

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

МикроРНК miR-181a И miR-25 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.Л. Перепечаева^{1,2}, А.А. Студеникина^{1,2}, А.Ю. Гришанова², А.Н. Глушков³,
Е.Г. Поленок³, П.В. Байрамов⁴, А.И. Аутенилюс^{1,2}*

¹Новосибирский государственный медицинский университет,
630091, Новосибирск, Красный пр-т, 52; *эл. почта: mlperepchaeva@frcftm.ru

²Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики
Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины,
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

³Институт экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН,
650065, Кемерово, Ленинградский пр-т, 10

⁴Кузбасский клинический онкологический диспансер им. М.С. Раппопорта,
650036, Кемерово, ул. Волгоградская, 35

Опухолевые заболевания молочной железы включают широкий спектр патологий, требующих разных подходов к лечению. Уровни микроРНК (miR), отражающие регуляцию экспрессии генов, вовлечённых в онкогенез, могут быть диагностическими и прогностическими маркерами заболеваний молочной железы. Измеряли уровень циркулирующих miR-181a и miR-25 у пациентов с доброкачественными заболеваниями молочной железы (ДЗМЖ), а также инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ) и у условно-здоровых лиц. Экспрессия обеих miR была выше у пациентов обеих групп по сравнению с контролем; при этом содержание miR-181a и miR-25 в сыворотке крови пациентов с ДЗМЖ было выше, чем у пациентов с ИКНТ. Обнаруженные изменения могут представлять интерес в контексте предраковых изменений при ДЗМЖ. Представляется возможным их использование в будущем в качестве маркеров патологического процесса в рамках большой диагностической панели.

Ключевые слова: miR-181a; miR-25; рак молочной железы; доброкачественные заболевания молочной железы

DOI: 10.18097/PBMC20236905307

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) — самый распространённый рак у женщин и основная причина онкологической смертности. Самым распространённым гистологическим подтипом РМЖ является инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа (ИКНТ). За этим диагнозом скрывается широкий спектр подтипов злокачественных эпителиальных новообразований, различных по морфологии, клинической картине и прогнозу и требующих выбора разного, часто персонализированного лечения [1, 2].

Этиология и патогенез ИКНТ могут быть связаны с нарушением регуляции микроРНК (miR) [3], которые на посттранскрипционном уровне подавляют свои гены-мишени, многие из которых вовлечены в клеточную пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз [3, 4]. Предполагается, что профилирование экспрессии miR позволит использовать их в качестве биомаркеров для диагностики, мониторинга ответа на лечения и прогноза заболевания [5]. miR-181a — одна из распространённых экзосомальных miR крови человека [6]. Действуя на разные гены-мишени, она может оказывать как проонкогенные [3, 4, 7], так и антионкогенные эффекты [4, 8–10] в ткани молочной железы. Несмотря на то, что данные об уровне miR-181a в сыворотке в зависимости от статуса болезни противоречивы [11, 12], изменение её уровня в сыворотке потенциально

может служить диагностическим маркером [4]. miR-25 в основном известна как проонкоген [13]. Есть данные, что miR-25 способствует пролиферации опухоли [14], участвует в процессах аутофагии [15] и в TNF- α -зависимой гибели клеток [16]. Сообщается о связи повышенного уровня miR-25 с лучшей выживаемостью при РМЖ [17], а также об ингибировании роста опухоли за счёт участия miR-25 в регуляции сигнального пути Wnt [18].

Несмотря на распространённость доброкачественных заболеваний молочной железы (ДЗМЖ), основное внимание уделяется диагностике и лечению РМЖ [19]. Между тем, ДЗМЖ могут повышать риск развития РМЖ [20]. Например, сложная киста и сложное солидно-кистозное образование молочной железы имеют большое разнообразие патологических типов и в 23–31% случаев могут быть злокачественными [21]. Аденоз часто сочетается с фиброзно-кистозными изменениями, а склерозирующий и апокринный аденоз связан с 1,5–2-кратным увеличением риска развития РМЖ [2]. Связь между фиброзно-кистозными изменениями и РМЖ сложна и противоречива, и разработка методов диагностики и лечения этой патологии молочной железы имеет большое значение. Учитывая всё вышеперечисленное, анализ уровня циркулирующих miR-181a и miR-25 при разных типах заболеваний молочной железы может дать понимание об их возможном применении в качестве диагностических маркеров.

Целью работы было определение уровней miR-181a и miR-25 в сыворотке пациентов с ДЗМЖ, пациентов с ИКНТ с лимфогенным метастазированием и без него и у условно-здоровых лиц, а также изучение степени различий при патологии молочной железы и оценка потенциальной пригодности как биомаркеров.

МЕТОДИКА

Объект исследования

Исследование было проведено в образцах сыворотки периферической крови 68 женщин, из которых 11 (средний возраст 46 лет — от 25 лет до 60 лет) составили контрольную группу условно-здоровых лиц (без патологии молочной железы и обострения инфекционно-воспалительных заболеваний) (Новосибирская городская станция переливания крови). Остальные были пациентами областного онкологического диспансера г. Кемерово, среди которых у 16 (средний возраст 49 лет — от 35 лет до 67 лет) были диагностированы ДЗМЖ, у 41 (средний возраст 64 года — от 33 лет до 80 лет) — ИКНТ. Неоадьювантная терапия больным ИКНТ не проводилась. Клинико-морфологическая характеристика опухолей приведена в таблице 1.

Анализ miR

miR выделяли из 300 мкл сыворотки крови с помощью NucleoSpin miRNA Plasma Kit (“Macherey-Nagel”, Германия), следуя инструкции производителя. Концентрацию miRNA измеряли спектрофотометрически. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали miR-специфичные праймеры-адаптеры шпильковидной конструкции и обратную транскриптазу M-MuLV-RH (“Биолабмикс”, Россия). Реакцию проводили согласно инструкции производителя; добавляли 25 единиц активности (е.а.) ингибитора РНКаз, 8 пкмоль праймера-адаптера, 1 нг выделенной РНК. Смесь инкубировали при 18°C 30 мин, затем при 42°C 30 мин и при 85°C 5 мин. Последовательности праймеров-адаптеров представлены в таблице 2.

Уровни miR оценивали с использованием Droplet digital PCR и TaqMan зондов (“Bio-rad”, США) на оборудовании QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System (“Bio-rad”). Для генерации капель в конечном объеме 20 мкл реакционной смеси использовали двукратный супермикс ddPCR для зондов (“Bio-Rad”), 7 мкл образца кДНК и 3 мкл праймеров. Генерацию капель производили с помощью автоматического генератора капель QX200 (“Bio-Rad”) и одноразовых картриджей (“Bio-Rad”).

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика опухолей

Параметр	Значение
ИКНТ, n=41	
Размер опухоли, см	1,8 (0,5–5,5)
Степень вовлечённости лимфатических узлов, N	0 (29; 71%) 1 (8; 20%) 2 (1; 2%) 3 (3; 7%)
Подтипы	Люминальный А (9; 23%) Люминальный В, HER2 негативный (26; 63%) Люминальный В, HER2 позитивный (3; 7%) Нелюминальный, HER2 позитивный (1; 2%) Тройной негативный (2; 5%)
Степень дифференцировки, G	1 (2; 5%) 2 (39; 95%)
Стадия рака	I (26; 63%) II (15; 37%)
Эстрогеновые рецепторы	есть (38; 93%) нет (3; 7%)
Прогестероновые рецепторы	есть (38; 93%) нет (3; 7%)
Рецептор эпидермального фактора роста 2 (HER2)	есть (3; 7%) нет (38; 93%)
Уровень Ki-67	33,9 (5–86)
ДЗМЖ, n=16	
Диагнозы пациентов с ДЗМЖ	Фиброаденома (2; 12,5%) Фиброзно-кистозная болезнь (2; 12,5%) Фиброаденоматоз (10; 62,5%) Склерозирующий аденоз (2; 12,5%)

Примечание. Описание распространённости категориальных клинико-морфологических параметров дано в формате (N; P), где N – число пациентов, имеющих заданное категориальное значение параметра, P – процентная доля числа пациентов с заданным категориальным значением параметра относительно всей выборки.

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов для проведения ОТ-ПЦР

miR	Тип	Последовательность (5'→3')
miR-181a-5p	Адаптер	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACTCACCG
	Прямой	GCCGCAACATTCAACGCTGT
	Зонд	(FAM)-TTCGCACTGGATACGACACTCACCG-(BHQ1)
miR-25-3p	Адаптер	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGACCG
	Прямой	GCCGCCATTGCACTTGTCT
	Зонд	(FAM)-TTCGCACTGGATACGACTCAGACCG-(BHQ1)
RNU6-1	Адаптер	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCCATGC
	Прямой	GCCGCATACAGAGAAGATTA
	Зонд	(FAM)-TTCGCACTGGATACGACGGCCATGC-(BHQ1)
Обратный (общий)		AGTGCAGGGTCCGAGGTA

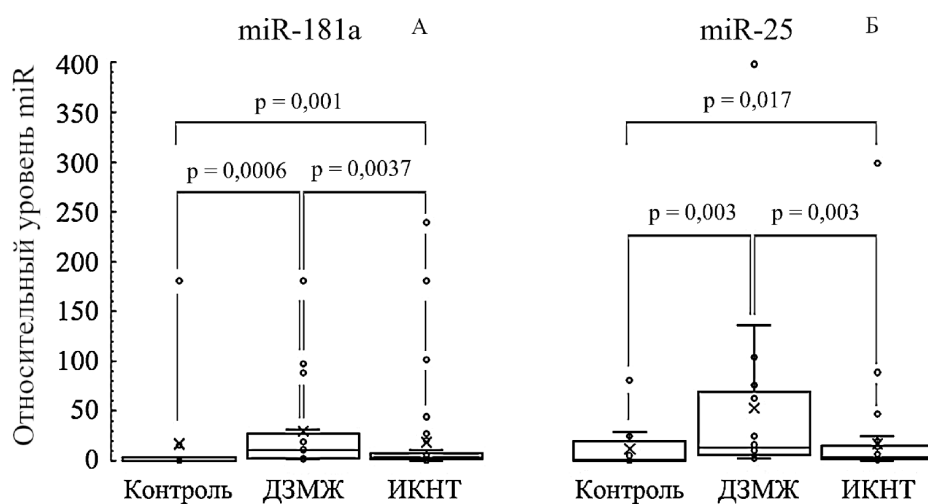


Рисунок 1. Экспрессия miR-181a (А) и miR-25 (Б) в сыворотке крови контрольной группы и пациентов с ДЗМЖ и ИКНТ. Данные нормализованы на уровень экспрессии RNU6-1.

Условия термоциклирования были следующими: 95°C в течение 10 мин, 39 циклов при 95°C в течение 30 с, 55°C в течение 1 мин и последний этап — при 98°C в течение 10 мин. После окончания ПЦР капли считывали в ридере QX200 и анализировали с использованием программного обеспечения Quantasoft™ (“Bio-Rad”), которое измеряет количество положительных и отрицательных капель для каждого флуорофора в каждом образце и применяет к доле положительных капель алгоритм Пуассона для определения начальной концентрации целевых молекул в единицах “копии мишени на микролитр” (“копий/мкл”). В каждый анализ был включён контроль без матрицы. Данные нормализовали на уровень экспрессии малой ядерной РНК U6, которая служила внутренним стандартом. В статистическом анализе использовали значения относительного уровня — miR-181a/RNU6-1 и miR-25/RNU6-1. Реакцию проводили дважды.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета STATISTICA software, SPSS v. 22.0 for Windows, и MS Excel. Характер распределения данных определяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой

Лиллифорса. Для сравнения независимых групп использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью U-критерия Манна-Уитни. Оптимальное значение точки отсечения экспрессии miR-181a и miR-25 было проведено с помощью анализа Receiver Operating Characteristic (ROC).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было проведено сравнение уровней экспрессии циркулирующих miR-181a и miR-25 в сыворотке крови пациентов с ДЗМЖ, ИКНТ и у условно-здоровых лиц, а также проведён анализ ROC-кривых для оценки качества полученных данных и установления пороговых значений экспрессии микроРНК, определяющих наличие или отсутствие патологии.

Оценка с помощью критерия Краскела-Уоллиса показала достоверность различий экспрессии miR-181a ($p=0,0002$) и экспрессии miR-25 ($p=0,0005$). На рисунке 1 показана достоверность различий между группами, полученная с помощью U-критерия Манна-Уитни. Попарное сравнение показало, что по сравнению с контрольной группой уровень экспрессии miR-181a (рис. 1А) и miR-25 (рис. 1Б) повышен при ДЗМЖ и ИКНТ, а также повышен при ДЗМЖ по сравнению с ИКНТ.

На рисунке 2 показаны различия между группами пациентов с ИКНТ, имеющих или не имеющих метастазы в региональных лимфоузлах. Относительный уровень miR-181a в этих группах значимо не различается, но относительный уровень miR-25 ниже в группе с метастазированием.

Был проведён анализ кривых ROC для определения оптимальных значений точки отсечения экспрессии miR-181a и miR-25, которые могли бы наилучшим образом свидетельствовать о наличии ДЗМЖ, ИКНТ, а также лимфогенного метастазирования. Результаты представлены на рисунке 3 и в таблице 3. Необходимо отметить, что площадь под ROC-кривой (AUC), равная 0,680 для экспрессии miR-181a у пациентов с ДЗМЖ и ИКНТ (рис. 3В), а также AUC=0,610 для экспрессии miR-181a у пациентов с ИКНТ с лимфогенным метастазированием и без него (рис. 3Г) свидетельствуют о среднем качестве модели, что не позволяет использовать полученные данные и выделить точки отсечения.

Результаты ROC-анализа позволили оценить качество полученных данных и установить пороговые значения уровня miR-181a и miR-25, разграничивающие множества значений, соответствующие наличию и отсутствию патологии в каждой исследуемой паре. Дополнительно выбранные пороговые значения (точки отсечения) проверяли с помощью точного критерия Фишера. Значения уровня miR, равные точке отсечения или находящиеся выше неё, свидетельствуют о наличии ДЗМЖ в сравнении со здоровым контролем (miR-181a $p=0,0006$; miR-25 $p=0,0020$ по точному критерию Фишера), о наличии ИКНТ в сравнении со здоровым контролем (miR-181a $p=0,00003$; miR-25 $p=0,00250$) и о наличии ДЗМЖ в сравнении с ИКНТ (miR-25 $p=0,003$). Значения экспрессии miR-25, равные точке отсечения или находящиеся ниже неё, свидетельствуют о наличии лимфогенного метастазирования в сравнении с его отсутствием у пациентов с ИКНТ (miR-25 $p=0,002$ по точному критерию Фишера).

Наблюдаемая динамика изменений miR-181a и miR-25 может отражать сложность изменений, связанных с развитием доброкачественного

либо злокачественного опухолевого процесса. Обе miR имеют множественные, в том числе разнонаправленные эффекты в отношении появления, развития и прогрессии опухоли.

Можно предположить, что при ДЗМЖ miR-181a играет роль антионкогена, нацеливаясь на одну из своих известных молекулярных мишеней, например, на белки, связанные с аутофагией [10], либо на PHLDA1 [4], который может быть медиатором апоптоза, пролиферации, дифференцировки и миграции клеток [22], либо на пока неизвестную молекулярную мишень. Можно предположить, что при ИКНТ возможные проонкогенные активности miR-181a могут требовать менее выраженного повышения уровня miR-181a. Такие результаты частично согласуются с работой Guo и Zhang [23], в которой обнаружено, что уровень miR-181a значительно ниже у пациентов с РМЖ на ранних стадиях (протоковая карцинома *in situ*, TNM I и II) по сравнению со здоровым контролем. Мы не наблюдали различий уровня miR-181a у пациентов, имеющих, либо нет, метастазы в регионарных лимфоузлах. Это может говорить о разнонаправленно действующих на уровень miR-181a процессах в клетках или о технических сложностях диагностики инвазии и метастазирования на этой стадии болезни.

В будущем представляется необходимым исследовать уровень молекул — кандидатов в молекулярные мишени исследуемых miR у пациентов ДЗМЖ и ИКНТ для верификации наших предположений. Поиск неизвестной молекулярной мишени может быть особенно актуальным для miR-25. Эта miR считается преимущественно проонкогенной, но, хотя мы наблюдали повышение уровня экспрессии miR-25 у пациентов с ИКНТ по сравнению с контролем, самый высокий уровень экспрессии miR-25 отмечен у пациентов с ДЗМЖ. В литературе нет сведений об уровне miR-25 у пациентов с ДЗМЖ. Можно предположить, что повышенный уровень miR-25 в сыворотке крови этих пациентов отражает патологические процессы разрастания тканей при ДЗМЖ. Что касается пациентов со злокачественными патологиями,

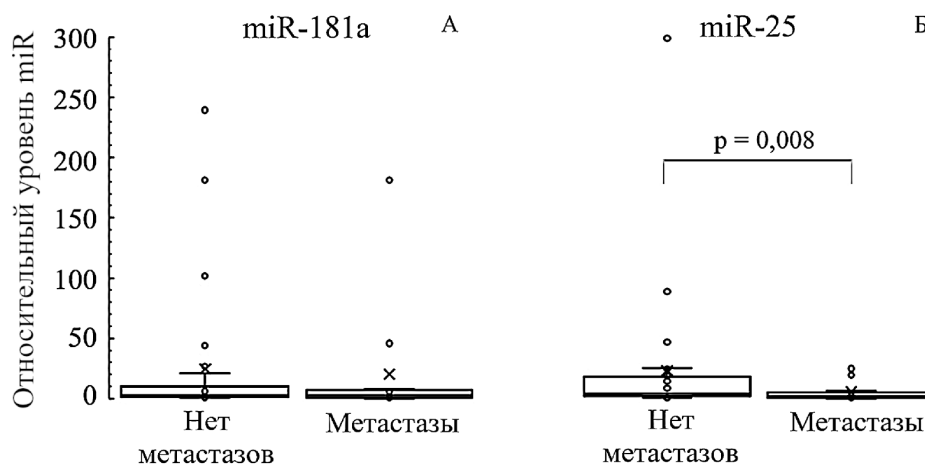


Рисунок 2. Экспрессия miR-181a (А) и miR-25 (Б) в сыворотке крови пациентов с ИКНТ, имеющих или не имеющих метастазы в региональных лимфоузлах. Данные нормализованы на уровень экспрессии *RNU6-1*.

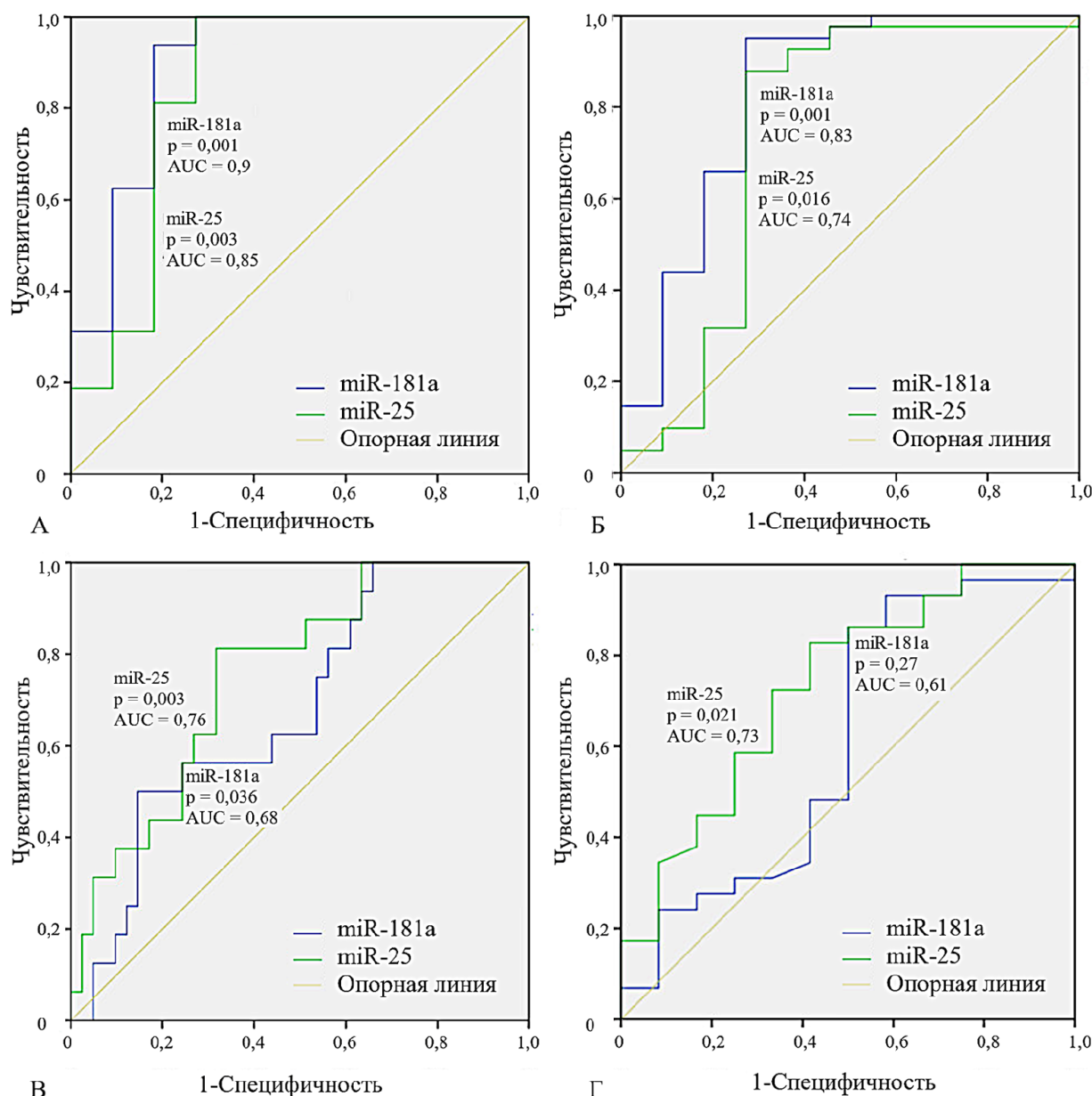


Рисунок 3. ROC-кривые, полученные при ROC-анализе уровня экспрессии miR-181a и miR-25 у пациентов с ДЗМЖ и условно-здоровым контролем (А), у пациентов с ИКНТ и условно-здоровым контролем (Б), у пациентов с ДЗМЖ и ИКНТ (В) и у пациентов с ИКНТ с лимфогенным метастазированием и без него (Г).

Таблица 3. Результаты анализа кривых ROC экспрессии miR-181a и miR-25 у пациентов с заболеваниями молочной железы

Исследуемые группы	miR	AUC	p	Чувствительность	Специфичность	Оптимальная точка отсечения
ДЗМЖ и здоровые	miR-181a	0,90 (90%)	$p=0,001$	94%	82%	1,89
	miR-25	0,85 (85%)	$p=0,003$	81%	82%	5,51
ИКНТ и здоровые	miR-181a	0,83 (83%)	$p=0,001$	95%	73%	0,53
	miR-25	0,74 (74%)	$p=0,016$	88%	73%	0,91
ДЗМЖ и ИКНТ	miR-25	0,76 (76%)	$p=0,003$	75%	69%	5,65
ИКНТ с лимфогенным метастазированием и без	miR-25	0,73 (73%)	$p=0,021$	83%	58%	2,10

Примечание. Значения площади под кривой (AUC) 0,9-1 – отличное качество модели; 0,8-0,9 – очень хорошее качество модели; 0,7-0,8 – хорошее качество модели; 0,6-0,7 – среднее качество модели; 0,5-0,6 – неудовлетворительное качество модели.

то, с одной стороны, повышенная экспрессия miR-25 может служить негативным прогностическим фактором, например, при плоскоклеточной карциноме пищевода [24]. С другой стороны, в клетках рака шейки матки, устойчивых к цисплатину, с более высокой способностью к инвазии и миграции, наблюдалось подавление miR-25. Напротив, сверхэкспрессия miR-25 в этих клетках подавляла у мышей рост опухоли, уровень мРНК Sema4C и Snail и повышала экспрессию E-кадгерина по сравнению с контрольной группой [25]. Учитывая, что в нашей работе уровень miR-25 был понижен в ткани РМЖ — ИКНТ с метастазами в лимфатические узлы по сравнению с отсутствием метастазов, можно предположить механизм, похожий на наблюдаемый в тканях рака шейки матки и описанный Song и Li [25].

В ряде случаев повышенный уровень miR-181a и miR-25 может отражать предраковый процесс. Например, miR-181a и miR-25 были идентифицированы в составе сигнатуры экспрессии из 6 miR, предсказывающей статус мутаций BRCA1/2, стандартный тест на которые может давать ложно отрицательный результат [26]. Наши результаты подтверждают тезис, что повышение miR-181a и miR-25 может быть сигналом к более тщательному выявлению возможных мутаций BRCA1/2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя молекулярные биомаркеры играют важную роль в раннем выявлении заболеваний и лечении пациентов, до сих пор отсутствуют чувствительные и специфические маркеры для выявления рака на ранних стадиях, а также для выявления риска озлокачествления доброкачественных опухолей.

В качестве потенциальных биомаркеров большое значение могут иметь циркулирующие miR. Мы выявили повышенный уровень экспрессии miR-181a и miR-25 у пациентов с заболеваниями молочной железы, причём самый высокий уровень исследуемых miR наблюдался при ДЗМЖ. О клинически значимых молекулярных/генетических аномалиях у пациентов с ДЗМЖ не известно [2]. В связи с этим полученные результаты могут быть заделом к разработке такой диагностической панели предраковых изменений на основе miR. У пациентов с ИКНТ уровень экспрессии miR-181a и miR-25 может отражать как благоприятные, так и неблагоприятные процессы в опухоли в силу множественных эффектов исследуемых miR, которые могут нацеливаться на несколько генов и одновременно влиять на несколько мишеней, путей и процессов, в том числе разнонаправленно действующих в отношении прогрессии опухоли. Эти мишени могут модулироваться другими miR, вероятно существование ауторегуляторных петель.

Профиль экспрессии единичных miR не обладает стабильным диагностическим потенциалом при РМЖ [27]. Использование miR-181a и miR-25 как маркеров представляется возможным только в рамках большой

диагностической панели, в которую могут входить miR-181a и miR-25, а также их гены-мишени, и которую только предстоит разработать.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансирование проведено за счёт 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, внесёнными на 64 Генеральной Ассамблее ВМАЮ Форталеа, Бразилия, октябрь 2013. Все пациенты дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено комитетом по этике НИИМББ ФИЦ ФТМ (протокол №17 от 22 июня 2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lukasiewicz S., Czezelewski M., Forma A., Baj J., Sitarz R., Stanislawek A.* (2021) Breast cancer-epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies – an updated review. *Cancers*, **13**(17), 4287. DOI: 10.3390/cancers13174287
2. *Breast Tumours* (2019) International agency for research on cancer: Lyon, 298 p.
3. *Zhai Z., Mu T., Zhao L., Li Y., Zhu D., Pan Y.* (2022) miR-181a-5p facilitates proliferation, invasion, and glycolysis of breast cancer through NDRG2-mediated activation of PTEN/AKT pathway. *Bioengineered*, **13**(1), 83-95. DOI: 10.1080/21655979.2021.2006974
4. *Yang C., Tabatabaei S.N., Ruan X., Hardy P.* (2017) The dual regulatory role of mir-181a in breast cancer. *Cell. Physiol. Biochem.*, **44**(3), 843-856. DOI: 10.1159/000485351
5. *Mahmoudian M., Razmara E., Mahmud Hussien B., Simiyari M., Lotfizadeh N., Motaghd H., Khazraei Monfared A., Montazeri M., Babashah S.* (2021) Identification of a six-microRNA signature as a potential diagnostic biomarker in breast cancer tissues. *J. Clin. Lab. Anal.*, **35**(11), e24010. DOI: 10.1002/jcla.24010
6. *Huang X., Yuan T., Tschannen M., Sun Z., Jacob H., Du M., Liang M., Dittmar R.L., Liu Y., Liang M., Kohli M., Thibodeau S.N., Boardman L., Wang L.* (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*, **14**, 319. DOI: 10.1186/1471-2164-14-319

7. Ling H., Fabbri M., Calin G.A. (2013) MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **12**(11), 847-865. DOI: 10.1038/nrd4140
8. Li Y., Kuscü C., Banach A., Zhang Q., Pulkoski-Gross A., Kim D., Liu J., Roth E., Li E., Shroyer K.R., Denoya P.I., Zhu X., Chen L., Cao J. (2015) miR-181a-5p inhibits cancer cell migration and angiogenesis via downregulation of matrix metalloproteinase-14. *Cancer Res.*, **75**(13), 2674-2685. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2875
9. El Majzoub R., Fayyad-Kazan M., Nasr El Dine A., Makki R., Hamade E., Grée R., Hachem A., Talhouk R., Fayyad-Kazan H., Badran B. (2019) A thiosemicarbazone derivative induces triple negative breast cancer cell apoptosis: Possible role of miRNA-125a-5p and miRNA-181a-5p. *Genes Genomics*, **41**(12), 1431-1443. DOI: 10.1007/s13258-019-00866-y
10. Park J.W., Kim Y., Lee S.B., Oh C.W., Lee E.J., Ko J.Y., Park J.H. (2022) Autophagy inhibits cancer stemness in triple-negative breast cancer via miR-181a-mediated regulation of ATG5 and/or ATG2B. *Mol. Oncol.*, **16**(9), 1857-1875. DOI: 10.1002/1878-0261.13180
11. Ferracin M., Lupini L., Salamon L., Saccenti E., Zanzi M.V., Rocchi A., da Ros L., Zagatti B., Musa G., Bassi C., Mangolini A., Cavallero G., Frassoldati A., Volpato S., Carcoforo P., Hollingsworth A.B., Negrini M. (2015) Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients. *Oncotarget*, **6**(16), 14545-14555. DOI: 10.18632/oncotarget.3859
12. Godfrey A.C., Xu Z., Weinberg C.R., Getts R.C., Wade P.A., de Roo L.A., Sandler D.P., Taylor J.A. (2013) Serum microRNA expression as an early marker for breast cancer risk in prospectively collected samples from the Sister Study cohort. *Breast Cancer Research: BCR*, **15**(3), R42. DOI: 10.1186/bcr3428
13. Sárközy M., Kahán Z., Csont T. (2018) A myriad of roles of miR-25 in health and disease. *Oncotarget*, **9**(30), 21580-21612. DOI: 10.18632/oncotarget.24662
14. Chen H., Pan H., Qian Y., Zhou W., Liu X. (2018) miR-25-3p promotes the proliferation of triple negative breast cancer by targeting BTG2. *Molecular Cancer*, **17**(1), 4. DOI: 10.1186/s12943-017-0754-0
15. Wang Z., Wang N., Liu P., Chen Q., Situ H., Xie T., Zhang J., Peng C., Lin Y., Chen J. (2014) MicroRNA-25 regulates chemoresistance-associated autophagy in breast cancer cells, a process modulated by the natural autophagy inducer isoliquiritigenin. *Oncotarget*, **5**(16), 7013-7026. DOI: 10.18632/oncotarget.2192
16. Wang L.J., Chiou J.T., Lee Y.C., Chang L.S. (2022) Docetaxel-triggered SIRT2/NOX4/JNK/HuR signaling axis is associated with TNF- α -mediated apoptosis of cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, **195**, 114865. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114865
17. Chang J.T., Wang F., Chapin W., Huang R.S. (2016) Identification of microRNAs as breast cancer prognosis markers through the cancer genome atlas. *PloS One*, **11**(12), e0168284. DOI: 10.1371/journal.pone.0168284
18. Yao J., Li G., Liu M., Yang S., Su H., Ye C. (2022) lnc-MICAL2-1 sponges miR-25 to regulate DKK3 expression and inhibits activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.*, **49**(2), 23. DOI: 10.3892/ijmm.2021.5078
19. Stachs A., Stubert J., Reimer T., Hartmann S. (2019) Benign breast disease in women. *Deutsches Arzteblatt International*, **116**(33-34), 565-574. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0565
20. Román M., Louro J., Posso M., Alcántara R., Peñalva L., Sala M., del Riego J., Prieto M., Vidal C., Sánchez M., Bargalló X., Tusquets I., Castells X. (2021) Breast density, benign breast disease, and risk of breast cancer over time. *European Radiology*, **31**(7), 4839-4847. DOI: 10.1007/s00330-020-07490-5
21. Mehta N., Rousslang L., Shokouh-Amiri M., Wiley E.L., Green L. (2020) Complex solid and cystic breast cancer: A series of six case reports. *J. Radiology Case Reports*, **14**(2), 21-44. DOI: 10.3941/jrcr.v14i2.3712
22. Nagai M.A. (2016) Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer. *Biomed. Rep.*, **4**(3), 275-281. DOI: 10.3892/br.2016.580
23. Guo L.J., Zhang Q.Y. (2012) Decreased serum miR-181a is a potential new tool for breast cancer screening. *Int. J. Mol. Med.*, **30**(3), 680-686. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1021
24. Liu B., Li X., Li C., Xu R., Sun X. (2019) miR-25 mediates metastasis and epithelial-mesenchymal-transition in human esophageal squamous cell carcinoma via regulation of E-cadherin signaling. *Bioengineered*, **10**(1), 679-688. DOI: 10.1080/21655979.2019.1687391
25. Song J., Li Y. (2017) miR-25-3p reverses epithelial-mesenchymal transition via targeting Sema4C in cisplatin-resistance cervical cancer cells. *Cancer Science*, **108**(1), 23-31. DOI: 10.1111/cas.13104
26. Tanic M., Yanowski K., Gómez-López G., Rodríguez-Pinilla M.S., Marquez-Rodas I., Osorio A., Pisano D.G., Martínez-Delgado B., Benítez J. (2015) MicroRNA expression signatures for the prediction of BRCA1/2 mutation-associated hereditary breast cancer in paraffin-embedded formalin-fixed breast tumors. *Int. J. Cancer*, **136**(3), 593-602. DOI: 10.1002/ijc.29021
27. Sadeghi H., Kamal A., Ahmadi M., Najafi H., Sharifi Zarchi A., Haddad P., Shayestehpour B., Kamkar L., Salamati M., Geranpayeh L., Lashkari M., Totonchi M. (2021) A novel panel of blood-based microRNAs capable of discrimination between benign breast disease and breast cancer at early stages. *RNA biology*, **18**(sup2), 747-756. DOI: 10.1080/15476286.2021.1989218

Поступила в редакцию: 28. 08. 2023.
После доработки: 06. 10. 2023.
Принята к печати: 12. 10. 2023.

SERUM miR-181a AND miR-25 IN PATIENTS WITH MALIGNANT AND BENIGN BREAST DISEASES

M.L. Perepechaeva^{1,2,}, A.A. Studenikina^{1,2}, A.Yu. Grishanova²,
A.N. Glushkov³, E.G. Polenok³, P.V. Bajramov⁴, A.I. Autenshlyus^{1,2}*

¹Novosibirsk State Medical University,
52 Krasny ave., Novosibirsk, 630091 Russia; *e-mail: mlperepechaeva@frcftm.ru

²Research Institute of Molecular Biology and Biophysics,
Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine,
2/12 Timakova str., Novosibirsk, 630117 Russia

³Institute of Human Ecology of the Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS,
10 Leningradskiy ave., Kemerovo, 650065 Russia

⁴M.S. Rappoport Kuzbass Clinical Oncologic Dispensary,
35 Volgogradskaya str., Kemerovo, 650036 Russia

Breast tumor diseases include a wide range of pathologies that require different approaches to their treatment. MicroRNA (miR) levels, reflecting regulation of the gene expression involved in tumorigenesis, can be diagnostic and prognostic markers of breast diseases. The levels of circulating miR-181a and miR-25 were measured in patients with benign breast diseases (BBD), patients with invasive carcinoma of a nonspecific type (ICNT) and also in conditionally healthy women. Expression of both miRs was higher in patients of both groups as compared to controls; at the same time, the content of serum miR-181a and miR-25 was higher in BBD patients than in ICNT patients. The detected changes may be of interest in the context of precancerous changes in BBD. It seems possible to use them in the future as markers of the pathological process as a part of a large diagnostic panel.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: miR-181a; miR-25; breast cancer; benign breast diseases

Funding. The study was performed within framework of the State Assignment of the Russian Ministry of Health (No. AAAA-A18-118030790008-7). The work was supported by budget funding (project FGMU-2022-0004, registration number 1021050601082-2-1.6.4;3.1.6). The work was carried out using the equipment of the Center for Collective Use “Proteomic Analysis”, supported by the Ministry of Education and Science of Russia (agreement No. 075-15-2021-691).

Received: 28.08.2023; revised: 06.10.2023; accepted: 12.10.2023.