

**Національна академія наук України  
Інститут експериментальної патології, онкології  
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького**

**“РОЗРОБКА ІННОВАЦІЙНИХ ПІДХОДІВ ДО ОЦІНКИ АГРЕСИВНОСТІ ЗЛОЯКІСНИХ  
НОВОУТВОРЕНЬ ЖІНОЧОЇ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ”**

к.б.н. Борікун Т.В.

к.б.н. Брєєва О.В.

**Київ 2021**

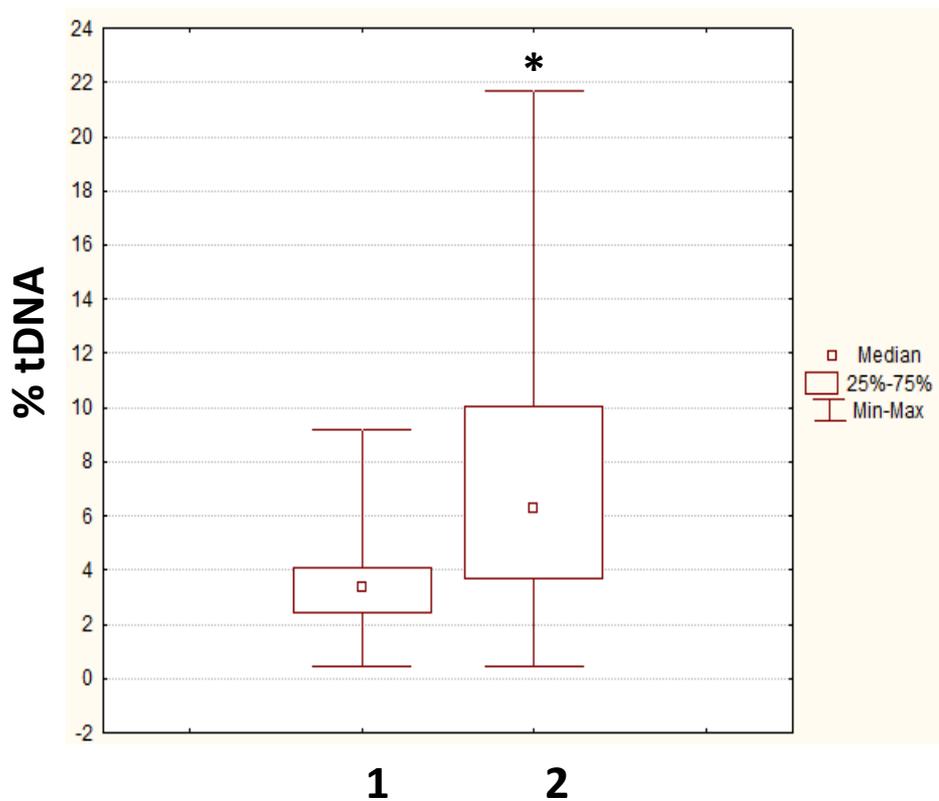
## МЕТА:

Визначити молекулярно-генетичні та епігенетичні порушень у пухлинних клітинах жіночої репродуктивної системи (рак молочної залози, рак ендометрію) та лімфоцитах периферичної крові хворих для обґрунтування доцільності їх використання в якості маркерів агресивності перебігу пухлинного процесу.

## ЗАВДАННЯ:

1. Визначити рівень спонтанних пошкоджень (одно- та двониткових розривів) ДНК, чутливість до генотоксичних впливів та ефективність репарації ДНК у ЛПК хворих на РЕ та зіставити їх з молекулярно-біологічними змінами у пухлинних клітинах, клініко-морфологічними характеристиками та особливостями сімейного анамнезу хворих на РЕ .
2. Оцінити стан системи місматч-репарації у карциномах ендометрію за експресією білків MSH2 та MLH1 у хворих на РЕ.
3. Дослідити копійність ключових онкогенів при РЕ та зв'язок їх експресії із агресивністю пухлинного процесу.
4. Оцінити експресію мікроРНК у пухлинній тканині РЕ та визначити їх зв'язок із агресивністю раку ендометрію.
5. Проаналізувати зв'язок показників експресії пухлинних мікроРНК із ступенем розповсюдженості РМЗ, рецепторним статусом (експресія рецепторів естрогену, прогестерону, HER-2/neu), проліферативною та інвазивною активністю пухлин, молекулярним підтипом новоутворень та показниками виживаності хворих.
6. Вивчити профіль експресії пухлинно-асоційованих мікроРНК у тканині РМЗ залежно від клінічного ефекту неоад'ювантної антрациклін-вмісної поліхіміотерапії.
7. Обґрунтувати значення показників експресії пухлинно-асоційованих мікроРНК та для оцінки агресивності клінічного перебігу РМЗ та РЕ.

# Рівень спонтанних пошкоджень ДНК у лімфоцитах периферичної крові (ЛПК) хворих рак ендометрію (РЕ) та здорових осіб

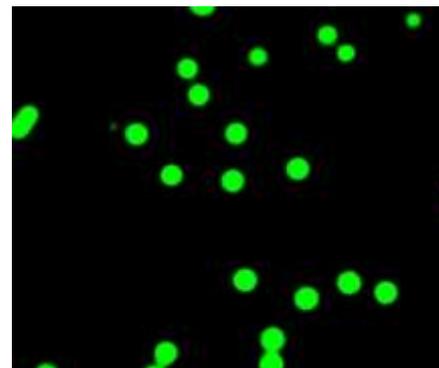


Рівень спонтанних пошкоджень ДНК у лімфоцитах:  
1 - здорових донорів;  
2 - хворих на РЕ.

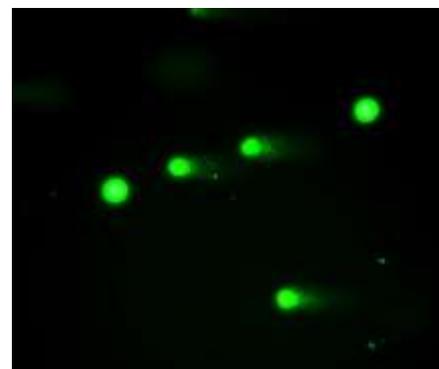
\* –  $p < 0,05$ .

Встановлено, що рівень спонтанних пошкоджень ДНК був у 2,2 рази вищим у лімфоцитах периферичної крові хворих на РЕ порівняно з лімфоцитами здорових осіб

А

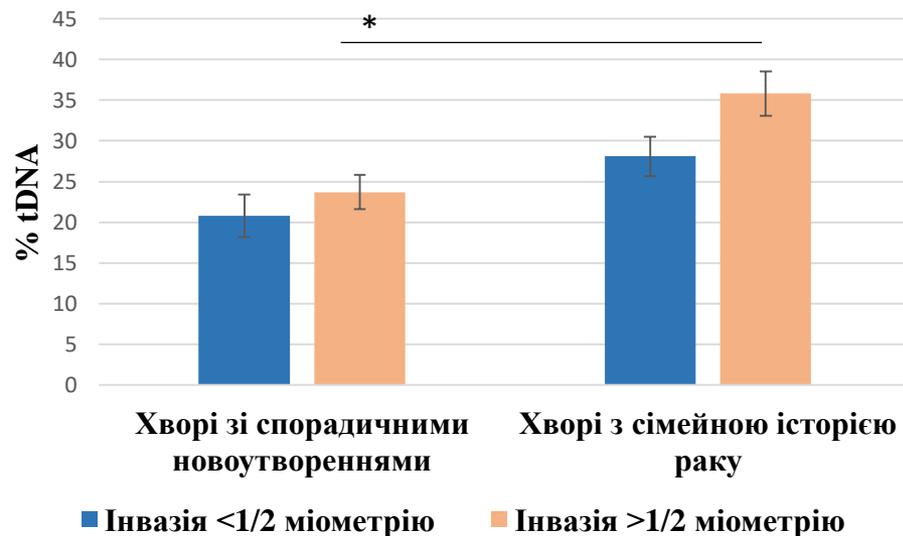
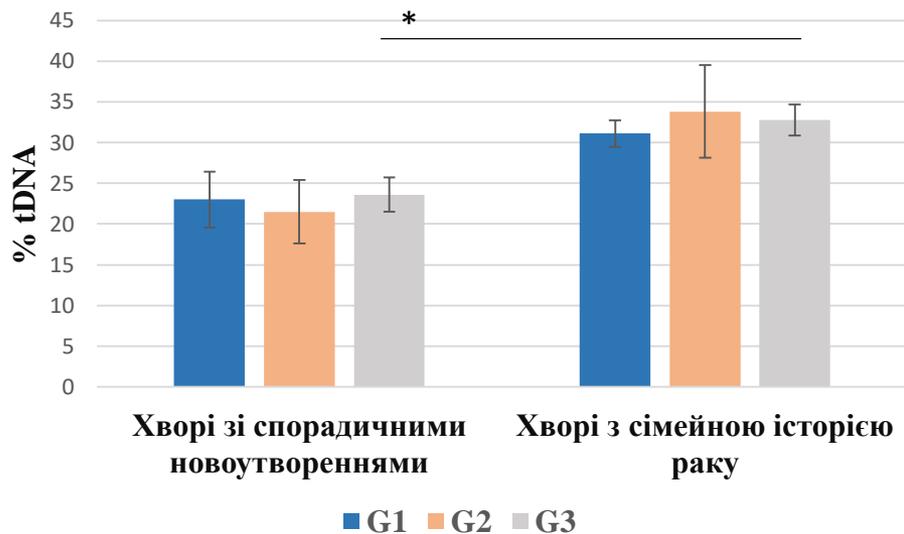


Б



Репрезентативні зображення комет, що були отримані з ЛПК здорових донорів (А) та хворих на РЕ (Б).

## Рівень спонтанних пошкоджень ДНК у пухлинних клітинах хворих раком ендометрію в залежності від наявності сімейної історії раку та показників прогресії пухлинного процесу

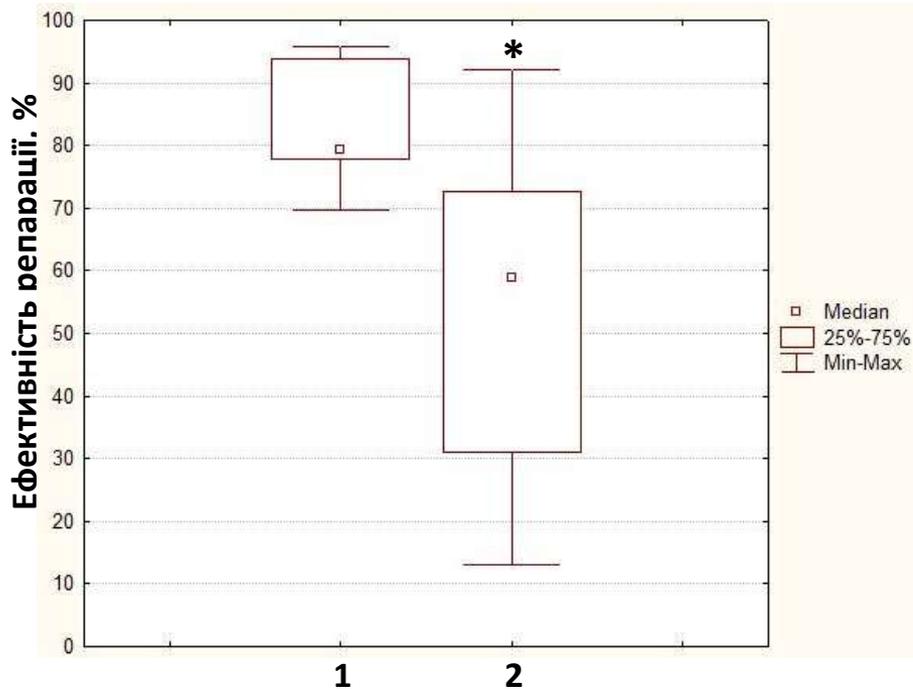


\* – p<0,05

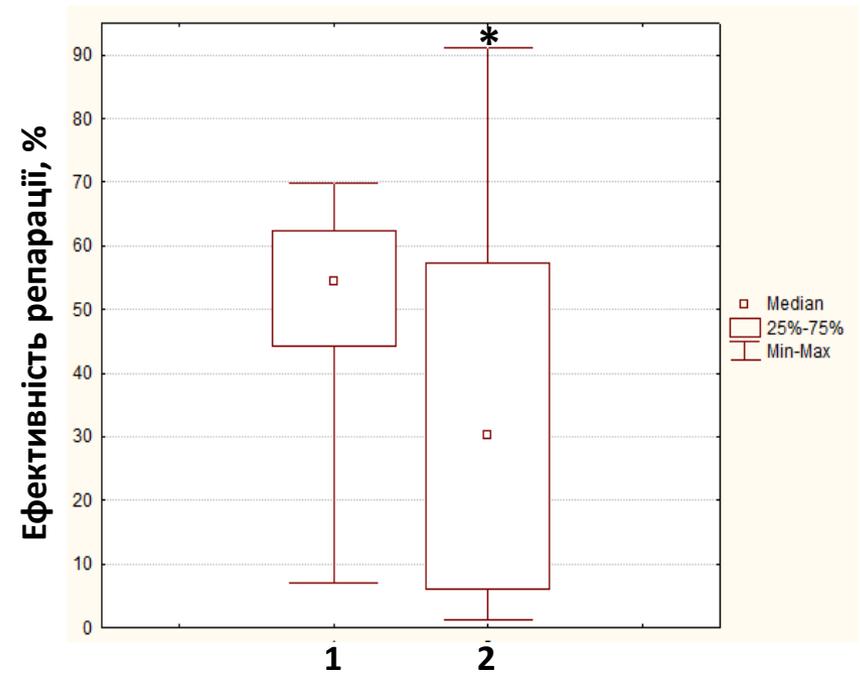
Встановлено, що у хворих на рак ендометрію з сімейною історією раку клітини низькодиференційованих карцином та карцином, що глибоко інвазували міометрій, характеризувались більш високим рівнем спонтанних пошкоджень ДНК, ніж клітини аналогічних спорадичних новоутворень.

# Ефективність репарації індукованих пошкоджень ДНК у лімфоцитах периферичної крові хворих та здорових осіб

Генотоксичний вплив: блеомцін



Генотоксичний вплив: 4-гідроксиестрадіол



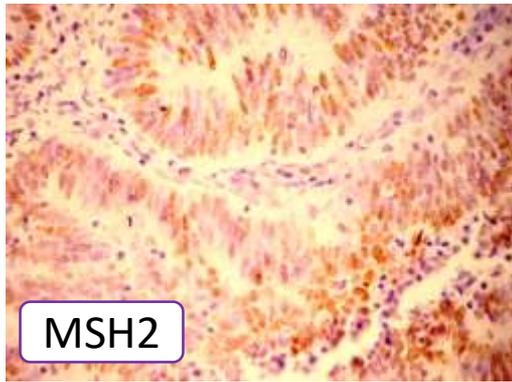
1 - лімфоцити здорових донорів;  
2 - лімфоцити хворих на РЕ.

\* –  $p < 0,05$ .

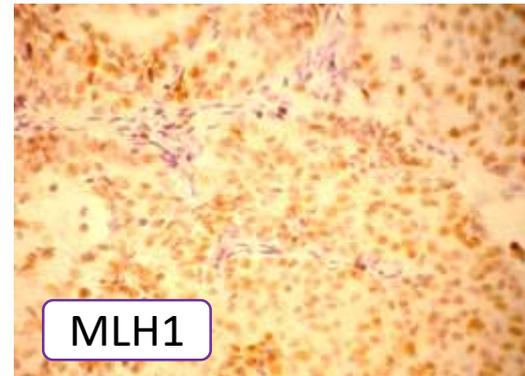
Встановлено знижену ефективність репарації індукованих пошкоджень ДНК у лімфоцитах периферичної крові хворих на РЕ. Отримані результати стали підґрунтям для подальших досліджень репарації ДНК у хворих на РЕ і пошуку асоціацій між змінами репараційної активності у ЛПК та пухлинних клітинах ендометрію.

# Оцінка стану систем місматч-репарації (MMR) у пухлинній тканині хворих на рак ендометрію

А



Б



Експресія білків місматч-репарації MSH2 та MLH1. Імуногістохімічний метод.  
А - помірно диференційована карцинома ендометрія, x400;  
Б - низькодиференційована карцинома ендометрія, x400.

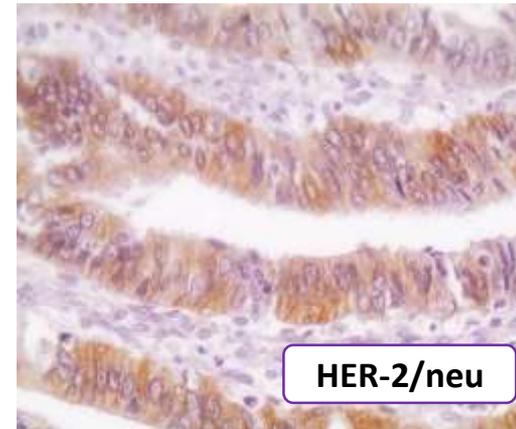
## Дослідження асоціації між параметрами нестабільності геному в ЛПК та станом системи MMR у пухлинних клітинах

Коефіцієнт рангової кореляції Спірмена між ефективністю репарації блеоміцин-індукованих пошкоджень ДНК у ЛПК хворих на РЕ та експресією MMR-білків у пухлині:

- MSH2:  $r=0,61$ ;  $p=0,03$ .
- MLH1:  $r=0,3$ ;  $p>0,05$ .

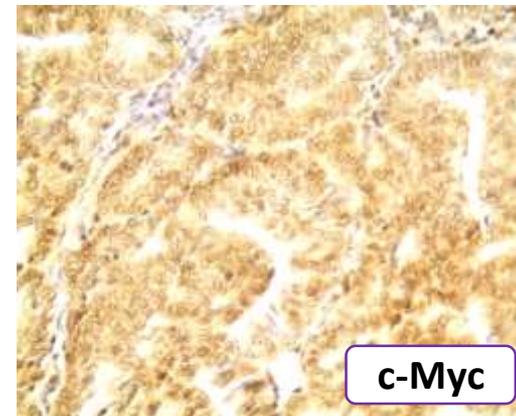
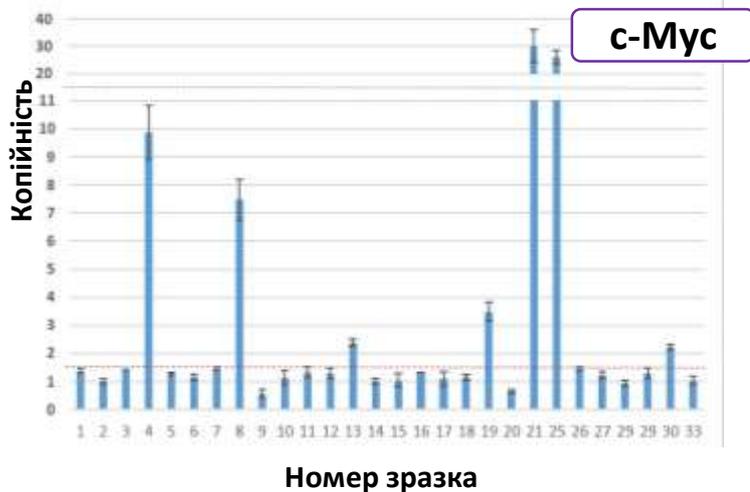
Визначена кореляція між ефективністю репарації в ЛПК і експресією MSH2 у пухлинних клітинах вказує на потенційну можливість їх використання в якості індикаторних клітин (сурогатних маркерів), що відображають молекулярно-генетичні зміни у пухлинній тканині.

# Аналіз копійності та експресії онкогенів *HER-2/neu* та *c-Myc* в карциномах ендометрію



Висока експресія білка *HER-2/neu* - 14,6% випадків.

Ампліфікація гена *HER-2/neu* - 18,8% випадків.

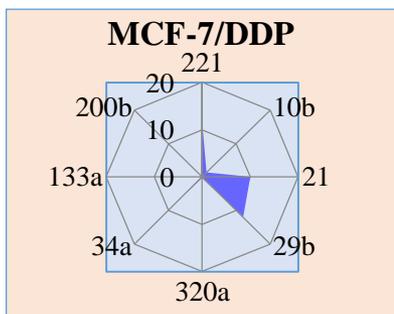
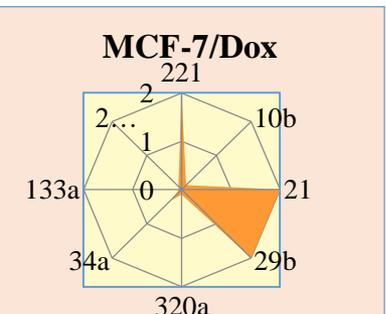
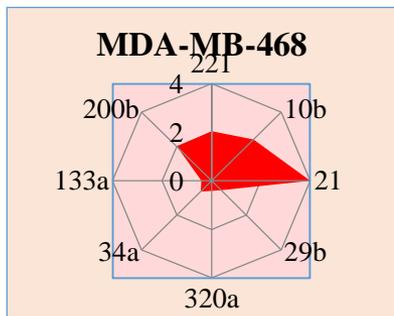
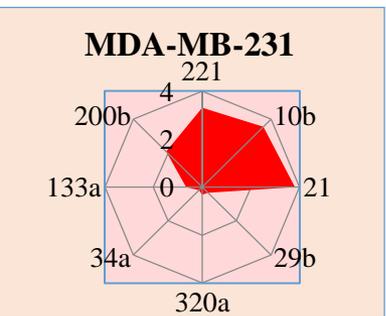
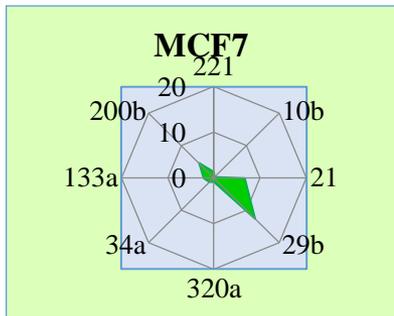
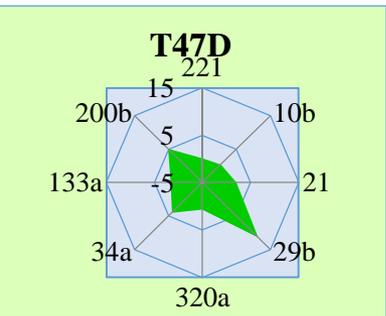


Висока експресія білка *c-Myc* - 23,5% випадків.

Ампліфікація гена *c-MYC* - 25,0% випадків.

Встановлено, що ампліфікація генів *HER-2/neu* та *c-MYC* і висока експресія їх білкових продуктів асоціюються з такими показниками агресивності пухлинного процесу як низький ступінь диференціювання та глибока інвазія пухлини у міометрій.

# Профіль експресії мікроРНК в клітинах РМЗ, у.о.



Молекулярно-біологічні особливості клітин ліній РМЗ	Коефіцієнт кореляції, r							
	МікроРНК							
	Онкогенні			Онкосупресорні				
	10b	21	221	34a	29b	133a	200b	320a
Ступінь злякисності	0,68*	0,50	0,72*	-0,68*	-0,84*	-0,65*	-0,76*	-0,59*
Резистентність до цисплатину	-0,49	0,81*	0,56*	0,49	0,48	-0,66*	-0,59*	-0,63*
Резистентність до доксорубіцину	0,51	0,68*	0,49	-0,65*	-0,51	-0,67*	-0,69*	-0,62*

*Примітка.* Показники мікроРНК-221 та мікроРНК-29b у клітинах MCF-7/DDP - 111,5 у.о. та 65,1 у.о. відповідно, у клітинах MCF-7/Dox - 82,46 у.о. та 165,0 у.о. відповідно, мікроРНК-21 у клітинах MCF-7/ Dox - 40,2 у.о.

Показано зв'язок профілів експресії мікроРНК із ступенем злякисності клітин РМЗ, а також із розвитком резистентності до протипухлинних препаратів

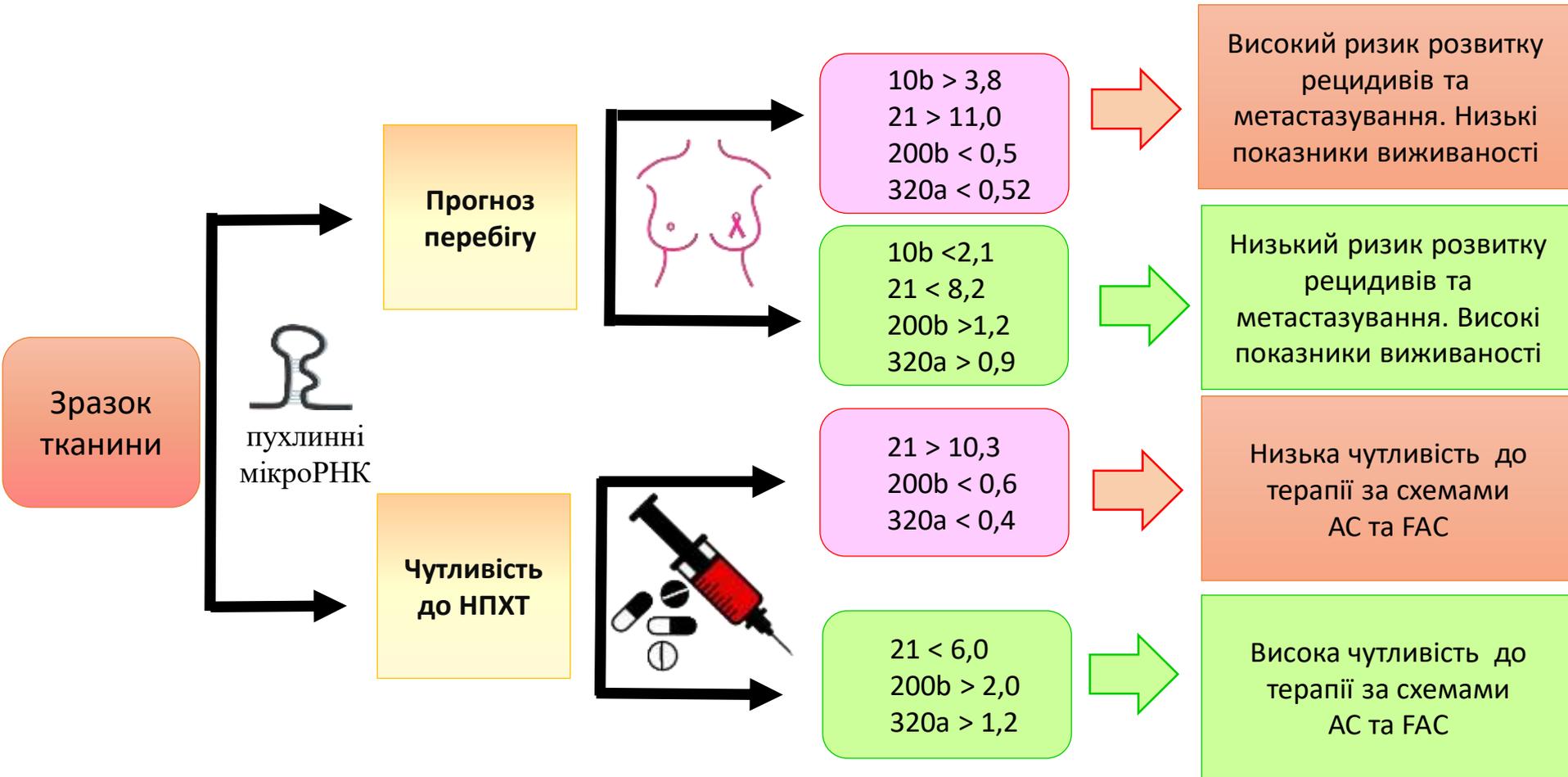
## Кореляційний аналіз між показниками пухлинно-асоційованих мікроРНК та клініко-морфологічними і молекулярно-біологічними характеристиками РМЗ

Характеристика	мікроРНК			
	Онкогенні		Онкосупресорні	
	10b	21	200b	320a
Стадія	0,47	0,56*	-0,67*	-0,69*
Метастази в РЛВ	0,65*	0,52	-0,67*	-0,63*
Ступінь диференціювання	-0,59*	0,51	0,53*	0,57*
Гістологічний тип	0,52	0,49	0,5	0,49
Проліферативна активність (Ki-67)	0,51	0,68*	-0,65*	-0,56*
Е-кадгерин	-0,56*	-0,59*	0,72*	0,67*
N- кадгерин	0,67*	0,63*	-0,69	0,59*
CD44	0,69*	0,61*	-0,58*	-0,73*

\*  $p < 0,05$

На клінічному матеріалі показано зв'язок рівнів мікроРНК із агресивністю перебігу РМЗ, і на основі отриманих даних сформовано прогностичний алгоритм (див. наступний слайд)

# Алгоритм прогнозування перебігу РМЗ та оцінки чутливості пухлин до антрациклін-вмісної терапії в неoad'ювантному режимі



## Висновки

1. Встановлено, що рівень спонтанних пошкоджень ДНК був у 2,2 рази вищим у ЛПК хворих на РЕ порівняно з лімфоцитами здорових осіб ( $8,3 \pm 0,7$  та  $3,7 \pm 0,4\%$  tDNA відповідно,  $p < 0,05$ ). У пухлинних клітинах ендометрію цей показник у середньому становив  $26,4 \pm 1,8\%$  tDNA. Визначено асоціацію рівня спонтанних пошкоджень ДНК з прогресією пухлинного процесу в ендометрії та особливостями сімейного анамнезу хворих. Зокрема встановлено, що у хворих на РЕ з сімейною історією раку клітини низькодиференційованих карцином та карцином, що глибоко інвазували міометрій, характеризувались більш високим рівнем спонтанних пошкоджень ДНК ( $32,8 \pm 0,9$  та  $35,8 \pm 3,7\%$  tDNA відповідно), ніж клітини аналогічних спорадичних новоутворень ( $23,6 \pm 2,0$  та  $20,8 \pm 2,6\%$  tDNA відповідно,  $p < 0,05$ ).

2. Встановлено, що експресія білка місматч-репарації MSH2 у пухлинах хворих на РЕ з високою ефективністю репарації блеоміцин-індукованих пошкоджень ДНК у ЛПК була достовірно більшою за цей показник у пацієнток із низькою ефективністю репарації у лімфоцитах. При аналізі експресії білка MLH1 виявлено подібну тенденцію до підвищення рівня експресії зі зростанням ефективності репарації ДНК у ЛПК. При визначенні коефіцієнта рангової кореляції Спірмена між ефективністю репарації блеоміцин-індукованих пошкоджень ДНК у ЛПК хворих на РЕ та експресією білка MSH2 у пухлині встановлено позитивний помірний зв'язок ( $r = 0,61$ ,  $p = 0,03$ ). Визначена нами кореляція між ефективністю репарації в ЛПК і експресією MSH2 у пухлинних клітинах відображає зв'язок репараційних процесів у ЛПК зі станом системи репарації у карциномах і є підставою потенційної можливості їх використання в якості індикаторних клітин (сурогатних маркерів) змін у пухлинній тканині.

3. Встановлено, що ампліфікація генів *HER-2/neu* та *c-MYC* і висока експресія їх білкових продуктів асоціювались з такими показниками агресивності пухлинного процесу як низький ступінь диференціювання та високий інвазивний потенціал РЕ. Так, кількість пухлин з ампліфікацією *HER-2/neu* у групі хворих з низькодиференційованими карциномами була вищою порівняно з аналогічним показником у групі пацієнток, що мали помірnodиференційовані пухлини. Крім того, серед низькодиференційованих карцином спостерігався більший відсоток випадків з високою експресією білка c-Myc. Визначено більшу частоту виявлення пухлин з високою експресією *HER-2/neu* у групі хворих, пухлини яких інвазували  $>1/2$  міометрію порівняно до групи пацієнток з інвазією  $<1/2$  міометрію.

## Висновки

4. Досліджено експресію мікроРНК-320a, -133a, -200b, -21, -221, -29b, -10b та -34a в клітинах РМЗ людини в залежності від ступеня злоякісності та чутливості до цитостатиків. Показано зв'язок профілів зазначених мікроРНК з молекулярно-біологічними характеристиками пухлинних клітин. Високі рівні експресії онкогенних мікроРНК-10b, -21, -221, та низькі рівні онкосупресорних мікроРНК-29b, -200b, -34a, -320a та -133a асоційовані з інвазивними, проліферативними властивостями клітин РМЗ, їх рецепторним статусом, та резистентністю до цитостатиків.

5. Показано, що у пухлинах ендометрію з високим індексом проліферації експресія мікроРНК-34a, -142 та -125b достовірно зменшувалась порівняно з цими показниками у карциномах з низькою проліферацією (у 1,8, 2,7 та у 1,5 рази, відповідно). Зниження експресії цих мікроРНК спостерігалось у низькодиференційованих пухлинах і таких, що глибоко інвазували міометрій, порівняно з помірnodиференційованими карциномами ендометрію та при інвазії <1/2 міометрію. Показано зниження експресії досліджуваних мікроРНК у пухлинах хворих з III стадією захворювання порівняно з експресією мікроРНК у хворих з I-II стадією. Необхідно зазначити, що низька експресія мікроРНК-125b та -101 асоціювалась із підвищеною щільністю мікросудин у карциномах ендометрію, а експресія мікроРНК-34a та -101 корелювала з наявністю ознак епітеліально-мезенхімального переходу.

6. В ході дослідження встановлено зв'язок експресії в пухлинній тканині мікроРНК-21 ( $r=0,56$ ), -200b ( $r=-0,67$ ), -122 ( $r=-0,659$ ) та -320a ( $r=-0,69$ ) із стадією пухлинного процесу та проліферативною активністю пухлинних клітин ( $r=0,68$ , -0,65 та -0,56 відповідно), мікроРНК-10b, -155, -200b, -122 та -320a з наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах ( $r=0,65$ , 0,68, -0,67, -0,67 та -0,63 відповідно) та ступенем диференціювання РМЗ ( $r=-0,59$ , 0,53, -0,57, 0,57 відповідно). Встановлено асоціативний зв'язок мікроРНК-10b, -21, -200b та -320a з адгезивними властивостями пухлин молочної залози.

Також нами виявлено особливості експресії мікроРНК-10b, -21, -200b, -122, -320a при різних молекулярних підтипах РМЗ ( $p<0,05$ ). При базальному молекулярному підтипі РМЗ відмічено високий рівень експресії мікроРНК-10b ( $5,95\pm 0,54$  у.о.) та -21 ( $12,40\pm 0,99$  у.о.) на фоні низького рівня експресії мікроРНК-200b ( $0,12\pm 0,05$  у.о.), -122 ( $0,058 \pm 0,005$ ) та -320a ( $0,60\pm 0,05$  у.о.) порівняно з люмінальним А та люмінальним Б підтипами.

## Висновки

7. Охарактеризовані особливості експресії мікроРНК у чутливих та резистентних варіантах РМЗ. Так, у більшості хворих з резистентними до терапії за схемами FAC та AC пухлинами показники експресії мікроРНК-21 були вище 10,3 у.о., а мікроРНК-200b та -320a - нижче 0,6 у.о. та 0,4 у.о. відповідно. У групі хворих із чутливими до НПХТ пухлинами показники експресії мікроРНК-21 були нижче 6,0 у.о., а рівень експресії мікроРНК-200b та -320a - вище за 2,0 та 1,2 у.о. відповідно.

8. Обґрунтовано можливість використання показників експресії мікроРНК- у пухлинних клітинах для прогнозування агресивності перебігу РМЗ, ризику розвитку рецидиву та в якості предиктивного маркера ефективності неоад'ювантного лікування.