

Національна академія наук України
Міністерство охорони здоров'я України

**МікроРНК ЯК ПРОГНОСТИЧНІ МАРКЕРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ
У ХВОРИХ МОЛОДОГО ВІКУ**
(методичні рекомендації)

Київ 2023

Національна академія наук України
Міністерство охорони здоров'я України

«УЗГОДЖЕНО»

Голова ГО «Національна асоціація
онкологів України»



В.О. Зуб

26 грудня 2023 р.

МікроРНК ЯК ПРОГНОСТИЧНІ МАРКЕРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ У ХВОРИХ МОЛОДОГО ВІКУ

(методичні рекомендації)

Київ – 2023

Установа-розробник: Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Укладачі:

Чехун Василь Федорович, д. мед. н., професор, академік НАНУ	(044) 259-01-83
Лук'янова Наталія Юріївна, д. б. н. , ст. д.	(044) 257-96-44
Кашуба Олена Віталіївна, д. б. н.	(044) 257-96-44
Борікун Тетяна Вікторівна, к. б. н.	(044) 257-96-44
Задворний Тарас Володимирович, к. б. н.	(044) 257-96-44
Базась Володимир Миколайович, к. мед.н .	(044) 257-96-44
Шепеленко Ірина Віталіївна, к. б. н.	(044) 257-96-44
Мартинюк Олена Михайлівна	(044) 257-96-44
Мушій Олександр Михайлович	(044) 257-96-44
Павлова Анна Олександрівна	(044) 257-96-44
Лялькін Сергій Анатолійович, д. мед. н.	(044) 293-21-32
Кротеви́ч Михайло Станіславович, к. мед.н .	(044) 293-21-32

Рецензент:

Литвиненко Олександр Олександрович, д. мед. н., професор, завідувач відділу радіоіндукованих онкологічних захворювань, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»

Рекомендовано:

Вченою радою Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (протокол № 12 від 13 грудня 2023 р.)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
МікроРНК ЯК ПРОГНОСТИЧНІ БІОМАРКЕРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ..	9
Клінічна характеристика хворих	10
Протокол дослідження профілю експресії рівнів мікроРНК у сироватці крові та пухлинній тканині у хворих на РМЗ молодого віку з використанням ПЛР в реальному часі.....	12
Зв'язок експресії пухлино-асоційованих та циркулюючих мікроРНК з показниками виживаності хворих на РМЗ молодого віку	18
ВИСНОВКИ	21
ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	22

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

PM3	—	рак молочної залози
Her2/neu	—	рецепторрепідермального фактора росту 2
ПЛР	—	полімеразна ланцюгова реакція
ЗТ-ПЛР	—	Зворотно-транскрипційна ПЛР

ВСТУП

Рак молочної залози (РМЗ) є найбільш часто діагностованою формою злоякісних гормонозалежних новоутворень у жінок молодого віку. Згідно даних GLOBOCAN за 2021 рік у структурі захворюваності РМЗ посідає перше місце серед пацієток віком 18-29 років та є однією із провідних причин смертності у віковому діапазоні 15-39 років. Статистичні дані останніх років свідчать, що середній показник захворюваності на РМЗ у молодих жінок збільшується щорічно на 1,2%. Найбільший приріст захворюваності на РМЗ зафіксовано у віковій групі пацієток 15-34 років порівняно з жінками віком 35-39 років, що є характерним для всіх країн світу, в тому числі й країнам з високим соціально-економічним рівнем добробуту. Враховуючи зазначене, останніми роками провідні онкологи виділяють РМЗ у молодих пацієток, як окремий напрямок молекулярно-біологічних та клінічних досліджень.

Вважається, що молодий вік є незалежним прогностичним фактором РМЗ, що асоціюється з несприятливим прогнозом та низькими показниками виживаності хворих. Згідно даних багатьох клінічних спостережень середні показники загальної 5-річної виживаності жінок з діагностованим РМЗ віком від 45 до 80 років становлять 84-86%, в той час у хворих вікових категорій 25-29, 30-34 та 35-39 років — 76%, 80% та 72% відповідно.

Відомо, що РМЗ у пацієток молодого віку також відрізняється від такого в осіб літнього віку за клініко-патологічними характеристиками та молекулярним профілем. Найбільш поширеним молекулярним підтипом новоутворень у молодих пацієток є люмінальний Б підтип, який діагностують на 10% частіше, ніж у пацієток після 45 років, та асоціюється з високим ступенем ураження регіонарних лімфатичних вузлів. Доведено, що проліферативна активність новоутворень є незалежним предиктивним фактором пухлинного перебігу лише у молодих жінок із люмінальним Б молекулярним підтипом РМЗ. Крім того,

виживаність хворих на РМЗ люмінального А та люмінального Б молекулярних підтипів є достовірно меншою у хворих молодого віку у порівнянні з пацієнтками старшого віку, а показники загальної виживаності у різних вікових групах пацієнток з базальним та Her2/neu-позитивним РМЗ практично не відрізнялись. Виявлено, що наявність люмінального А молекулярного підтипу РМЗ асоціюється з низькими показниками загальної виживаності та високим ризиком виникнення рецидиву пухлинного процесу у молодих жінок порівняно з пацієнтками старше 40 років.

З огляду на це, пошук факторів, які б дозволити спрогнозувати агресивний потенціал РМЗ хворих молодого віку з урахуванням біологічних особливостей пухлинних клітин, є пріоритетним напрямком досліджень, а оптимізація комплексного лікування цієї прогностично несприятливої групи хворих залишається одним із найбільш актуальних завдань сучасної онкомамології. Перспективним в цьому аспекті вважається дослідження особливостей мікрооточення осередку пухлинного вогнища.

Впродовж останнього десятиліття набирає популярності концепція реактивного пухлинного мікрооточення, яке сприяє інвазії пухлинних клітин, ангіогенезу та, власне, метастазуванню, забезпечуючи комунікацію між пухлинними та стромальними клітинами за допомогою цитокінів, хемокінів, факторів росту, секреторних молекул, а також регуляторних молекул позаклітинного матриксу. Згідно даних літератури, фенотип пухлино-асоційованих стромальних клітин може бути обумовлений епігенетичною дисрегуляцією експресії генів. Зокрема показано, що мікроРНК, що їх синтезують пухлинні клітини, здатні модулювати мікрооточення, а зміна профілів експресії мікроРНК стромальних клітин сприяє підвищенню інвазивної активності та метастатичного потенціалу новоутворень.

Ідентифікація панелей мікроРНК, асоційованих з агресивністю перебігу РМЗ, дозволяє розробити підходи до індивідуалізованого лікування хворих на РМЗ

молодого віку, що сприятиме підвищенню його ефективності та покращенню якості життя цієї категорії пацієнтів.

Методичні рекомендації розроблено за результатами досліджень, виконаних у межах НТР «Розроблення та валідація технології комплексного лікування на рак молочної залози хворих молодого віку» ДОГОВІР № ДЗ /135-2022 р. від 21 жовтня 2022 р. на виконання науково-технічної роботи за державним замовленням на науково-технічні (експериментальні) розробки та науково-технічну продукцію (2022-2023, № Держреєстрації 0122U201203).

Представлені рекомендації розраховані на онкомамологів та хіміотерапевтів, що займаються діагностикою та лікуванням хворих на РМЗ молодого віку.

Методичні рекомендації із зазначеним спектром пухлино-асоційованих та циркулюючих мікроРНК, запропонованих в якості критеріїв прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на РМЗ молодого віку, видаються в Україні вперше.

МікроРНК ЯК ПРОГНОСТИЧНІ БІОМАРКЕРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Вдосконалення підходів до лікування РМЗ залишається актуальною проблемою онкології, що зумовлено високими показниками захворюваності та смертності жіночого населення, особливо молодого віку. Різноманітна клінічна картина РМЗ, відсутність у багатьох випадках позитивної відповіді на стандартні схеми лікування у осіб одного віку з ідентичною поширеністю процесу, гістологічною формою та ступенем диференціювання пухлини пов'язані із існуванням міжпухлинної та внутрішньопухлинної гетерогенності популяції злоякісно-трансформованих клітин. Біологічне явище внутрішньопухлинної гетерогенності є ключовим фактором, що визначає спрямованість пухлинного процесу як при його виникненні, так і в реалізації різних форм та шляхів розвитку пухлинної прогресії, тобто агресивності перебігу захворювання. Внутрішньопухлинна гетерогенність відіграє вирішальну роль у темпах розвитку новоутворення, підтримці його онкогенного потенціалу, виживаності клітин в умовах динамічного мікрооточення. Проявом існуючої гетерогенності у межах однієї пухлини є відмінності різних груп популяції клітин за морфологічною будовою, генетичним, епігенетичним статусом, а також варіабельність за експресією різних маркерів, у тому числі молекулярно-генетичних. Успіхи молекулярної біології останніх років відкривають нові можливості для діагностики та лікування хворих на РМЗ, засновані на молекулярній характеристиці кожної окремої пухлини. Одним із завдань онкології на сьогодні є визначення панелі найбільш значимих молекулярно-біологічних показників, що доповнюють один одного та асоціюються з агресивністю перебігу РМЗ.

Сьогодні, окрім застосування імуногістохімічного методу (визначення рецепторного статусу, проліферативної активності та адгезивних властивостей новоутворень) та FISH-аналізу, розроблено низку підходів для прогнозування

перебігу процесу у хворих на РМЗ. Зокрема, молекулярні та геномні дослідження використовують для генотипування багатьох видів солідних пухлин в разі, якщо стандартні методи лікування раку виявилися неефективними. Проте, незважаючи на інформативність, ці методи мають обмеження — матеріал новоутворення неможливо використовувати для моніторингу пухлинного процесу та для оцінки змін характеристик пухлинних клітин у процесі лікування. Ці питання можуть бути вирішені завдяки використанню в діагностичній практиці маркерів, що циркулюють у рідинах організму. Встановлено, що показники циркулюючих та пухлинно-асоційованих мікроРНК є не менш інформативними прогностичними параметрами, ніж експресія їх білків-мішеней у клітинах первинної пухлини.

МікроРНК — це клас малих некодуючих РНК (з 19-30 нуклеотидів), які функціонують на посттранскрипційному рівні як регулятори експресії багатьох генів. За нормальних фізіологічних умов мікроРНК беруть участь у багатьох клітинних процесах, включно з проліферацією, диференціюванням, апоптозом. Експресію деяких мікроРНК пов'язують з ініціацією і прогресією багатьох типів новоутворень, що є підґрунтям щодо їх використання в якості діагностичних критеріїв перебігу пухлинного процесу. Суттєву перевагу щодо інших біомаркерів вони мають внаслідок стабільності та тканиноспецифічності, оскільки вже на ранніх стадіях канцерогенезу пухлини мають унікальний профіль експресії мікроРНК. Також мікроРНК виступають як паракринні та аутокринні регулятори пухлинного мікрооточення. Пошук та ідентифікація циркулюючих та пухлино-асоційованих мікроРНК з урахуванням рівня гетерогенності пухлин є надзвичайно перспективним напрямком сучасної онкології.

Клінічна характеристика хворих

Ретроспективне дослідження профілю експресії мікроРНК для прогнозування агресивності перебігу РМЗ проведено на зразках пухлинної

тканини та сироватки крові 140 хворих на РМЗ молодого віку (згідно класифікації ВООЗ 2015 року), які проходили лікування у Національному інституті раку МОЗ України протягом 2015-2020 років і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях. Загальна клінічна характеристика хворих представлена у Табл. 1.

Таблиця 1. Клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ II-III стадій

Показники	Кількість хворих	
	п	%
Загальна кількість хворих	140	100
Середній вік, роки	35,7±4,5	
Коливання віку, роки	23-44	
Репродуктивний статус		
Менструальний цикл збережений	106	75,71
Менопауза	34	24,29
Стадія		
II	96	68,57
III	44	31,43
Наявність метастазів у регіонарні лімфатичні вузли		
N0	80	57,14
N1-3	60	42,86
Гістологічний підтип		
Інфільтративна протокова аденокарцинома	99	70,71
Інфільтративна долькова аденокарцинома	41	29,29
Ступінь диференціювання		
Ступінь диференціювання G1 (високий)	18	12,86
Ступінь диференціювання G2 (помірний)	106	75,71
Ступінь диференціювання G3 (низький)	16	11,43
Молекулярний підтип		
Люмінальний А	56	40
Люмінальний Б	46	32,86
Базальний	20	14,29
HER2/neu-позитивний	18	12,85

Всіх хворих обстежено з використанням загальноприйнятих клініко-лабораторних методів відповідно до Стандартів діагностики та лікування онкологічних хворих, затверджених Наказом МОЗ України № 396 від 30.06.2015 р. (реєстровий номер ГС 2015-396).

Протокол дослідження профілю експресії рівнів мікроРНК у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ молодого віку з використанням ПЛР в реальному часі

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі – це метод молекулярної біології, який використовується для детекції і напівкількісного визначення рівнів нуклеїнових кислот, таких як ДНК або РНК. Метод заснований на циклічному ампліфікуванні ДНК за допомогою ферменту ПЛР.

Опис методики

Зі 100 мкл сироватки крові (замороженої *ex tempore* при $t -20^{\circ}\text{C}$) хворих на РМЗ виділяли тотальну РНК за допомогою комерційного набору TRI Reagent® RNA Isolation Reagent (Sigmaaldrich, США).

З парафінових блоків пухлинної тканини (біопсійний матеріал) тотальну РНК виділяли з використанням комерційного набору “RNeasy FFPE Kit” (QIAGEN, Німеччина).

Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі “NanoDrop 2000c Spectrophotometer” (ThermoScientific, США). Чистоту виділеної РНК контролювали, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання при довжині хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у tris-EDTA буфері та до проведення ПЛР зберігали при $t -20^{\circ}\text{C}$.

Для визначення мікроРНК використовували окремий stem-loop праймер для синтезу кДНК та універсальний reverse primer 5'- GTGCAGGGTCCGAGGT-3', відповідно до методики stem-loop miRNA зворотньо-транскрипційної ПЛР (ЗТ-

ПЛР) з використанням модифікованої методики для комерційного набору LunaScript™ RT SuperMix (New England, США) за протоколом виробника.

Послідовності праймерів для виявлення мікроРНК отримано з ресурсу <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadestool/>, синтезовані компанією Metabion, Німеччина (Табл. 2).

Таблиця 2. Послідовності праймерів, що використовують для оцінки експресії мікроРНК

мікроРНК	Stem-loop праймер	Forward праймер
miR-21-5p (miR-21)	3'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGA GGTATTTCGCACCAGAGCCAAC TCAACA-5'	3'-GTTTGGTAGCT TATCAGACTGA-5'
miR-27a-3p (miR-27a)	3'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGA GGTATTTCGCACCAGAGCCAAC GCGGAA-5'	3'-GTGGTTCACA GTGGCTAAG-5'
miR-29b-3p (miR-29b)	3'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGA GGTATTTCGCACCAGAGCCAAC AACACT-5'	3'-GTTGGTAGCAC CATTTGAAATC-5'
miR -34a-5p (miR-34a)	3'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGA GGTATTTCGCACCAGAGCCAAC ACAACC-5'	3'-GTGTGGCAGT GTCTTAGCT-5'
miR-145-5p (miR-145)	3'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGA GGTATTTCGCACCAGAGCCAAC AGGGAT-5'	3'-GTGTCCAGT TTTCCCAGGA-5'
miR-182-5p (miR-182)	3'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGA GGTATTTCGCACCAGAGCCAAC AGTGTG-5'	3'-GTTGTTTGGCA ATGGTAGAACT-5'

Продукт ЗТ-ПЛР використовували для проведення ПЛР в реальному часі з застосуванням готової суміші Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), (ThermoScientific, США) за протоколом виробника.

В якості ендogenous контролю використовували мікроРНК RNU48. Послідовності праймерів взяті з ресурсу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> та синтезовані компанією Metabion, Німеччина: RT-праймер: 5'-CTCTGACC-3', forward 5'-AGTGATGATGACCCCAGGTAАСТC-3', reverse 5' - CTGCGGTGATGGCATCAG-3'. Відносну експресію мікроРНК визначали порівняльним dCT методом.

Середнє для триплікатів граничне значення циклу (Ct) досліджуваної

мікроРНК нормалізували відносно Ct ендogenousного контролю (далі – у.о.). Зміну експресії мікроРНК в певну кількість разів порівняно з контролем обчислювали за формулами $2^{-\Delta Ct}$. Результати обробляли в програмі Microsoft Excel і представляли у графічному вигляді.

Зв'язок експресії пухлино-асоційованих та циркулюючих мікроРНК з клініко-патологічними особливостями РМЗ хворих молодого віку

Проведено дослідження зв'язку експресії мікроРНК-21, -27a, -29b, -34a, -145 та -182 у тканині РМЗ та сироватці крові хворих віком до 44 років залежно від клініко-патологічних особливостей пухлинного процесу (Табл. 3).

Встановлено, що рівні пухлино-асоційованих мікроРНК-21, -29b та 182 були у 2,4 ($p<0,05$), 1,5 ($p<0,05$) та 3,8 ($p<0,05$) рази вищі у хворих на РМЗ з II стадію пухлинного процесу порівняно з III стадією, відповідно. У пухлинній тканині хворих на III стадію РМЗ рівень мікроРНК-27a був у 2,1 рази ($p<0,05$) більшим порівняно з аналогічним показником пацієнток з II стадією.

У хворих на РМЗ молодого віку із метастазами у регіонарні лімфатичні вузли експресія пухлино-асоційованих мікроРНК-27a, -34a та -182 була у 3,6 ($p<0,05$), у 3,0 ($p<0,05$) та 3,5 ($p<0,05$) разів нижчою, ніж у пацієнток, в яких вони були відсутні. Зростання експресії мікроРНК-29b у 1,3 рази зафіксовано у тканині РМЗ хворих молодого віку з наявністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів у порівнянні з пацієнтками без метастазів (Табл. 3). Коефіцієнти кореляції рівнів мікроРНК-27a, -29b, -34a та -182 з наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах становили відповідно: $r=-0,65$; $0,67$; $-0,53$ та $-0,59$.

При аналізі показників експресії циркулюючих мікроРНК залежно від клініко-патологічних особливостей пухлинного процесу з'ясовано, що збільшення стадії РМЗ асоціюється зі зниженням у 1,7 ($p<0,05$) рази експресії

Таблиця 3. Зв'язок показників експресії пухлино-асоційованих мікроРНК з клініко-патологічними особливостями РМЗ хворих молодого віку, у.о.

Клініко-патологічні показники		мікроРНК					
		21	27a	29b	34a	145	182
Репродуктивний статус	Менструальний цикл збережений	6,10 ± 0,33	1,27 ± 0,17	1,93 ± 0,26	6,33 ± 2,45	1,82 ± 2,71	1,38 ± 0,58
	Менопауза	5,34 ± 0,18	1,57 ± 0,21	0,92 ± 0,12	5,49 ± 2,20	1,60 ± 4,18	1,94 ± 0,36
Стадія	II	7,26 ± 1,15	0,85 ± 0,11	1,66 ± 0,22	6,54 ± 2,21	1,65 ± 5,76	1,97 ± 0,64
	III	3,00 ± 1,56*	0,46 ± 0,06*	2,28 ± 0,31*	7,23 ± 1,43	1,96 ± 3,66	0,51 ± 0,42*
Наявність метастазів у регіонарні лімфатичні вузли	N0	5,36 ± 0,72	2,51 ± 0,34	1,81 ± 0,24	8,12 ± 3,09	1,85 ± 3,11	1,10 ± 0,32
	N1-3	5,64 ± 0,76	0,82 ± 0,11*	2,70 ± 0,15*	2,32 ± 0,27*	1,58 ± 6,97	0,31 ± 0,04*
Гістологічний підтип	Протокова адено-карцинома	5,19 ± 0,70	1,75 ± 0,23	1,83 ± 0,25	6,93 ± 1,39	1,74 ± 5,72	1,30 ± 0,10
	Долькова адено-карцинома	5,14 ± 0,69	1,57 ± 0,61	0,92 ± 0,12	6,49 ± 2,20	1,60 ± 5,88	1,94 ± 0,36
Ступінь диференціювання	G1 (високий)	4,82 ± 0,65	2,40 ± 0,46	0,51 ± 0,07	5,14 ± 3,15	1,47 ± 5,63	1,44 ± 0,36
	G2 (помірний)	6,02 ± 0,81	2,04 ± 0,41	0,46 ± 0,06	6,78 ± 3,24	1,78 ± 4,41	1,67 ± 0,35
	G3 (низький)	5,57 ± 0,75	2,26 ± 0,97	1,77 ± 0,24	7,54 ± 1,21	1,54 ± 5,61	1,71 ± 0,72

Примітка: * - рівень значимості коефіцієнта кореляції $p < 0,05$

мікроРНК-182 у сироватці крові хворих (Табл. 4). На протилежність цьому, найвищу експресію мікроРНК-21, -27a, -29b та -34a зафіксовано за наявності III стадії РМЗ у хворих молодого віку порівняно з аналогічними показниками пацієнток з II стадією пухлинного процесу. Рівень експресії циркулюючих мікроРНК-34a та -145 був у 1,4 та 1,3 рази меншим у хворих на РМЗ молодого віку категорії N₀ порівняно з пацієнтками із метастазами у регіонарні лімфатичні вузли (Табл. 4). Аналіз експресії досліджених пухлино-асоційованих мікроРНК залежно

Таблиця 4. Зв'язок показників експресії циркулюючих мікроРНК з клініко-патологічними особливостями РМЗ хворих молодого віку, у.о.

Клініко-патологічні показники		мікроРНК					
		21	27a	29b	34a	145	182
Репродуктивний статус	Менструальний цикл збережений	1,94 ± 0,33	0,19 ± 0,03	2,82 ± 0,48	1,18 ± 0,20	19,34 ± 3,29	16,39 ± 2,79
	Менопауза	1,84 ± 0,31	0,17 ± 0,03	2,34 ± 0,40	1,21 ± 0,21	17,28 ± 2,94	13,45 ± 2,29
Стадія	II	1,35 ± 0,23	0,05 ± 0,01	3,60 ± 0,61	0,78 ± 0,13	16,56 ± 2,81	16,93 ± 2,88
	III	2,39 ± 0,41*	0,26 ± 0,04*	1,86 ± 0,32*	1,14 ± 0,19	19,66 ± 3,34	10,00 ± 1,70*
Наявність метастазів у регіонарні лімфатичні вузли	N0	1,79 ± 0,30	0,16 ± 0,03	2,67 ± 0,45	0,97 ± 0,16	15,20 ± 2,58	14,31 ± 2,43
	N1-3	1,51 ± 0,26	0,22 ± 0,04	2,14 ± 0,36	1,40 ± 0,24*	18,91 ± 3,21*	18,37 ± 3,12
Гістологічний підтип	Протокова адено-карцинома	1,76 ± 0,30	0,17 ± 0,03	2,57 ± 0,44	1,07 ± 0,18	17,58 ± 2,99	14,90 ± 2,53
	Долькова адено-карцинома	1,86 ± 0,32	0,17 ± 0,03	2,37 ± 0,40	1,23 ± 0,21	17,45 ± 2,97	13,58 ± 2,31
Ступінь диференціювання	G1 (високий)	2,01 ± 0,34	0,18 ± 0,03	2,27 ± 0,39	1,08 ± 0,18	18,13 ± 3,08	13,14 ± 2,23
	G2 (помірний)	1,89 ± 0,32	0,17 ± 0,03	2,41 ± 0,41	1,38 ± 0,23	17,61 ± 2,99	13,20 ± 2,24
	G3 (низький)	1,68 ± 0,29	0,15 ± 0,03	2,43 ± 0,41	1,22 ± 0,21	16,62 ± 2,83	14,41 ± 2,45

Примітка: * - рівень значимості коефіцієнта кореляції $p < 0,05$

від молекулярного підтипу РМЗ у хворих молодого віку дозволив встановити, що у зразках люмінального А підтипу експресія мікроРНК-182 була в 2,1 рази вищою, а рівні мікроРНК -21 і -27a – в 1,7 і 4,9 рази меншими порівняно із пухлинами люмінального Б підтипу (Табл. 5). Для обох люмінальних підтипів РМЗ у хворих молодого віку характерні висока експресія мікроРНК-182 (у 3,6 і 1,9 рази для люмінального А і Б підтипів, відповідно) і низький рівень мікроРНК -21 (в 1,3 і 2,2 рази для люмінального А і Б підтипів, відповідно) порівняно з тканиною

базального та Her2/neu – позитивного підтипу новоутворень (Табл. 4). У тканині базального підтипу РМЗ хворих молодого віку зафіксовано зниження експресії мікроРНК-29b (у 1,5 рази) та підвищення рівня мікроРНК-145 (у 1,4 рази) порівняно з люмінальним А молекулярним підтипом, а також низькими показниками мікроРНК-27a (у 4,6 рази) порівняно з люмінальним Б підтипом новоутворень (Табл. 5).

Таблиця 5. Зв'язок експресії пухлино-асоційованих та циркулюючих мікроРНК з молекулярним підтипом у хворих молодого віку, у.о.

	Молекулярний підтип			
	Люмінальний А	Люмінальний Б	Базальний	Her2/neu +
Пухлинна тканина				
мікроРНК-21	4,20±0,63	3,20±0,48[#]	7,03±1,06^{**}	6,33±0,95^{**}
мікроРНК-27a	0,38±0,06	1,85±0,28[#]	0,40±0,06[*]	0,36±0,05[*]
мікроРНК-29b	1,86±0,28	2,21±0,33	2,54±0,38^{**}	2,29±0,34^{**}
мікроРНК-34a	3,07±0,46	3,20±0,48	2,44±0,37	2,20±0,33
мікроРНК-145	1,96±0,29	1,66±0,25[#]	1,37±0,20[#]	1,23±0,18[#]
мікроРНК-182	0,98±0,15	0,47±0,07	0,25±0,04^{**}	0,22±0,03^{**}
Сироватка крові				
мікроРНК-21	2,19±0,33	1,79±0,27	1,06±0,16^{**}	0,96±0,14^{**}
мікроРНК-27a	0,25±0,04	0,12±0,02[#]	0,09±0,01^{**}	0,08±0,01^{**}
мікроРНК-29b	2,21±0,33	2,58±0,39[#]	2,49±0,37	2,24±0,34
мікроРНК-34a	1,96±0,29	0,96±0,14[#]	0,74±0,11^{**}	0,67±0,10^{**}
мікроРНК-145	19,59±2,94	16,62±2,49[#]	13,65±2,05[#]	12,29±1,84[#]
мікроРНК-182	12,96±1,94	12,21±1,83	18,07±2,71[#]	16,26±2,44[#]

Примітки: [#] p<0,05 порівняно з люмінальним А підтипом

^{**} p<0,05 порівняно з люмінальним А та Б підтипами

^{*} p<0,05 порівняно з люмінальним Б підтипом

Аналогічну тенденцію до зміни співвідношення пухлино-асоційованих мікроРНК зафіксовано при порівняльному аналізі зазначених показників у тканині Her2/neu – позитивного та люмінальних підтипів РМЗ у хворих молодого

віку.

У сироватці крові хворих на РМЗ люмінального Б підтипу показники експресії мікроРНК-27a, -29b та -34a були у 2; 1,3 та 2,3 рази вище, ніж у сироватці крові хворих із люмінальним А РМЗ (Табл. 5). У сироватці крові пацієнток із рецептор-негативними молекулярними підтипами РМЗ відзначено підвищення рівня мікроРНК-182 у порівнянні з показниками хворих на люмінальним А та Б молекулярні підтипи.

Експресія циркулюючих мікроРНК-21, -27a, -34a та -145 у хворих молодого віку із базальним та Her2/неу-позитивним РМЗ була у 2,0; 2,7; 2,7 та 1,4, рази нижче, ніж у пацієнток із люмінальним А підтипом новоутворень, а також перевищувала аналогічні показники (у 1,7; 1,3; 1,3, та 1,3 рази відповідно) у хворих з люмінальним Б підтипом РМЗ.

Отримані дані свідчать про зв'язок показників експресії дослідженої панелі пухлино-асоційованих та циркулюючих мікроРНК з такими клініко-патологічними характеристиками РМЗ у хворих молодого віку як стадія пухлинного процесу, наявність метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів та молекулярний підтип новоутворень.

Зв'язок експресії пухлино-асоційованих та циркулюючих мікроРНК з показниками виживаності хворих на РМЗ молодого віку

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії досліджених пухлино-асоційованих мікроРНК-21, -27a, -29b, -34a, -145 та -182 з такими показниками агресивності пухлинного процесу як стадія, наявність метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів та молекулярний підтип новоутворень, проаналізовано 3-річну безрецидивну виживаність хворих на РМЗ молодого віку з урахуванням показників експресії зазначених мікроРНК у пухлинних клітинах. Як видно з даних, наведених на Рис. 1, достовірне зниження показників 3-річної

безрецидивної виживаності на 22% встановлено у хворих на РМЗ молодого віку з профілем експресії мікроРНК-21<5,1 у.о., -27a >2,5 у.о., -29b>1,7 у.о., -34a<3 у.о., -145>1,69 у.о. та -182<1,0 у.о. у пухлинній тканині.

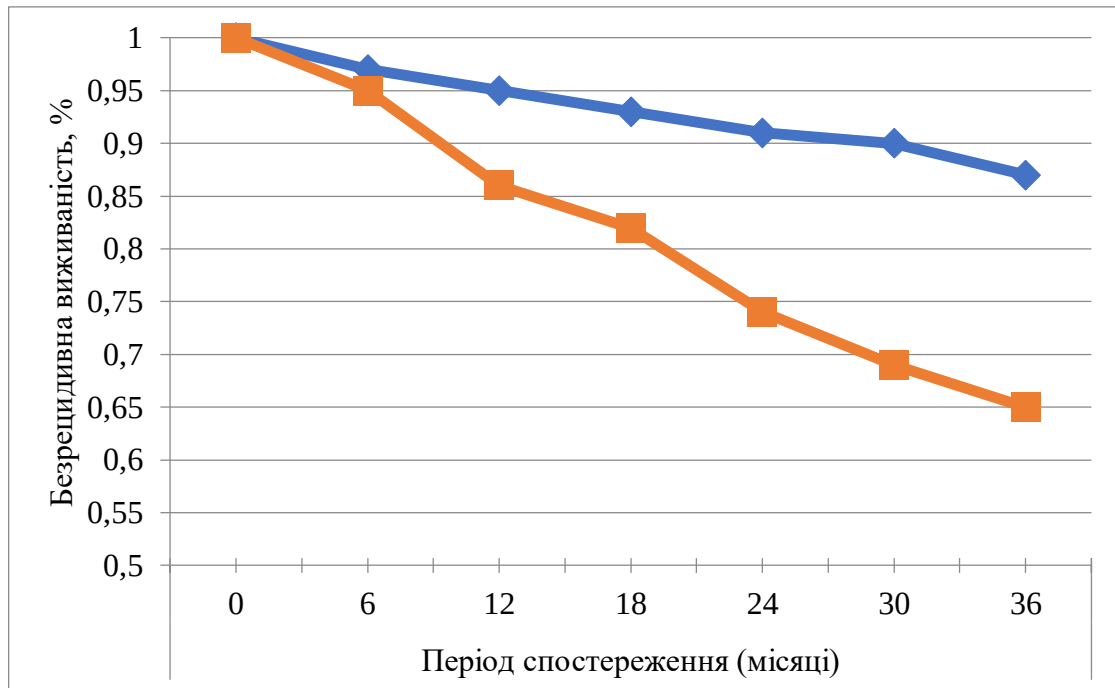


Рис. 1. Безрецидивна виживаність хворих на РМЗ молодого віку в залежності від профілю експресії пухлино-асоційованих мікроРНК

■ - мікроРНК-21>5,1 у.о., -27a <2,5 у.о., -29b<1,7 у.о., -34a>3 у.о., -145<1,69 у.о., -182>1,0 у.о.
■ - мікроРНК-21<5,1 у.о., -27a >2,5 у.о., -29b>1,7 у.о., -34a<3,0 у.о., 145>1,69 у.о., -182<1,0 у.о.

Певні відмінності виявлено і при дослідженні показників безрецидивної виживаності хворих на РМЗ молодого віку залежно від показників експресії циркулюючих мікроРНК. 3-річна безрецидивна виживаність за наявності експресії мікроРНК-21<14,5 у.о., -27a>1,6 у.о., -29b<2,5 у.о., -34a>1,0 у.о., -145>17,1 у.о. та -182>1,8 у.о. у сироватці крові була нижчою, ніж при показниках експресії мікроРНК-21>14,5 у.о., -27a<1,6 у.о., -29b>2,5 у.о., -34a<1,0 у.о., -145<17,1 у.о. та -182<1,8 у.о. (Рис. 2). Рецидиви захворювання у групі пацієнтів

із профілем експресії мікроРНК-21, -27a, -29b, -34a, -145 та -182 у сироватці крові на рівні <14,5 у.о., >1,6 у.о., <2,5 у.о., >1,0 у.о., >17,1 у.о. та >1,8 у.о. розвивалися у 1,7 разів частіше, ніж у хворих з експресією зазначених мікроРНК на рівні >14,5 у.о., <1,6 у.о., >2,5 у.о., <1,0 у.о., <17,1 у.о. та <1,8 у.о. відповідно.

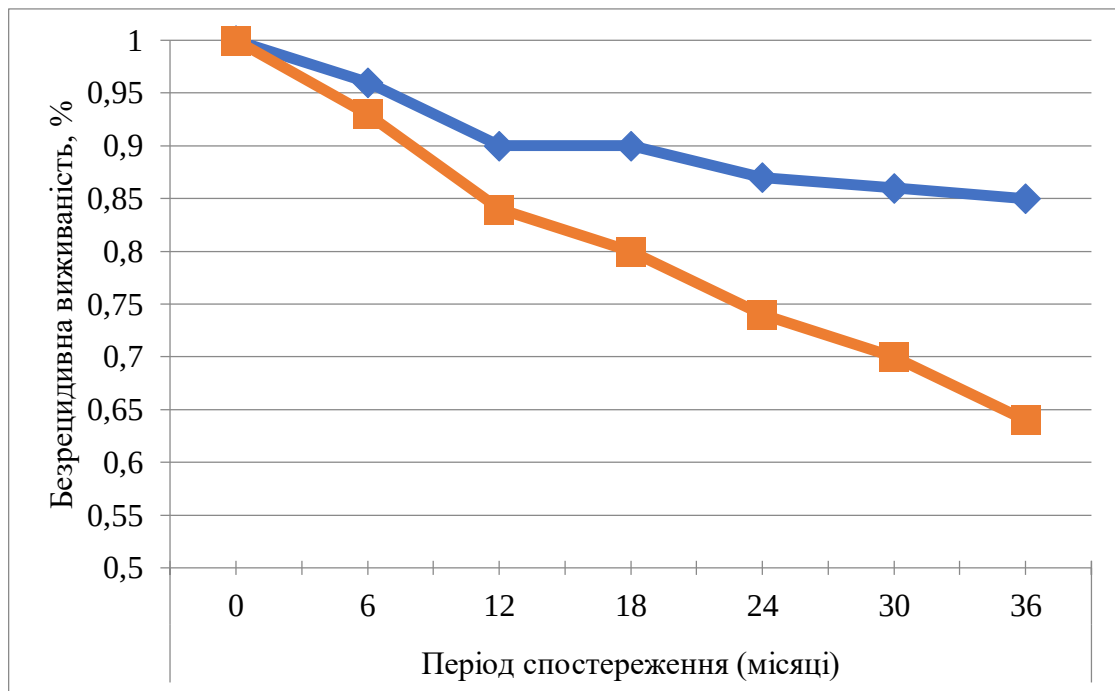


Рис. 2. Безрецидивна виживаність хворих на РМЗ молодого віку в залежності від профілю експресії циркулюючих мікроРНК

■ - мікроРНК-21>14,5 у.о., -27a<1,6 у.о., -29b>2,5 у.о., -34a<1,0 у.о., -145<17,1 у.о., та-182<1,8 у.о.
■ - мікроРНК-21<14,5 у.о., -27a>1,6 у.о., -29b<2,5 у.о., -34a>1,0 у.о., -145>17,1 у.о. та -182>1,8 у.о.

ВИСНОВКИ

1. Ідентифіковано панелі пухлино-асоційованих та циркулюючих мікроРНК, що дозволяють здійснювати високоспецифічне прогнозування РМЗ у хворих молодого віку і, таким чином, надають можливість проводити персоналізовану корекцію тактики лікування із урахуванням вікових особливостей та репродуктивного статусу пацієнток, що сприятиме покращенню ефективності терапії та зменшенню частоти ускладнень.

2. Доведено зв'язок експресії пухлино-асоційованих мікроРНК-21, -29b, -27a, -182 із стадією пухлинного процесу, а також встановлено кореляційну залежність рівня мікроРНК-27a, -29b, -34a та -182 з наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах у хворих на РМЗ молодого віку.

3. Встановлено, що низька експресія циркулюючих мікроРНК-21, -29b, -27a, -182 асоціюється зі зростанням стадії РМЗ у хворих молодого віку, а мікроРНК-34a та -145 – з наявністю метастазів у лімфатичних вузлах.

4. Ідентифіковано особливості експресії пухлино-асоційованих та циркулюючих мікроРНК при різних молекулярних підтипах РМЗ у хворих молодого віку. При базальному молекулярному підтипі РМЗ визначено високий рівень експресії пухлино-асоційованих мікроРНК-21 та -29b на тлі низького рівня експресії мікроРНК-27a, -145 та -182 порівняно з люмінальним А та люмінальним Б підтипами.

5. Доведена можливість використання показників експресії мікроРНК в якості фактора агресивності перебігу РМЗ у хворих молодого віку. Рецидиви захворювання в 3-річний термін спостерігались у пацієнтів з експресією циркулюючих мікроРНК-21<14,5 у.о., -27a>1,6 у.о., -29b<2,5 у.о., -34a>1,0 у.о., -145>17,1 у.о. та -182>1,8 у.о. Безрецидивна 3-річна виживаність хворих на РМЗ є достовірно більшою у пацієнтів з рівнями експресії пухлино-асоційованих мікроРНК-21>5,1 у.о., -27a <2,5 у.о., -29b<1,7 у.о., -34a>3 у.о., -145<1,69 у.о., та -182>1,0 у.о.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Abolghasemi, M., Tehrani, S. S., Yousefi, T., et al. (2020). MicroRNAs in breast cancer: Roles, functions, and mechanism of actions. *J Cell Physiol*, 235(6), 5008-5029. DOI: 10.1002/jcp.29396
2. Tsai, H. P., Huang, S. F., Li, C. F., et al. (2018). Differential microRNA expression in breast cancer with different onset age. *PLoS One*, 13(1), e0191195. DOI: 10.1371/journal.pone.0191195
3. Kudela, E., Samec, M., Kubatka, P., et al. (2019). Breast cancer in young women: status quo and advanced disease management by a predictive, preventive, and personalized approach. *Cancers*, 11(11), 1791. DOI: 10.3390/cancers11111791
4. Itani, M. M., Nassar, F. J., Tfayli, A. H., et al. (2021). A signature of four circulating microRNAs as potential biomarkers for diagnosing early-stage breast cancer. *Int J Mol Sci*, 22(11), 6121. DOI: 10.3390/ijms22116121
5. Chekhun, V., Martynyuk, O., Lukianova, Y., et al. (2023). Features of breast cancer in patients of young age: search for diagnosis optimization and personalized treatment. *Exp Oncol*, 45(2), 139-150. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.02.139>