проліферація, диференціювання, апоптоз, регуляція імунної відповіді тощо. Саме тому порушення регуляції мікроРНК може вплива-

ти на всі стадії канцерогенезу — від виникнення злоякісного новоутворення до його прогресії. Загальний рівень мікроРНК у більшості пухлин є суттєво зниженим порівняно з відповідними нормальними тканинами [3–5]. Згідно з даними літератури, при різних типах раку експресується набір певних мікроРНК, таких як мікроРНК-373, -155, 182 та ін., зміна співвідношення яких корелює з прогресією пухлинного процесу [6–8]. Саме тому визначення рівня експресії тканино-специфічних мікроРНК є потенційно важливим для ранньої диференційної діагностики онкологічних захворювань, у тому числі РМЗ, а також для прогнозування перебігу пухлинного процесу [9]. Незважаючи на інтенсивність досліджень мікроРНК при злоякісному рості, зв'язок їх експресії з особливостями перебігу різних молекулярних підтипів РМЗ остаточно не встановлений і потребує подальших досліджень. З огляду на сказане вище метою роботи було ідентифікувати профіль експресії пухлино-асоційованих мікроРНК та оцінити їх клінічне значення для прогнозування перебігу РМЗ певного молекулярного підтипу.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В основу роботи покладено ретроспективний аналіз результатів обстеження та лікування 151 хворої на РМЗ стадій I–II, які перебували на лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2013–2016 рр. і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях. Стадію пухлинного процесу визначали, керуючись міжнародними класифікаціями пухлин (TNM, 6-те видання (2002 р.) та 7-ме видання (2009 р.)) [10–11].

Згідно з даними історій хвороб, усім пацієнткам проведено загальні клінічні, біохімічні, лабораторні обстеження, ультразвукову діагностику органів черевної порожнини, мамографію, рентгеноскопію органів грудної порожнини, пункційну біопсію пухлин молочної залози за стандартами діагностики і лікування онкологічних хворих, затвердженими наказами МОЗ України від 27.07.1998 р. № 140, від 17.09.2007 р. № 554, від 30.07.2010 р. № 645 та від 30.06.2015 р. № 396.

Для верифікації пухлинного процесу проведено гістологічне дослідження операційного матеріалу. Загальну структуру пухлин оцінювали під час перегляду гістологічних зрізів товщиною 4–5 мікрон, забарвлених гематоксиліном та еозином, верифікували клінічний діагноз за Міжнародною класифікацією пухлин молочної залози (2009) та оцінювали ступінь диференціювання РМЗ [12].

Вік пацієнток коливався в межах 24–74 років (середній вік — $55,2 \pm 4,1$ року) (табл. 1). Серед обстежених більшу кількість становили хворі на РМЗ стадії II — 75,5%. У 66,9% пацієнток відмічали менопаузу, у 33,1% менструальна функція була збережена. Метастатичні ураження регіонарних лімфатичних вузлів діагностовано у 22,5% хворих, віддалені ме-

Таблиця 1
Клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ I–II стадій

Показники	Кількість хворих	
	п	%
Середній вік, роки	55,2±4,1	
Діапазон віку	24–74	
Менструальний статус		
Збережена функція	50	33,1
Менопауза	101	66,9
Стадія		
Стадія I	37	24,5
Стадія II	114	75,5
N за TNM		
N0	117	77,5
N1–2	34	22,5
Гістологічний тип		
Інфільтративний протоковий рак	110	72,8
Інфільтративний дольковий рак	41	27,2
Ступінь диференціювання		
Ступінь диференціювання G1 (високий)	43	28,5
Ступінь диференціювання G2 (помірний)	77	51,0
Ступінь диференціювання G3 (низький)	31	20,5
Молекулярний підтип		
Люмінальний А	67	44,4
Люмінальний Б	41	27,1
Базальний	27	17,9
HER2/неу-позитивний	16	10,6

тастази при комплексному обстеженні хворих до хірургічного лікування не було виявлено.

Морфологічне дослідження операційного матеріалу показало, що частіше діагностували інфільтративний протоковий РМЗ (72,8%), ніж інфільтративний дольковий (27,2%), при цьому у більшості хворих (51,0%) визначено помірний ступінь диференціювання пухлин.

Грунтуючись на результатах імуногістохімічного дослідження експресії рецепторів естрогенів (РЕ), прогестерону (РП) та епідермального фактора росту (HER2/neu), усі досліджувані зразки пухлинної тканини нами було розділено на 4 молекулярні підтипи: люмінальний А (44,4%), люмінальний Б (27,1%), базальний (або тричі негативний) (17,9%) та HER2/neu-позитивний (10,6%).

Неoad'ювантну поліхіміотерапію (ПХТ) хворим не призначали. Усім пацієнткам проведено хірургічне лікування (квадрант- або лампектомія з регіональною лімфодисекцією, радикальна мастектомія за Маденом). В ад'ювантному режимі проводили ПХТ за схемами, які застосовують у хворих на РМЗ: CMF (циклофосфамід, метотрексат, флуороурацил), CAF (циклофосфамід, доксорубіцин, флуороурацил), 4–6 курсів. Після операції проводили променеву терапію на післяопераційний рубець, пахвову, парастермальну та надключичну ділянки (апарат «TERAGAM», разова вогнищева доза — 2 Гр, сумарна вогнищева доза — 42–44 Гр). Хворим з позитивною експресією гормональних рецепторів у видаленій пухлині на тривалий час призначали гормональну терапію за прийнятими схемами (тамоксифен, інгібітори ароматази) залежно від індивідуальних клінічних даних.

Імуногістохімічний метод. Імуногістохімічне дослідження РЕ, РП, HER2/neu і Ki-67 у клітинах РМЗ про-

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

водили на парафінових зрізах операційного матеріалу. У якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла, які є специфічними до PE (клон 1D5), PP (клон PgR636), HER2/neu (клон c-erbB-2) та Ki-67 (клон MIB-1). Для детекції реакції використовували систему візуалізації Lab Vision™ UltraVision™ Quanto Detection System (Thermo Scientific, USA). Для кількісної оцінки експресії досліджених маркерів використовували метод H-Score за формулою:

$$S = N0 (\%) + 3 \cdot N1 (\%) + 2 \cdot N2 (\%) + 1 \cdot N3 (\%),$$

де S — показник «H-Score», N0 — кількість клітин з відсутньою експресією, N1, N2 та N3 — з низькою, середньою та високою експресією відповідно. Кінцевий результат підрахунку виражали у балах: від 1 до 100 балів — низький, від 101 до 200 балів — середній, від 201 до 300 — високий рівень експресії [13].

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі. Для дослідження експресії пухлинно-асоційованих мікроРНК-10b, -21, -29b, -34a, -126, -155, -181a, -199a, -200b, -205, -221 та -320a було застосовано метод зворотно-транскрипційної ПЛР (ЗТ-ПЛР) у реальному часі. З гомогенату 100 мг пухлинної тканини РМЗ виділяли тотальну РНК за допомогою комерційного набору «miRNeasy 96 Kit» (QIAGEN, USA). Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі «NanoDrop 2000c Spectrophotometer» (ThermoScientific, США).

Чистоту виділеної РНК контролювали, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання за довжини хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у tris-EDTA-буфері та до проведення ПЛР зберігали за температури -20°C .

ЗТ-ПЛР проводили на апаратній системі виявлення Quant Studio DX5 Real-Time PCR System з використанням комерційного набору для ЗТ-ПЛР TaqMan MicroRNA Assay (ThermoScientific, USA) за протоколом виробника. У якості ендogenous контролю для об'єктивізації показників експресії використовували мікроРНК RNU48. Відносну експресію досліджуваних мікроРНК було визначено порівняльним dCT-методом (ум. од.). Дослідження проведено у трьох повторях для кожного зразка.

Для кожної мікроРНК визначали медіанне значення у досліджуваній вибірці, відносно якого робили висновок про високу або низьку її експресію в кожному окремому зразку.

Статистичні методи. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми GraphPad Prism, v.6.05 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) з урахуванням характеру розподілу отриманих даних. Для оцінки достовірності відмінностей показників експресії досліджених маркерів та інших клініко-патологічних параметрів використовували *t*-критерій Стьюдента. Кореляційний аналіз проводили за допомогою розрахунку коефіцієнта кореляції Пірсона. Вживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейєра, достовірність між кривими — за logrank test. Достовірними вважали розбіжності за $p < 0,05$.

МікроРНК — це малі некодувальні РНК, які негативно регулюють експресію генів-мішеней через комплементарність до їх мРНК. Зв'язуючись з таргетною мРНК, мікроРНК спричиняють її деградацію, деаденілювання або зупиняють трансляцію білка, заважаючи проходженню рибосом. Крім того, мікроРНК виконують множинну роль не тільки як посттрансляційні негативні регулятори, а, можливо, і як активатори транскрипції і трансляції [2]. Одна мікроРНК може регулювати експресію від 10 до 200 генів, тоді як один ген може бути під контролем десятка різних мікроРНК. Відповідно, мікроРНК є «глобальними перемикачами» геному, координуючи регулюючи множинні метаболічні шляхи і утворення білкових продуктів.

Вибір мікроРНК для досліджень ґрунтувався на інформації щодо їх задіяності в регуляції генів, асоційованих з виникненням та прогресією пухлинного процесу.

Для цього за допомогою інструментів ресурсу ncbi.nlm.nih.gov (ProSplign, BLAST, GemBank та ін.) та www.mir2disease.org/ підібрано панель мікроРНК. На першому етапі з використанням ресурсу www.mir2disease.org відібрано 263 мікроРНК для яких експериментально доведено зв'язок з канцерогенезом у молочній залозі. На другому етапі, ґрунтуючись на даних літератури, патентів та клінічних випробувань, серед відібраного переліку мікроРНК нами сформовано список із 40 мікроРНК, що беруть участь у регуляції проліферації, апоптозу та асоційовані з інвазивністю і метастазуванням РМЗ.

На наступному етапі з використанням ресурсу ncbi.nlm.nih.gov (BLAST TOOL) проаналізовано послідовності обраних мікроРНК та визначено їх можливі сайти зв'язування не лише в геномі людини, а й у доступних послідовностях ряду збудників інфекційних захворювань (гепатити, вірус папіломи людини, *Helicobacter pylori*, SARS-CoV-2 та ін.) з метою виявлення можливих перекривань даних послідовностей, які знижують прогностичну цінність мікроРНК як маркерів РМЗ. Під час відбору мікроРНК безпосередньо для досліджень нами також було враховано інформацію щодо частоти SNP-поліморфізмів їх послідовностей. Зазначений аналіз дозволив сформувати панель з 12 мікроРНК, для яких встановлено зв'язок з канцерогенезом у молочній залозі, а саме: мікроРНК-10b, -21, -29b, -34a, -126, -155, -181a, -199a, -200b, -205, -221 та -320a.

Зв'язок експресії мікроРНК з молекулярним підтипом РМЗ. Аналіз отриманих даних дозволив встановити, що молекулярні підтипи РМЗ суттєво відрізняються за профілем експресії мікроРНК. Як видно з рис. 1, найбільші зміни співвідношення досліджених мікроРНК визначаються у новоутвореннях базального та HER2/neu-позитивного підтипів порівняно з пухлинами люмінального А та Б підтипів.

Зокрема, у тричі негативних пухлинах порівняно з новоутвореннями люмінального А підтипу експресія мікроРНК-10b, -126 та -221 була вищою (у 1,66; 2,67 та 2,29 раза відповідно), а рівні мікроРНК-34a, -181a, -200b, -205 та -320a — нижчими (у 4,17; 1,71, 4,97; 4,67 та 3,02 раза відповідно). На противагу цьому у пухлинних клітинах люмінального Б підтипу РМЗ показники мікроРНК-10b, -126 та -221 були у 1,41; 2,00 та 3,12 раза нижчими, а мікроРНК-34a, -155, -200b, -205 та -320a у 4,5; 1,54; 5,31; 5,3 та 6,83 раза вищими, ніж у новоутвореннях базально-молекулярного підтипу.

Аналогічну тенденцію зафіксовано під час порівняльного дослідження профілю експресії мікроРНК серед люмінального А та Б підтипів і HER2/неу-позитивного РМЗ (див. рис. 1). Зокрема, показники мікроРНК-126 та -221 у пухлинах HER2/неу-позитивного підтипу були у 2,5 та 2,4 раза вищими, ніж у пухлинах люмінального А підтипу, та у 1,9 та 3,2 раза вищими, ніж у пухлинах люмінального Б підтипу. У клітинах HER2/неу-позитивного РМЗ також відзначено зниження рівня мікроРНК-10b, -34a, -200b, -205 та -320a порівняно з люмінальними пухлинами (у 1,8; 8,3; 4,6; 3,5 та 3,4 раза для люмінального А та у 2,2; 9,0; 4,9; 4,0 та 7,8 раза для люмінального Б підтипу відповідно).

Порівняльне дослідження особливостей експресії мікроРНК у новоутвореннях люмінальних підтипів РМЗ показало, що рівні мікроРНК-29b були у 1,6 разів вищими, а мікроРНК-181a у 1,5 раза ниж-

чими у клітинах люмінального А підтипу порівняно з люмінальним Б ($p < 0,05$).

Певні відмінності нами також встановлено під час аналізу показників експресії дослідженої панелі мікроРНК у тканині базального та HER2/неу-позитивного РМЗ (див. рис. 1). Достовірно вищі рівні експресії мікроРНК-10b, -21 та -34a (у 3,0; 1,5 та 2,0 раза відповідно) зафіксовано у зразках тричі негативного РМЗ порівняно з аналогічними показниками у HER2/неу-позитивних пухлинах.

На наступному етапі нами проаналізовано залежність показників дослідженої панелі мікроРНК від основних клініко-морфологічних характеристик РМЗ всередині кожного молекулярного підтипу.

Як видно з таблиці 2, у хворих на РМЗ люмінального А підтипу показники експресії мікроРНК-10b корелювали зі стадією пухлинного процесу ($r = 0,53$), а рівень експресії мікроРНК-10b, -126 та -34a залежав від ступеня метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (РЛВ) ($r = 0,65, 0,58$ та $-0,67$ відповідно). Рівень експресії мікроРНК-10b та -126 був вищим, а рівень мікроРНК-34a, навпаки, нижчим у хворих з РМЗ II стадії порівняно з пацієнтами з I стадією пухлинного процесу, проте достовірні відмінності нами виявлено лише для мікроРНК-10b ($p < 0,05$).

За результатами аналізу показників мікроРНК у пухлинах хворих на РМЗ люмінального Б молекулярного підтипу встановлено, що у цієї когор-

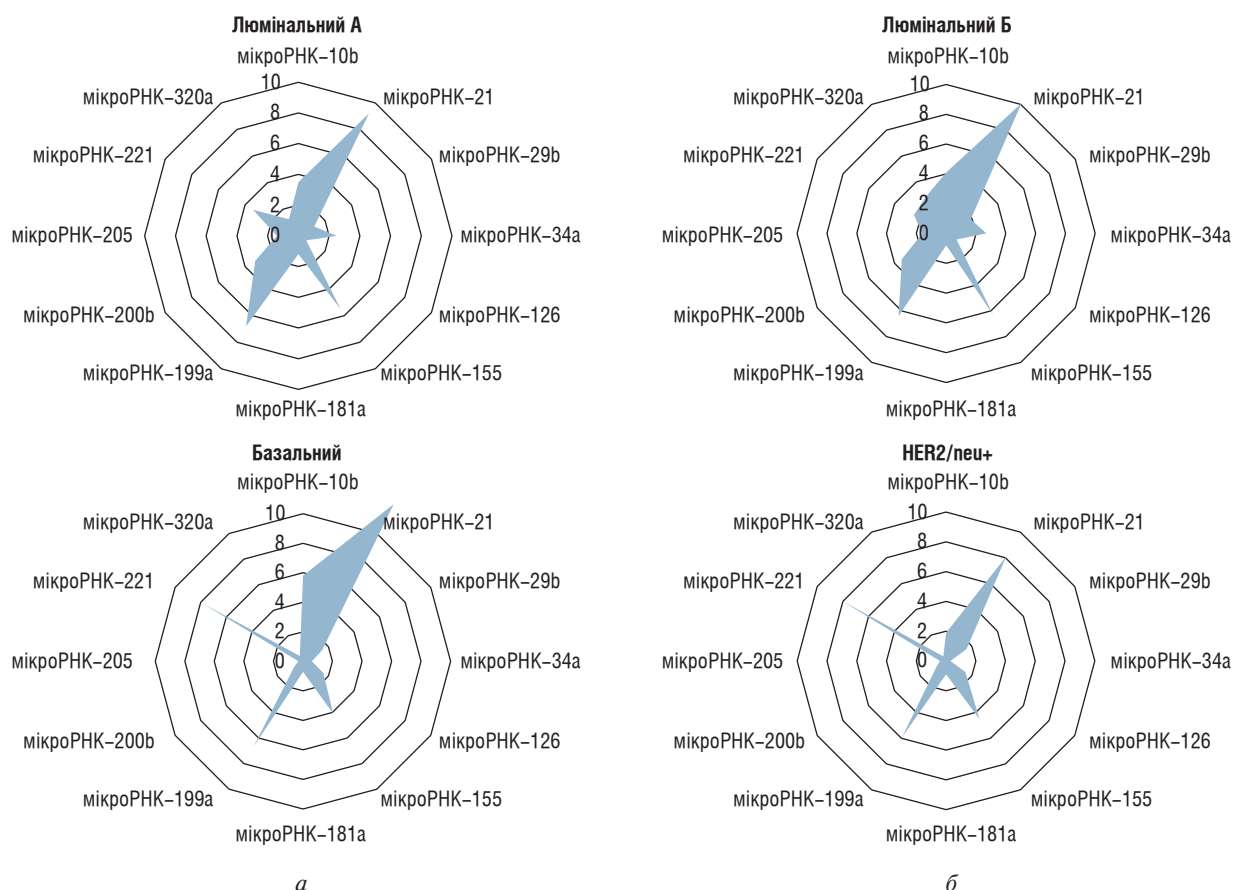


Рис. 1. Експресія пухлинних мікроРНК залежно від молекулярного підтипу РМЗ

Таблиця 2

Експресія пухлинних мікроРНК (у.о.) з урахуванням клініко-морфологічних особливостей РМЗ люмінального А підтипу

мікроРНК	Стадія за TNM		Метастази в регіонарні лімфатичні вузли		Ступінь диференціювання РМЗ			Гістологічний тип	
	I	II	N0	N1-3	G1	G2	G3	Протоковий рак	Дольковий рак
-10b	3,0 ± 0,5	3,9 ± 0,5*	2,9 ± 0,4	3,8 ± 0,2*	3,3 ± 0,6	3,6 ± 0,8	3,4 ± 0,8	3,6 ± 1,5	3,5 ± 0,6
-21	8,5 ± 1,7	9,8 ± 2,3	9,3 ± 1,7	9,1 ± 0,7	9,8 ± 1,2	8,6 ± 2,6	10,2 ± 0,8	9,6 ± 2,3	9,4 ± 1,7
-29b	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2
-34a	2,6 ± 0,6	2,4 ± 0,3	2,6 ± 0,3	1,9 ± 0,1*	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,7	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,3
-126	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,2*	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1
-155	5,4 ± 1,3	5,3 ± 1,2	5,6 ± 2,0	5,4 ± 1,7	5,7 ± 1,7	5,6 ± 1,6	5,7 ± 1,8	5,4 ± 1,7	5,4 ± 1,2
-181a	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,2
-199a	6,7 ± 2,0	6,5 ± 1,2	6,6 ± 2,7	6,7 ± 1,4	6,7 ± 2,0	6,5 ± 1,5	6,5 ± 1,7	6,6 ± 2,3	6,6 ± 2,4
-200b	3,2 ± 0,4	3,4 ± 0,4	3,1 ± 0,5	3,6 ± 0,9	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,3	3,3 ± 0,6	3,2 ± 0,3	3,3 ± 0,4
-205	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,6	1,4 ± 0,6	1,1 ± 0,6	1,5 ± 0,5
-221	3,1 ± 1,3	3,4 ± 1,8	3,2 ± 1,7	3,6 ± 1,6	3,3 ± 1,5	3,4 ± 1,9	3,5 ± 1,3	3,4 ± 1,6	3,3 ± 1,7
-320a	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,6	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,7	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,4

*p < 0,05 у порівнянні з показниками відповідної категорії.

Таблиця 3

Експресія пухлинних мікроРНК (у.о.) з урахуванням клініко-морфологічних особливостей РМЗ люмінального Б підтипу

мікроРНК	Стадія за TNM		Метастази в регіонарні лімфатичні вузли		Ступінь диференціювання РМЗ			Гістологічний тип	
	I	II	N0	N1-3	G1	G2	G3	Протоковий рак	Дольковий рак
-10b	4,1 ± 0,3	4,6 ± 0,3	3,9 ± 0,2	4,6 ± 0,4*	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,3	4,5 ± 0,3	4,1 ± 0,3
-21	10,2 ± 1,7	10,3 ± 1,8	10,2 ± 1,6	10,6 ± 1,8	10,4 ± 2,3	10,3 ± 1,4	10,2 ± 1,7	10,1 ± 1,3	10,3 ± 1,6
-29b	1,9 ± 0,3	2,3 ± 0,4	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,4	2,2 ± 0,9	2,1 ± 0,7	1,8 ± 0,4	2,3 ± 0,5	2,2 ± 0,4
-34a	2,7 ± 0,3	2,1 ± 0,2*	2,9 ± 0,4	1,9 ± 0,4*	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,4	2,4 ± 0,7	2,6 ± 0,3	2,9 ± 0,7
-126	0,7 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1*	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,4	1,1 ± 0,4	0,6 ± 0,5	0,8 ± 0,7
-155	6,3 ± 1,6	6,3 ± 1,6	6,5 ± 1,5	6,1 ± 1,5	6,3 ± 1,5	6,4 ± 1,7	6,3 ± 1,4	6,6 ± 1,3	6,4 ± 1,6
-181a	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2
-199a	6,5 ± 1,7	5,9 ± 1,0	6,1 ± 1,9	6,2 ± 0,8	6,2 ± 1,5	5,9 ± 1,6	5,7 ± 1,0	6,2 ± 1,2	5,2 ± 1,5
-200b	3,8 ± 0,7	3,3 ± 0,6	3,5 ± 0,4	2,9 ± 0,5	3,7 ± 0,6	3,6 ± 0,4	3,7 ± 0,3	3,3 ± 0,6	3,7 ± 0,3
-205	1,5 ± 0,4	1,7 ± 0,5	1,4 ± 0,4	1,9 ± 0,5	1,6 ± 0,7	1,4 ± 0,6	1,8 ± 0,7	1,3 ± 0,4	1,6 ± 0,3
-221	1,9 ± 0,3	2,2 ± 0,5	2,4 ± 0,7	2,2 ± 0,4	2,6 ± 0,5	2,4 ± 0,5	2,6 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,3
-320a	2,9 ± 0,4	2,1 ± 0,3*	2,8 ± 0,6	2,6 ± 0,4	2,7 ± 0,7	2,6 ± 0,3	2,2 ± 0,6	2,6 ± 0,7	2,6 ± 0,5

*p < 0,05 у порівнянні з показниками відповідної категорії.

Таблиця 4

Експресія пухлинних мікроРНК (у.о.) з урахуванням клініко-морфологічних особливостей РМЗ базального підтипу

мікроРНК	Стадія за TNM		Метастази в регіонарні лімфатичні вузли		Ступінь диференціювання РМЗ			Гістологічний тип	
	I	II	N0	N1-3	G1	G2	G3	Протоковий рак	Дольковий рак
-10b	5,2 ± 0,7	6,9 ± 1,5	5,2 ± 1,2	7,5 ± 0,6	5,7 ± 1,8	6,5 ± 1,6	6,1 ± 1,2	5,7 ± 1,6	6,2 ± 1,6
-21	12,6 ± 0,2	12,3 ± 1,1	11,8 ± 0,5	12,5 ± 2,1	11,6 ± 1,1	11,5 ± 1,9	12,2 ± 1,2	12,1 ± 1,9	11,8 ± 2,2
-29b	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,6	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,4	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,6	1,3 ± 0,5	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,7
-34a	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,3
-126	1,3 ± 0,2	1,7 ± 0,2*	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2*	1,9 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,4 ± 0,1
-155	3,7 ± 0,2	4,8 ± 0,3*	4,2 ± 0,5	4,3 ± 0,6	4,1 ± 0,5	4,6 ± 0,6	4,6 ± 0,4	4,1 ± 0,5	4,3 ± 0,5
-181a	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2
-199a	6,7 ± 2,5	5,9 ± 2,9	4,6 ± 3,1	6,9 ± 2,8	5,7 ± 2,4	6,8 ± 2,7	7,2 ± 2,2	6,5 ± 2,2	6,3 ± 2,1
-200b	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,3
-205	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1*	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
-221	7,6 ± 1,2	9,3 ± 1,1	7,8 ± 0,5	9,5 ± 1,1	8,6 ± 1,3	7,5 ± 0,8	8,7 ± 1,2	8,1 ± 2,0	8,9 ± 2,2
-320a	0,4 ± 0,6	0,7 ± 0,4	0,8 ± 0,9	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,6

*p < 0,05 у порівнянні з показниками відповідної категорії.

ти пацієнток рівні мікроРНК-34a та -320a при РМЗ II стадії були у 1,3 та 1,4 раза нижчими, ніж у хворих на РМЗ I стадії. Також нами виявлено, що експресія мікроРНК-10b, -34a та -126 корелює з наявністю метастазів у РЛВ — у пацієнток без метастазів ці показники становили 3,9 ± 0,2; 2,9 ± 0,4 та 0,8 ± 0,1 у.о. відповідно, у той час як при N1-3 — 4,6 ± 0,4; 1,9 ± 0,4 та 1,2 ± 0,1 у.о. відповідно; коефіцієнти кореляції становили 0,64; -0,57 та 0,63 відповідно (табл. 3).

За результатами аналізу рівнів експресії мікроРНК залежно від основних клініко-морфологічних характеристик РМЗ базального молеку-

лярного підтипу виявлено кореляційний зв'язок між рівнем експресії мікроРНК-126 та -205 та метастатичним ураженням РЛВ (r = 0,62 та -0,67 відповідно). Рівні мікроРНК-126 були достовірно вищими за наявності метастазів у РЛВ (у 1,5 раза), а мікроРНК-205 — нижчими (у 4,1 раза) (табл. 4). Для мікроРНК-126 також встановлено зв'язок зі стадією РМЗ базального молекулярного підтипу (r = 0,53). Як видно з наведених даних, у пацієнток з тричі негативним РМЗ II стадії рівень експресії мікроРНК-126 був у 1,3 раза вищим порівняно з хворими на РМЗ I стадії.

Експресія пухлинних мікроРНК (у.о.) з урахуванням клініко-морфологічних особливостей РМЗ підтипу HER2/неу+

мікроРНК	Стадія за TNM		Метастази в регіонарні лімфатичні вузли		Ступінь диференціювання РМЗ			Гістологічний тип	
	I	II	N0	N1-3	G1	G2	G3	Протоковий рак	Дольковий рак
-10b	1,6 ± 0,7	2,6 ± 1,1*	1,5 ± 1,3	2,1 ± 0,9	3,3 ± 0,4	2,9 ± 1,5	2,1 ± 1,6	2,3 ± 1,5	2,9 ± 1,9
-21	4,9 ± 0,7	6,7 ± 3,7	5,4 ± 2,9	6,8 ± 2,6	5,6 ± 1,9	5,5 ± 1,8	5,8 ± 1,7	5,1 ± 2,4	4,9 ± 4,3
-29b	1,5 ± 1,2	1,9 ± 1,4	2,1 ± 1,9	1,2 ± 0,8	2,2 ± 1,5	1,9 ± 1,6	2,7 ± 1,0	1,2 ± 1,2	2,2 ± 1,5
-34a	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2
-126	6,7 ± 2,5	5,9 ± 2,9	4,6 ± 3,1	6,9 ± 2,8	5,7 ± 2,4	6,8 ± 2,7	7,2 ± 2,2	6,5 ± 2,2	6,3 ± 2,1
-155	3,8 ± 0,3	4,4 ± 0,2	4,2 ± 0,5	4,6 ± 0,2	4,1 ± 0,7	4,2 ± 0,6	4,4 ± 0,4	4,1 ± 0,5	4,4 ± 0,4
-181a	0,8 ± 0,3	0,3 ± 0,2*	0,9 ± 0,3	0,3 ± 0,2*	0,4 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,5
-199a	6,1 ± 1,8	5,9 ± 2,8	4,9 ± 1,3	6,2 ± 2,2	6,7 ± 1,5	6,7 ± 1,7	7,1 ± 1,8	6,6 ± 2,6	5,9 ± 2,1
-200b	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2
-205	0,4 ± 0,6	0,5 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,3 ± 0,5*	0,7 ± 0,5	0,3 ± 0,4	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,6
-221	8,1 ± 1,8	7,9 ± 2,8	7,9 ± 1,3	8,2 ± 2,2	7,7 ± 1,5	7,7 ± 1,8	7,1 ± 1,8	8,6 ± 2,6	7,9 ± 2,1
-320a	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,3*	0,8 ± 0,3	0,3 ± 0,2*	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1

*p < 0,05 у порівнянні з показниками відповідної категорії.

У хворих з HER2/неу-позитивним молекулярним підтипом РМЗ виявлено зв'язок між рівнем експресії мікроРНК-10b, -181a, -320a та стадією пухлинного процесу ($r = 0,55$; $-0,61$ та $-0,64$ відповідно). Зокрема, у пацієток з HER2/неу-позитивним РМЗ II стадії рівень експресії мікроРНК-10b був у 1,6 раза вищим, а показники рівня експресії мікроРНК-181a та -320a — у 2,7 та 3,0 раза нижчими відповідно, порівняно з новоутвореннями РМЗ I стадії. Поряд із цим рівень експресії мікроРНК-181a, -205 та -320a в пухлинній тканині пацієток з HER2/неу-позитивним РМЗ обернено корелював з наявністю метастатичного ураження РЛВ ($r = -0,63$; $-0,55$; $-0,57$). Так, за наявності метастазів у РЛВ експресія зазначених мікроРНК була у 3,0; 2,7 та 2,6 раза нижчою, ніж у зразках пухлинної тканини хворих без метастазів (табл. 5).

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку показників експресії дослідженої панелі мікроРНК з клініко-патологічними особливостями певних молекулярних підтипів РМЗ, на наступному етапі нами проаналізовано показники виживаності хворих залежно від рівня експресії мікроРНК-10b, -34a та -126 у хворих на РМЗ люмінального А підтипу, мікроРНК-10b, -126 та -34a — у пацієтів з РМЗ люмінального Б підтипу, мікроРНК-126 та -205 — у хворих на РМЗ базального підтипу та мікроРНК-181a, -205 та -320a — у пацієтів з HER2/неу-позитивним молекулярним підтипом РМЗ.

Як видно з даних, наведених на рис. 2, достовірне зниження показників 5-річної загальної виживаності на 30,0% встановлено у хворих на РМЗ люмінального А підтипу з профілем експресії мікроРНК-10b >3,8 у.о., мікроРНК-126 >0,6 у.о., мікроРНК-34a <2,0 у.о. у пухлинних клітинах. Певні відмінності зафіксовано і при дослідженні показників безрецидивної виживаності хворих на РМЗ люмінального А підтипу залежно від показників експресії пухлино-асоційованих мікроРНК. 3-річна безрецидивна виживаність за наявності експресії мікроРНК-10b >3,8 у.о., мікроРНК-126 >0,6 у.о., мікроРНК-34a <1,6 у.о. у пухлинних клітинах була нижчою, ніж при експресії зазначених мікроРНК

на рівні <2,1 у.о., <0,30 у.о., >2,1 у.о. відповідно (див. рис. 2).

Аналіз профілю експресії мікроРНК-126, -34a та -320a залежно від показників виживаності хворих на РМЗ люмінального Б молекулярного підтипу показав, що у пацієток з рівнем експресії мікроРНК-34a >2,5 у.о., мікроРНК-126 <0,7 у.о., мікроРНК-320a >2,5 у.о., 5-річна виживаність була

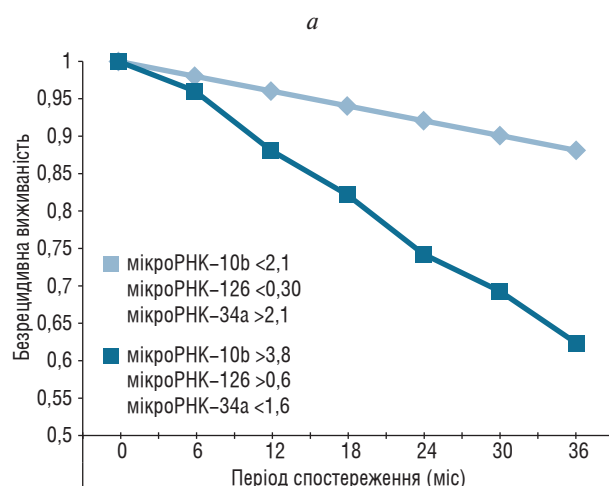
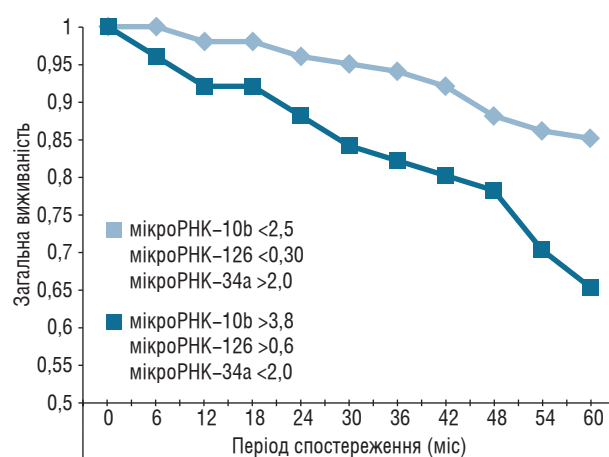


Рис. 2. Загальна (а) та безрецидивна (б) виживаність хворих на РМЗ люмінального А підтипу залежно від рівня експресії мікроРНК у пухлинній тканині, у.о.

на 75,0% вищою, ніж у хворих із рівнем експресії мікроРНК-34а $<1,4$ у.о., мікроРНК-126 $>1,2$ у.о., мікроРНК-320а $<2,0$ у.о. При цьому рецидиви у 3-річний термін спостерігаються у 1,8 раза рідше у пацієнтів з рівнем експресії мікроРНК-34а $>2,6$ у.о., мікроРНК-126 $<0,8$ у.о., мікроРНК-320а $>2,5$ у.о. порівняно з хворими з рівнем експресії мікроРНК-34а $<1,2$ у.о., мікроРНК-126 $>1,1$ у.о. та мікроРНК-320а $<2,1$ у.о. (рис. 3).

У хворих на РМЗ базального молекулярного підтипу високий рівень експресії мікроРНК-126 ($>1,8$ у.о.) та низький рівень експресії мікроРНК-205 ($<0,1$ у.о.) асоціювалися з гіршими показниками 3- та 5-річної виживаності. Рецидиви у 3-річний термін спостерігалися в 1,5 раза рідше за показників мікроРНК-126 $<1,1$ у.о. та мікроРНК-205 $>0,5$ у.о., ніж у пацієнтів з рівнями мікроРНК-126 $>1,7$ у.о., мікроРНК-205 $<0,1$ у.о. (рис. 4).

Підвищення показників виживаності хворих на HER2/неу-позитивний РМЗ асоціювалося з високими рівнями експресії мікроРНК-181а, -205 та -320а (вище 0,8; 0,7 та 0,6 у.о. відповідно), у той час як при експресії зазначених мікроРНК нижче 0,2, 0,2 та 0,4 у.о. відповідно загальна виживаність

була нижчою на 25,0% (рис. 5). У хворих з рівнями експресії мікроРНК-181а $>0,8$ у.о. мікроРНК-205 $>0,9$ та мікроРНК-320а $>0,7$ у.о. рецидиви в 3-річний термін виявляли у 2,1 раза рідше, порівняно із хворими, у яких ці показники були $<0,2$; $<0,1$ та $<0,4$ у.о. відповідно.

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури щодо важливої ролі мікроРНК-10b у метастазуванні пухлин молочної залози. Зокрема, Zhang та співат. (2018) продемонстрували асоціацію між експресією мікроРНК-10b та такими клініко-патологічними параметрами РМЗ, як вік хворих, стадія, метастатичне ураження РЛВ, а також показниками виживаності [14]. У експериментах *in vivo* встановлено, що підвищена експресія мікроРНК-10b корелює з інвазивною та метастатичною активністю злоякісно трансформованих клітин. Клітини карциноми молочної залози людини з гіперекспресією мікроРНК-10b, що були імплантовані мишам, демонстрували значну інвазію в строму та спричиняли розвиток метастазів у легені [15].

МікроРНК-34а є однією з онкосупресорних мікроРНК, оскільки її основною функцією є запуск р53-опосередкованого апоптозу. Також було про-

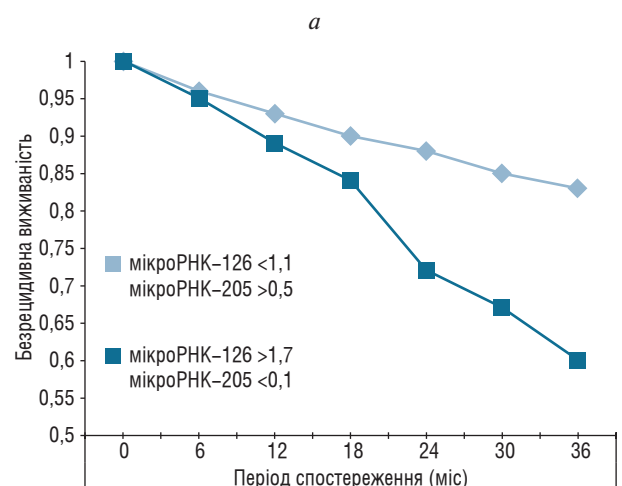
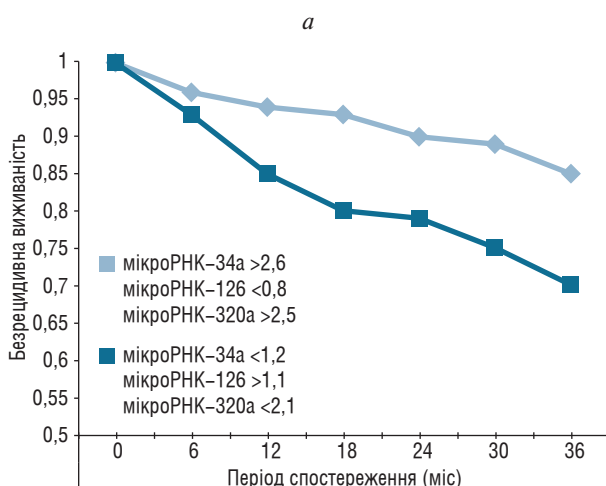
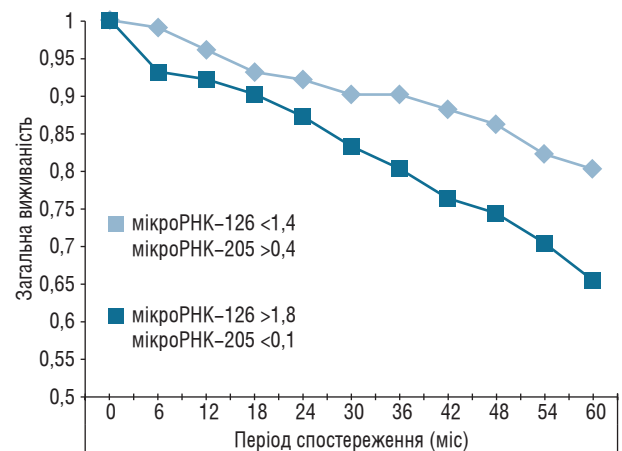
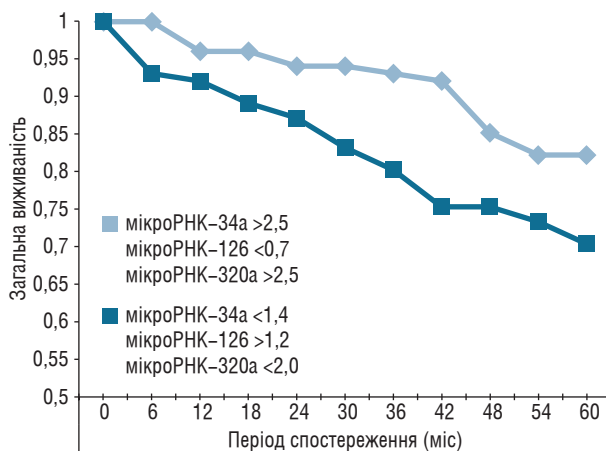


Рис. 3. Загальна (а) та безрецидивна (б) виживаність хворих на РМЗ люмінального Б підтипу залежно від рівня експресії мікроРНК у пухлинній тканині, у.о.

Рис. 4. Загальна (а) та безрецидивна (б) виживаність хворих на РМЗ базального підтипу залежно від рівня експресії мікроРНК у пухлинній тканині, у.о.

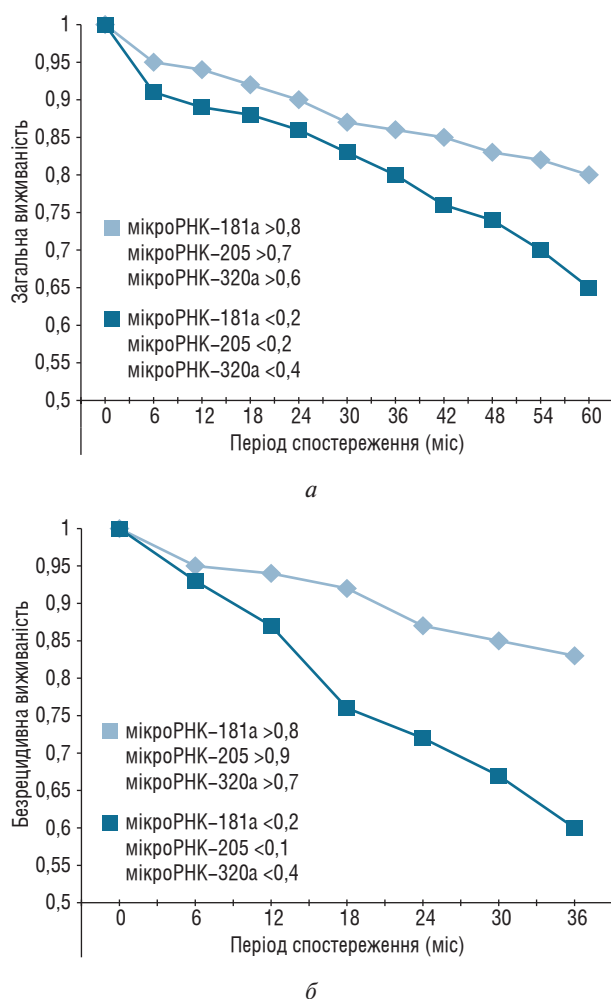


Рис. 5. Загальна (а) та безрецидивна (б) виживаність хворих на РМЗ HER2/неу-позитивного підтипу залежно від рівня експресії мікроРНК у пухлинній тканині, у.о.

демонстровано, що мікроРНК-34а регулює клітинний цикл і пригнічує проліферацію клітин [16]. Крім того, попередні дослідження продемонстрували, що мікроРНК-34а інгібує епітеліально-мезенхімальний (EMT) перехід та спричиняє розвиток віддалених метастазів шляхом пригнічення транскрипційних факторів, пов'язаних із EMT, таких як TWIST1 і ZEB 1 [17].

Tokutani та співавт. (2020) оцінили клінічну значущість експресії мікроРНК-34а як прогностичного маркера виживаності пацієнтів з РМЗ. У їх дослідженні виявлено зв'язок рівня експресії цієї мікроРНК з показниками загальної і безрецидивної виживаності хворих на рецептор-позитивні молекулярні підтипи РМЗ [18]. Ці ж автори дослідили прогностичну значущість панелі мікроРНК-9, -30а, -200с, -18а, -205 і -744 при РМЗ. Так, було встановлено вплив поліморфізмів досліджуваних мікроРНК на їх онкогенні/онкосупресорні функції при РМЗ [19].

МікроРНК-126 задіяна в регуляції ангіогенезу та проліферації клітин РМЗ. Хоча в ряді досліджень *in vitro* та *in vivo* її функції визначають як онкосупресорні (трансфекція клітин лінії MCF-7 аго-

ністом мікроРНК-126 знижує проліферацію клітин та інгібує ангіогенез ксенотрансплантанта пухлини); дані, отримані на клінічному матеріалі, варіюють у широких межах [20–21].

Деякі автори повідомляють про обернений кореляційний зв'язок рівнів пухлинної мікроРНК-126 та кількості метастазів у РЛВ у хворих на РМЗ базального молекулярного підтипу [22]. Проте у дослідженні [23] виявлено, що висока експресія мікроРНК-126 пов'язана з низькими показниками загальної виживаності хворих на РМЗ незалежно від молекулярного підтипу новоутворень. Така варіабельність результатів може бути зумовлена значною гетерогенністю цього захворювання, а також популяційними особливостями (імовірно, різною частотою поліморфізмів цієї мікроРНК).

МікроРНК-320а є маловивченою в якості прогностичного маркера РМЗ. У дослідженнях на невеликій вибірці пацієнтів було продемонстровано зв'язок її експресії з розміром пухлини, клінічною стадією РМЗ, регіонарним та віддаленим метастазуванням [24]. Крім того, як і у нашому дослідженні, пацієнти з низьким рівнем експресії мікроРНК-320а мали нижчі показники виживаності. В іншій роботі продемонстровано, що ця мікроРНК пригнічує метастазування РМЗ шляхом безпосереднього інгібування експресії MTDN [25].

Літературні дані вказують на те, що експресія мікроРНК-181а порушується під час розвитку РМЗ, однак є кілька суперечливих висновків, які ставлять під сумнів її біологічне значення у розвитку та прогресії пухлин цього гістогенезу.

Berber та співат. (2014) встановили зниження експресії цієї мікроРНК у хворих на РМЗ базального молекулярного підтипу за наявності метастатичного ураження РЛВ, а також продемонстрували її зв'язок з виживаністю пацієнтів [26]. В іншому дослідженні виявлено, що рівень мікроРНК-181а був нижчим у клітинах РМЗ з низькою інвазивною активністю [27].

Водночас трьома незалежними дослідницькими групами встановлено, що підвищена експресія мікроРНК-181а корелює з агресивністю перебігу РМЗ. У кількох дослідженнях показано, що пухлини базального та HER2/неу-позитивного молекулярних підтипів з високими рівнями зазначеної мікроРНК відрізняються агресивним перебігом та характеризуються наявністю метастазів у кістки і низькими показниками виживаності хворих [28].

Незважаючи на суперечливу роль в розвитку новоутворень різного гістогенезу, щодо пухлин молочної залози функції мікроРНК-205 в основному описують як онкосупресорні. На сьогодні відомо, що експресія мікроРНК-205 значно знижена у пухлинній тканині порівняно з нормальною, а також є значно нижчою у тканині метастазів порівняно з первинною пухлиною. Продemonстровано, що низькі рівні мікроРНК-205 асоційовані з наяв-



Рис. 6. Алгоритм прогнозування перебігу РМЗ різних молекулярних підтипів

ністю метастазів у РЛВ у пацієнтів з базальним молекулярним підтипом РМЗ [26]. Також існують дані щодо зв'язку між показниками експресії цієї мікроРНК та виживаністю хворих на РМЗ базально-го та HER2/неу-позитивного підтипів [29].

Підсумовуючи отримані дані, можна стверджувати про значущість мікроРНК-10b, -34a, -126, -181a, -205 та -320a як прогностичних маркерів перебігу РМЗ різних молекулярних підтипів (рис. 6).

ВИСНОВКИ

1. Ідентифіковано профіль експресії мікроРНК у тканині РМЗ різних молекулярних підтипів. Встановлено, що характерною ознакою люмінального А підтипу є високі рівні експресії мікроРНК-10b, -126 та -221 та низькі мікроРНК-34a, -181a, -200b, -205 та -320a; люмінального Б — високі рівні експресії мікроРНК-34a, -155, -200b, -205 та -320a та низькі мікроРНК-10b, -126 та -221; Неr/неу-позитивного — високі рівні експресії мікроРНК-126 та -221 та низькі — мікроРНК-10b, -34a, -200b, -205 та -320a; базального (тричі негативного) — високі рівні експресії мікроРНК-10b, -21 та -34a.

2. Встановлено наявність кореляційних зв'язків між рівнем експресії пухлино-асоційованих мікроРНК з основними клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ різних молекулярних підтипів. У пацієнток з РМЗ люмінального А підтипу показники експресії мікроРНК-10b корелювали зі стадією пухлинного процесу ($r = 0,53$), а мікроРНК-10b, -126 та -34a з метастатичним ураженням РЛВ ($r = 0,65$, $0,58$ та $-0,67$, відповідно). У хворих на РМЗ люмінального Б молекулярного підтипу рівень експресії мікроРНК-10b, -34a та -126 корелював з наявністю метастазів у РЛВ ($r = 0,64$, $-0,57$ та $0,63$ відповідно). У пацієнток з HER2/неу-позитивним молекулярним підтипом РМЗ виявлено зв'язок між рівнем експресії мікроРНК-10b, -181a та -320a та стадією пухлинного процесу ($r = 0,55$, $-0,61$ та $-0,64$, відповідно); мікроРНК-181a, -205 та -320a — з наявністю метастатичного ураження РЛВ ($r = -0,63$; $-0,55$; $-0,57$). Продемонстровано кореляційний зв'язок між рівнем експресії мікроРНК-126 і -205 та метастатичним ураженням РЛВ ($r = 0,62$ та $-0,67$ відповідно) хворих на РМЗ базального молекулярного підтипу, а також між

показниками експресії мікроРНК-126 та стадією захворювання ($r = 0,53$).

3. Визначено достовірно вищі показники 5-річної загальної виживаності у хворих на РМЗ: люмінального А підтипу — за умови низького рівня експресії пухлино-асоційованих мікроРНК-10b і мікроРНК-126 та високого рівня експресії мікроРНК-34a; люмінального Б підтипу — за високих показників експресії мікроРНК-34a, мікроРНК-126 та мікроРНК-320a; HER2/неу-позитивного підтипу — за високих рівнів експресії мікроРНК-181a, -205 та -320a; базального підтипу — за низького рівня експресії мікроРНК-126 та високого — мікроРНК-205.

4. Виявлено, що 3-річна безрецидивна виживаність була вищою у хворих на РМЗ: люмінального А підтипу — за низьких показників експресії мікроРНК-10b і мікроРНК-126, високого рівня експресії мікроРНК-34a; люмінального Б підтипу — за високих показників експресії мікроРНК-34a, мікроРНК-320a та низького рівня експресії мікроРНК-126; HER2/неу-позитивного підтипу — за високих рівнів експресії мікроРНК-181a, -205 та -320a; базального підтипу — за низького рівня експресії мікроРНК-126 та високого — мікроРНК-205.

5. Обґрунтовано можливість використання показників експресії мікроРНК у пухлинних клітинах для прогнозування агресивності перебігу різних молекулярних підтипів РМЗ та оцінки ризику розвитку рецидиву захворювання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Chekhun VF. MicroRNAs are a key factor in the globalization of tumor-host relationships. *Exp Oncol* 2019; **41** (3): 188–94. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-3.13431.
2. Chekhun VF. MicroRNA in the tumor process. *Oncology* 2012; **15** (2): 136 (in Ukrainian)
3. Chekhun S, Bezdenezhnykh N, Shvets J, Lukianova N. Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines of different molecular subtype. *Expl oncol* 2013; **35** (3): 174–9.
4. Lukianova NY, Borikun TV, Zadvornyi TV, et al. Diagnostic and prognostic value of tumor-associated miRNA-21, -125b and -221 in patients with the most common hormone-dependent malignancies. *Oncology* 2021; **23** (3): 123–9 (in Ukrainian)
5. 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). doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-23-3-2021-g.9840
6. Nair MG, Somashekaraiah VM, Ramamurthy, et al. miRNAs: critical mediators of breast cancer metastatic programming. *Exp Cell Res* 2021; **401** (1): 112518. doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112518.
7. 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. doi: 10.1007/s12282-017-0814-8
8. Healy N, Heneghan H, Muller N, et al. Systemic microRNA as potential biomarkers in cancer. *Int J Cancer* 2013; **131**: 2265–71. doi:10.1002/ijc.27642
9. Tang Q, Ouyang H, He D, et al. MicroRNA-based potential diagnostic, prognostic and therapeutic applications in triple-

negative breast cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; **47** (1): 2800–9. doi: 10.1080/21691401.2019.1638791

10. Sobin LH, Wittekind C. TNM. Classification of malignant tumors. Sixth Edition. UICC, Ed Wiley-Liss 2003; 193.

11. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch, et al. International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edn. New York: Wiley, 2009

12. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, et al. 4th. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon: IARC Press; 2012

13. Budwit-Novotny DA, McCarty KS, Cox EB, et al. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res* 1986; **46** (10): 5419–25.

14. Zhang J, Yang J, Zhang X, et al. MicroRNA-10b expression in breast cancer and its clinical association. *PLoS One* 2018; **13** (2): e0192509. doi: 10.1371/journal.pone.0192509

15. Wang J, Yan Y, Zhang Z, Li Y. Role of miR-10b-5p in the prognosis of breast cancer. *PeerJ*, 2019; **7**: e7728. doi: 10.7717/peerj.7728

16. Adams BD, Parsons C, Slack FJ. The tumor-suppressive and potential therapeutic functions of miR-34a in epithelial carcinomas. *Expert Opin Ther Targets* 2016; **20** (6): 737–53. doi: 10.1517/14728222.2016.1114102

17. Imani S, Wu RC, Fu J. MicroRNA-34 family in breast cancer: From research to therapeutic potential. *J. Cancer* 2018; **9** (20): 3765–75. doi: 10.7150/jca.25576

18. Tokumaru Y, Katsuta E, Oshi M, et al. High expression of miR-34a associated with less aggressive cancer biology but not with survival in breast cancer. *Int J of Mol Sci* 2020; **21** (9): 3045. doi: 10.3390/ijms21093045

19. Kim SY, Kawaguchi T, Yan L, et al. Clinical relevance of microRNA expressions in breast cancer validated using the cancer genome atlas (TCGA). *Ann Surg Oncol* 2017; **24** (10): 2943–49. doi: 10.1245/s10434-017-5984-2

20. Alhasan L. MiR-126 modulates angiogenesis in breast cancer by targeting VEGF-A-mRNA. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019; **20** (1): 193. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.1.193

21. Li F. Expression and correlation of miR-124 and miR-126 in breast cancer. *Oncol Lett* 2019; **17** (6): 5115–9. doi: 10.3892/ol.2019.10184

22. Rouigari M, Dehbashi M, Tabatabaiean H, et al. Evaluation of the expression level and hormone receptor association of miR-126 in breast cancer. *Indian J Clin Biochem* 2019; **34** (4): 451–7. doi: 10.1007/s12291-018-0766-6

23. Thomopoulou K, Papadaki C, Monastiriotti A, et al. MicroRNAs regulating tumor immune response in the prediction of the outcome in patients with breast cancer. *Front Mol Biosci* 2021; **8**: 668534. doi: 10.3389/fmolb.2021.668534

24. Yang H, Yu J, Wang L, et al. miR-320a is an independent prognostic biomarker for invasive breast cancer. *Oncol Lett* 2014; **8** (3): 1043–50. doi: 10.3892/ol.2014.2298

25. Yu J, Wang JG, Zhang L, et al. MicroRNA-320a inhibits breast cancer metastasis by targeting metadherin. *Oncotarget* 2016; **7** (25): 38612. doi: 10.18632/oncotarget.9572

26. Berber U, Yilmaz I, Narli G, Haholu A, et al. miR-205 and miR-200c: predictive micro RNAs for lymph node metastasis in triple negative breast cancer. *J Breast Cancer* 2014; **17** (2): 143–8. doi: 10.4048/jbc.2014.17.2.143

27. Noh H, Hong S, Dong Z, et al. Impaired microRNA processing facilitates breast cancer cell invasion by upregulating urokinase-type plasminogen activator expression. *Genes Cancer* 2011; **2** (2): 140–50. doi: 10.1177/1947601911408888

28. Yang C, Tabatabaie SN, Ruan X, Hardy P. The dual regulatory role of MiR-181a in breast cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017; **44** (3): 843–56. doi: 10.1159/000485351

29. Cataldo A, Piovon C, Plantamura I, et al. MiR-205 as predictive biomarker and adjuvant therapeutic tool in combination with trastuzumab. *Oncotarget* 2018; **9** (46): 27920. doi: 10.18632/oncotarget.24723

miRNA EXPRESSION PROFILE ASSOCIATED WITH AGGRESSIVENESS OF BREAST CANCER OF DIFFERENT MOLECULAR SUBTYPES

T.V. Borikun¹, V.M. Bazas^{1,2}, T.V. Zadvorny¹,
N.Yu. Lukianova¹

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

²Kyiv City Clinical Oncology Center, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to identify the expression profile of tumor-associated microRNAs and assess their clinical significance for predicting the breast cancer (BC) course of a particular molecular subtype. **Object and methods:** the study was conducted on clinical material of 151 patients with stage I–II BC aged 55.2 ± 4.1 years, who were hospitalized in the Kyiv City Clinical Oncology Center during 2013–2016. MicroRNA levels were determined using real-time reverse transcriptional polymerase chain reaction. Studies of the expression of steroid hormone receptors, HER2/neu and the proliferation marker Ki-67 in breast cancer cells were performed on paraffin sections of the operative material using the immunohistochemical method. Statistical processing of the obtained results was performed using the program GraphPad Prism, v.6.05 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) taking into account the nature of the distribution of the obtained data. **Results:** It was found that high levels of expression of miRNA-10b, -126 and -221 and low miRNA-34a, -181a, -200b, -205 and -320a are characteristic of luminal A subtype of breast cancer; luminal B — high levels of miRNA-34a, -155, -200b, -205 and -320a and low levels of miRNA-10b, -126 and -221; HER2/neu-positive — high levels of miRNA-126 and -221 and low — miRNA-10b, -34a, -200b, -205 and -320a; basal — high levels of expression of miRNA-10b, -21 and -34a. The presence of correlations between the level of expression of tumor-associated microRNAs with the main clinical and pathological characteristics of patients with breast cancer of different molecular subtypes was determined. The relationship between the expression levels of the studied microRNAs and the rates of 3-year recurrence-free and 5-year overall survival in patients with breast cancer of different molecular subtypes was demonstrated. **Conclusion:** the possibility of using expression indicators of tumor-associated miRNAs to predict the aggressiveness of different molecular subtypes of breast cancer and assess the risk of recurrence is substantiated.

Key words: breast cancer, molecular subtype, microRNA, predicting a tumor process.

Адреса для листування:

Борікун Т.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: tborikun@gmail.com

Одержано: 08.06.2022