

УДК 577.29

ЭКСПРЕССИЯ *MIR-181A* И *MIR-25* В СЫВОРОТКЕ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2023 г. А. И. Аутеншлюс^{1,2,*}, М. Л. Перепечаева^{1,2}, А. А. Студеникина^{1,2},
А. Ю. Гришанова², академик РАН В. В. Ляхович²

Поступило 25.04.2023 г.

После доработки 25.06.2023 г.

Принято к публикации 27.06.2023 г.

Циркулирующие *miR-181a* и *miR-25*, отражающие регуляцию экспрессии генов, вовлеченных в онкогенез, были изучены у пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ), доброкачественными заболеваниями молочной железы (ДЗМЖ) и у лиц без патологии молочной железы (контроль). Уровень экспрессии *miR-181a* оказался выше по сравнению с контролем в случае фиброаденомы и аденозы с низким, но не с высоким риском злокачественной трансформации, а также при люминальном HER2-негативном типе В (Lum В HER2-), HER2 позитивном типе (HER2+) и тройном негативном раке молочной железы (ТНРМЖ) по сравнению с контролем и с люминальным типом (Lum А) РМЖ. Уровень *miR-25* преобладал при Lum В HER2- в сравнении с контролем, Lum А и ТНРМЖ и при ТНРМЖ в сравнении с контролем и Lum А. Уровни экспрессии *miR-181a* и *miR-25* могут быть индикаторами вероятности малигнизации у пациентов с ДЗМЖ, а у пациентов с ИКНТ отражают разнонаправленные процессы в опухоли.

Ключевые слова: *miR-181a*, *miR-25*, биомаркеры, рак молочной железы, доброкачественные заболевания молочной железы

DOI: 10.31857/S2686738923600279, **EDN:** OYHGRJ

Одним из этиологических и патогенетических факторов ИКНТ является нарушение регуляции микроРНК (*miR*) [1], вовлеченных в клеточную пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз [2]. *MiR-181a* и *miR-25* известны как онкогенные *miR* и как супрессоры опухоли при разных типах рака [3], в том числе рака молочной железы (РМЖ) [1, 2] и в рамках одного подтипа РМЖ [4]. В тканях молочной железы (МЖ) мишенями *miR-181a* могут быть как мРНК, кодирующие антионкогенные белки — ММП-14, PHLDA1, BCRP, Bcl-2, так и проонкогенные — ATM, BAX, NDRG2 [2, 5].

MiR-181 усиливает метастатический потенциал клеток РМЖ, способствуя эпителиально-мезенхимальному переходу и формированию инвазивного фенотипа, а ее высокий уровень связан с

плохой выживаемостью пациентов [2]. Изменение уровня *miR-181a* в сыворотке может быть маркером, хотя данные о ее уровне в зависимости от статуса болезни противоречивы [2].

Экспрессия *miR-25* повышена в образцах РМЖ по сравнению с немалигнизированными тканями МЖ при агрессивных типах РМЖ — ТНРМЖ [6] и HER2+ [3]. *MiR-25* способствует пролиферации опухоли путем нацеливания на мРНК *BTG2* при ТНРМЖ, регулятора аутофагии *ULK1*, *NOX4* [7, 8], но сообщается и об ее связи с ингибированием роста опухоли [9].

Сверхэкспрессия *miR-25* показана в сыворотке пациенток с РМЖ [10], поэтому *miR-25* потенциально является биомаркером РМЖ. ДЗМЖ, в отличие от РМЖ, уделяется меньше внимания, хотя эти состояния могут повышать риск развития РМЖ [11, 12], и поиск биомаркеров их малигнизации актуален.

Целью работы было изучение экспрессии циркулирующих *miR-181a* и *miR-25* и степени их различий при патологиях МЖ, а также оценка их потенциальной пригодности как биомаркеров.

Материалом служили образцы сыворотки крови 74 пациентов, наблюдавшихся в городской больнице № 1 г. Новосибирска. К условно-здоро-

¹ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

²Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

*e-mail: lrciir@211.ru

Таблица 1. Основные клинико-патологические характеристики пациентов и распределение пациентов с ИКНТ на основе молекулярного подтипа опухоли

Количество пациентов	Диагноз, молекулярный подтип	ER	PR	HER2	Ki-67 (%)	Возраст
$n = 7$	Фиброаденома					36 (18–63)
$n = 7$	Аденоз (низкий риск)					66 (49–83)
$n = 2$	Аденоз (высокий риск)					40.5 (40–41)
$n = 15$	ИКНТ (Lum A)	+	+/-	–	<20%	58 (35–79)
$n = 11$	ИКНТ (Lum B HER2–)	+	+/-	–	≥20%	53 (23–69)
$n = 2$	ИКНТ (Lum B HER2+)	+	+/-	+	любое	57 (47–67)
$n = 5$	ИКНТ (HER2+)	–	–	+	любое	55 (40–69)
$n = 14$	ИКНТ (ТНРМЖ)	–	–	–	любое	56 (35–72)

вым отнесены 11 человек (Новосибирская городская станция переливания крови). У 47 пациентов была диагностирована ИКНТ (у 45 – стадия GII, у 2 – GI) и у 16 – ДЗМЖ (данные приведены в табл. 1). Больным проводилось операционное вмешательство, неоадьювантная терапия не проводилась.

Часто используют классификацию РМЖ, основанную на иммуногистохимической оценке биомаркеров – рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR), второго рецептора фактора роста эпидермиса (HER2) и Ki-67 [12, 13]. Согласно этому подходу, различают люминальный тип А (Lum A), люминальный HER2-позитивный тип В (Lum B HER2+), люминальный HER2-негативный тип В (Lum B HER2–), HER2 позитивный (HER2+) и ТНРМЖ [13].

Больных ДЗМЖ разделили на группы с низким и высоким риском злокачественной трансформации [14]. К первым отнесли больных непролиферативной формой фиброзно-кистозной болезни и фиброаденозом (группа “аденоз”), фиброаденомой; в группе высокого риска было два пациента: с пролиферативной формой фиброаденоза и склерозирующим аденозом.

MiR выделяли из 300 мкл сыворотки с помощью NucleoSpin miRNA Plasma Kit (Macherey-Nagel), обратную транскрипцию проводили с помощью miR-специфичных праймеров-адапторов и обратной транскриптазы M-MuLV-RN (Био-

лабмикс, Россия). Экспрессию miR оценивали с помощью цифровой капельной PCR и TaqMan зондов на оборудовании QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-rad Laboratories, США). Последовательности праймеров были следующими: *miR-181a*: прямой 5'-GCCGCAACATTCAAC-GCTGT-3', зонд 5'-(FAM)-TTCGCACTGGATAC-GACACTCACCG-(BHQ1)-3'; *miR-25*: прямой 5'-GCCGCCATTGCACTTGTCT-3', зонд 5'-(FAM)-TTCGCACTGGATACGACTCAGACCG-(BHQ1)-3'; U6: прямой 5'-GCCGCATACAGAGAAGATTA-3', зонд 5'-(FAM)-TTCGCACTGGATACGACGG-CCATGC-(BHQ1)-3'; обратный – 5'-AGTGCAG-GGTCCGAGGTA-3'. Внутренним стандартом служила малая ядерная РНК U6. Реакцию проводили дважды. Статистическую обработку проводили с использованием STATISTICA software и MS Excel. Для сравнения независимых групп использовали Н-критерий Краскела–Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью U-критерия Манна–Уитни.

В сыворотке больных агрессивными подтипами ИКНТ наблюдалась тенденция к более высокому уровню *miR-181a* и *miR-25*. Оценка с помощью критерия Краскела–Уоллиса показала достоверность различий ($p = 0.013$ для экспрессии *miR-181a* (рис. 1) и $p = 0.008$ для экспрессии *miR-25* (рис. 2)). Попарное сравнение в группах показало, что по сравнению с контролем экспрессия *miR-181a* повышена в группах Lum B HER2–,

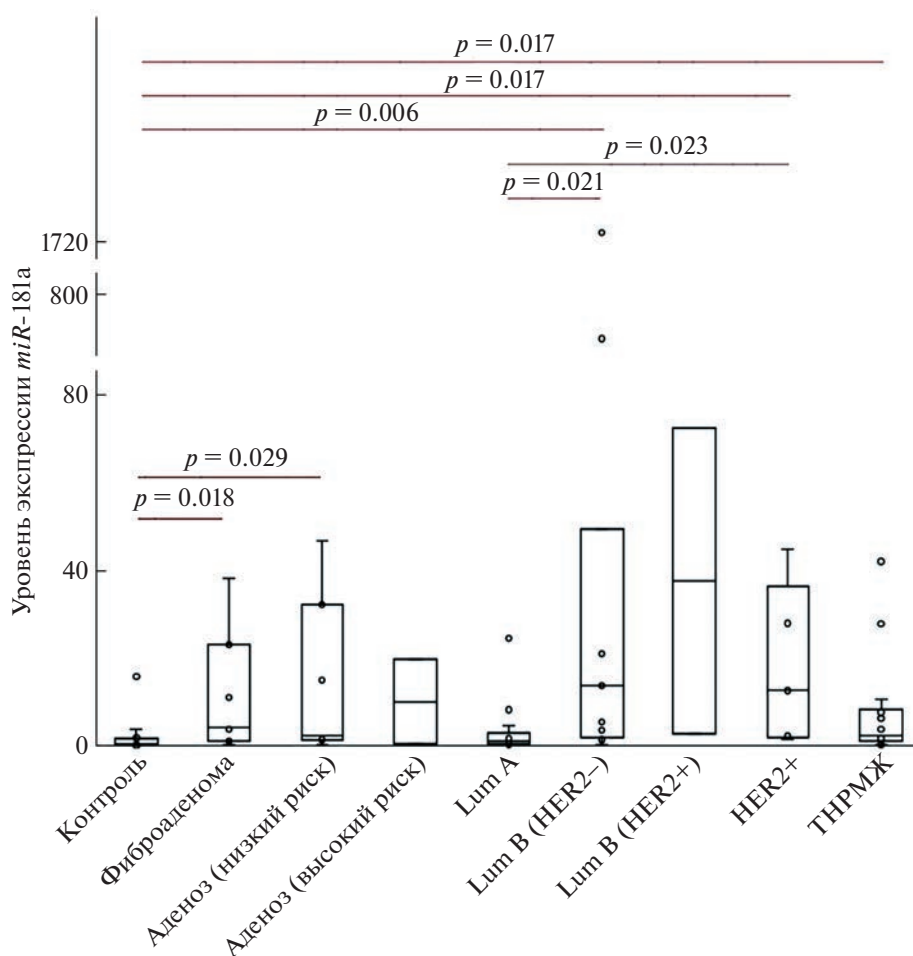


Рис. 1. Экспрессия *miR-181a* в сыворотке крови пациентов с ДЗМЖ и ИКНТ и контрольной группы.

HER2+ и ТНРМЖ (рис. 1), а *miR-25* – в группах Lum B HER2- и ТНРМЖ (рис. 2).

По сравнению с группой Lum A экспрессия *miR-181a* была повышена в группах Lum B HER2- и HER2+ (рис. 1), а экспрессия *miR-25* – в группах Lum B HER2- и ТНРМЖ (рис. 2). Уровень экспрессии *miR-25* был выше в группе Lum B HER2- по сравнению с ТНРМЖ ($p = 0.043$) (рис. 2).

Lum A – наиболее распространенный подтип РМЖ с относительно хорошим прогнозом. Уровень исследуемых *miR* в группе Lum A не отличался от таковых в контрольной группе и был самым низким среди всех групп пациентов.

Самый высокий уровень экспрессии *miR-181a* и *miR-25* наблюдался в группе Lum B HER2-ИКНТ. По сравнению с Lum A эти опухоли имеют более агрессивный фенотип и риск рецидива и худший прогноз. Фенотип Lum B имеет наибольший уровень метилирования генома опухоли среди всех подтипов РМЖ [15], при этом изменения эпигенома являются причиной дисрегуляции *miR*, и сами *miR* косвенно управляют модифика-

циями ДНК и гистонов. Можно предположить, что повышение уровня экспрессии *miR-181a* и *miR-25* может отражать процессы метилирования в клетках Lum B ИКНТ [16].

Экспрессия *miR-181a* была повышена в образцах HER2+ ИКНТ и на уровне тенденции – в образцах Lum B HER2+. Сообщалось, что *miR-181a* подавляет в клетках РМЖ ген ATM, нарушая ответ на повреждение ДНК [4]. С другой стороны, ATM может обладать опухолевым потенциалом при HER2+ РМЖ [17]. Наши данные не согласуются с данными об увеличении экспрессии *miR-25* в образцах HER2+ ИКНТ [3].

Экспрессия *miR-181a* в группе ТНРМЖ была повышена по сравнению с контролем, что может отражать проонкогенную либо антионкогенную повышенную передачу сигнала TGF- β – на ранней стадии прогрессирования рака TGF- β работает как супрессор опухоли, а на более поздней способствует онкогенезу [18, 19], либо изменения в работе других молекулярных путей.

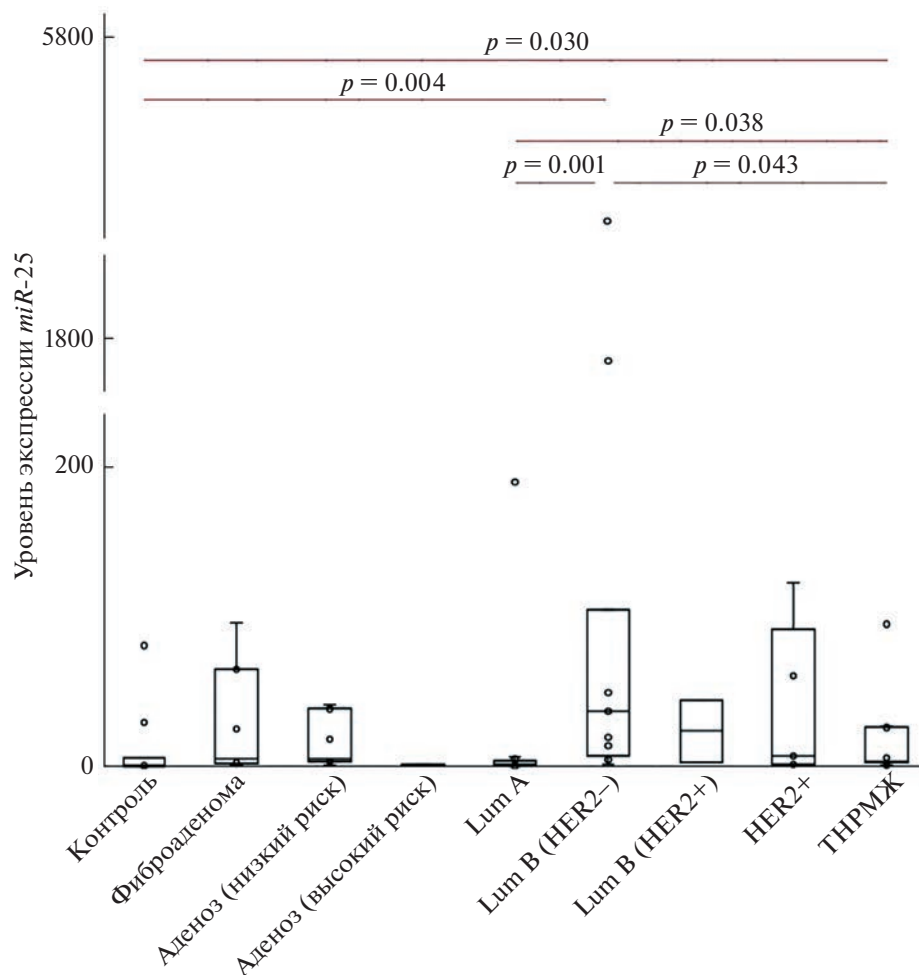


Рис. 2. Экспрессия *miR-25* в сыворотке крови пациентов с ДЗМЖ и ИКНТ и контрольной группы.

Наши данные согласуются с литературными в отношении экспрессии *miR-25*, которая высоко активна в ТНРМЖ [6] и подтверждают тезис, что при повышении *miR-181a* и *miR-25* нужно более тщательно подходить к выявлению возможных мутаций *BRCA1/2*, так как они идентифицированы в составе сигнатуры экспрессии из 6 *miR*, предсказывающей статус мутаций *BRCA1/2*, стандартный тест на которые может давать ложно отрицательный результат [20].

Экспрессия *miR-181a* оказалась повышена по сравнению с контролем в группе фиброаденомы и аденоза с низким риском злокачественной трансформации (рис. 1). С фиброзно-кистозными изменениями часто сочетается аденоз, а склерозирующий и апокринный аденоз связан с 1.5–2-кратным увеличением риска развития РМЖ [12]. При определенных гистопатологических и клинических обстоятельствах фиброзно-кистозная болезнь может быть связана с риском развития РМЖ до 50% [11]. Данных о том, какие типы рака чаще возникают при малигнизации ДЗМЖ,

очень мало. Известно, что микроглангулярный аденоз может быть предшественником ER-отрицательного рака [12]. Возможно, изменения уровня экспрессии *miR-181a* и *miR-25* могут быть использованы в комплексной диагностике и выявлении рисков малигнизации ДЗМЖ.

Полученные результаты показали повышенный уровень экспрессии *miR-181a* у пациентов с ДЗМЖ с низким [14] уровнем риска малигнизации. У пациентов с ИКНТ уровень экспрессии *miR-181a* и *miR-25* в целом был выше при более злокачественных подтипах ИКНТ (Lum B HER2- и ТНРМЖ), но в то же время, согласно данным литературы, уровень исследуемых *miR* может отражать как благоприятные, так и неблагоприятные процессы. *MiR-181a* и *miR-25* могут нацеливаться на несколько генов и одновременно влиять на несколько мишеней и процессов, в том числе разнонаправленно действующих в отношении прогрессии опухоли, поэтому их использование как маркеров представляется возможным только в рамках комплексной диагностики РМЖ.

Полученные данные представляют собой задел для разработки такой панели, в которую будут входить как *miR-181a* и *miR-25*, так и их гены-мишени.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование проведено за счет государственного задания Минздрава России (№ АААА-А18-118030790008-7); работа поддержана бюджетным финансированием (проект FGMU-2022-0004, регистрационный номер 1021050601082-2-1.6.4;3.1.6). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Протеомный анализ”, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 1964, в редакции 2013 г. с изменениями, внесенными на 64-й Генеральной Ассамблее ВМАЮ Форталеза, Бразилия, октябрь 2013. Все пациенты дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено комитетом по этике НИИМББ ФИЦ ФТМ (протокол № 17, 2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zhai Z., Mu T., Zhao L., Li Y., et al.* MiR-181a-5p facilitates proliferation, invasion, and glycolysis of breast cancer through NDRG2-mediated activation of PTEN/AKT pathway // *Bioengineered*. 2022. V. 13. № 1. P. 83–95.
2. *Yang C., Tabatabaei S.N., Ruan X., et al.* The Dual Regulatory Role of MiR-181a in Breast Cancer // *Cell Physiol Biochem*. 2017. V. 44. № 3. P. 843–856.
3. *Mahmoudian M., Razmara E., Mahmud Hussien B., et al.* Identification of a six-microRNA signature as a potential diagnostic biomarker in breast cancer tissues // *J Clin Lab Anal*. 2021. V. 35. № 11. P. e24010.
4. *Bisso A., Faleschini M., Zampa F., et al.* Oncogenic miR-181a/b affect the DNA damage response in aggressive breast cancer // *Cell Cycle*. 2013. V. 12. № 11. P. 1679–1687.
5. *Li Y., Kuscü C., Banach A., et al.* miR-181a-5p inhibits cancer cell migration and angiogenesis via downregulation of matrix metalloproteinase-14 // *Cancer Res*. 2015. V. 75. № 13. P. 2674–2685.
6. *Farazi T.A., Ten Hoeve J.J., Brown M., et al.* Identification of distinct miRNA target regulation between breast cancer molecular subtypes using AGO2-PAR-CLIP and patient datasets // *Genome Biol*. 2014. V. 15. № 1. P. R9.
7. *Wang L.J., Chiou J.T., Lee Y.C., et al.* Docetaxel-triggered SIRT2/NOX4/JNK/HuR signaling axis is associated with TNF-alpha-mediated apoptosis of cancer cells // *Biochem Pharmacol*. 2022. V. 195. P. 114865.
8. *Chen H., Pan H., Qian Y., et al.* MiR-25-3p promotes the proliferation of triple negative breast cancer by targeting BTG2 // *Mol Cancer*. 2018. V. 17. № 1. P. 4.
9. *Yao J., Li G., Liu M., et al.* IncMICAL21 sponges miR25 to regulate DKK3 expression and inhibits activation of the Wnt/betacatenin signaling pathway in breast cancer // *Int J Mol Med*. 2022. V. 49. № 2.
10. *Hu Z.B., Dong J., Wang L.E., et al.* Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls // *Carcinogenesis*. 2012. V. 33. № 4. P. 828–834.
11. *Malherbe K., Khan M., Fatima S.* Fibrocystic Breast Disease. Treasure Island (FL):StatPearls Publishing; 2022.
12. WHO Classification of Tumours Editorial Board, editors. Breast tumours. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019.
13. *Erber R., Angeloni M., Stohr R., et al.* Molecular Subtyping of Invasive Breast Cancer Using a PAM50-Based Multigene Expression Test-Comparison with Molecular-Like Subtyping by Tumor Grade/Immunohistochemistry and Influence on Oncologist's Decision on Systemic Therapy in a Real-World Setting // *Int J Mol Sci*. 2022. V. 23. № 15.
14. *Zendehdel M., Niakan B., Keshtkar A., et al.* Subtypes of Benign Breast Disease as a Risk Factor for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis Protocol // *Iran J Med Sci*. 2018. V. 43. № 1. P. 1–8.
15. *Holm K., Hegardt C., Staaf J., et al.* Ringner M. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns // *Breast Cancer Res*. 2010. V. 12. № 3. P. R36.
16. *Humphries B., Wang Z., Yang C.* MicroRNA Regulation of Epigenetic Modifiers in Breast Cancer // *Cancers (Basel)*. 2019. V. 11. № 7.
17. *Stagni V., Manni I., Oropallo V., et al.* ATM kinase sustains HER2 tumorigenicity in breast cancer // *Nat Commun*. 2015. V. 6. P. 6886.
18. *Taylor M.A., Sossey-Alaoui K., Thompson C.L., et al.* TGF-beta upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis // *Journal of Clinical Investigation*. 2013. V. 123. № 1. P. 150–163.
19. *Vishnubalaji R., Alajez N.M.* Epigenetic regulation of triple negative breast cancer (TNBC) by TGF-beta signaling // *Sci Rep*. 2021. V. 11. № 1. P. 15410.
20. *Tanic M., Yanowski K., Gomez-Lopez G., et al.* MicroRNA expression signatures for the prediction of BRCA1/2 mutation-associated hereditary breast cancer in paraffin-embedded formalin-fixed breast tumors // *Int J Cancer*. 2015. V. 136. № 3. P. 593–602.

SERUM MIR-181A AND MIR-25 LEVELS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER OR A BENIGN BREAST DISEASE

A. I. Autenshlyus^{a,b,#}, M. L. Perepechaeva^{a,b}, A. A. Studenikina^{a,b},
A. Y. Grishanova^b, and Academician of the RAS V. V. Lyakhovich^b

^a*Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk Russian Federation*

^b*Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: lpciip@211.ru*

Circulating *miR-181a* and *miR-25*, which reflect regulation of the expression of carcinogenesis-related genes, were assayed in patients with invasive carcinoma of no specific type (ICNT) or benign diseases of the breast (BDBs) and in people without pathologies of the mammary gland (controls). *MiR-181a* expression level proved to be higher compared to control in patients with fibroadenoma and adenosis with low but not high risk of malignant transformation as well as in patients with luminal HER2-negative type B (Lum B HER2[−]), HER2-positive type (HER2⁺) and triple-negative breast cancer (TNBC) than in the controls and luminal-type (Lum A) breast cancer. *MiR-25* expression level prevailed in patients with Lum B HER2[−] compared to control, Lum A and TNBC; in patients with TNBC compared to Lum A. Thus, *MiR-181a* and *miR-25* expression levels may be risk indicators of malignant transformation in some patients with BDBs, whereas in patients with ICNT, these levels reflect pathological processes of different directions within the tumor.

Keywords: *miR-181a*, *miR-25*, biomarkers, breast cancer, benign breast disease