

# miRNA KOT OZNAČEVALCI ODGOVORA NA ZDRAVLJENJE Z OBSEVANJEM PRI RAKU DOJK

Katja Goričar<sup>1,2</sup>, Vita Dolžan<sup>1</sup>, Tanja Marinko<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorij za farmakogenetiko, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Email: katja.goricar@mf.uni-lj.si

---

## Izvleček

Med bolnicami z rakom dojk obstajajo velike razlike v pojavnosti neželenih učinkov po obsevanju, k čemur lahko prispevajo tudi različni molekularni dejavniki. V raziskavi želimo poiskati miRNA, ki bi lahko služile kot označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem ter raziskati povezavo med izražanjem miRNA v plazmi in neželenimi učinki zdravljenja z obsevanjem na koži in na srcu pri bolnicah z duktalnim karcinomom *in situ*.

---

## Uvod

Rak dojk je najpogostejša oblika raka pri ženskah in njegova incidenca še narašča (1). Okoli 20 % novo ugotovljenih primerov raka dojk predstavlja duktalni karcinom *in situ* (angl. ductal carcinoma *in situ*, DCIS), neinvazivna oblika raka dojk, ki se razvije v duktusu mamarne žleze (2).

Bolnice z DCIS večinoma zdravimo kirurško in z obsevanjem. Dopolnilno obsevanje izboljša lokalno kontrolo bolezni, vendar pa se pri bolnicah, ki se zdravijo z obsevanjem, lahko pojavijo tako akutni kot kasni neželeni učinki zdravljenja, kar zmanjšuje kakovost življenja bolnic (3). Najpogosteje se pojavijo neželeni učinki na koži, med najbolj problematičnimi pa so neželeni učinki na srcu.

Sedanje strategije zdravljenja DCIS temeljijo na konvencionalnih klinično-patoloških napovednih dejavnikih in ne omogočajo prilagajanja zdravljenja na podlagi individualnega tveganja za ponovitev bolezni, napredovanje v invazivno bolezen ali pojav neželenih učinkov, kar lahko vodi v premalo ali preveč agresivno zdravljenje (3-5). K interindividualnim razlikam v pojavnosti neželenih učinkov po obsevanju lahko prispevajo tudi različni molekularni dejavniki, med drugimi tudi miRNA.

miRNA so kratke nekodirajoče RNA, vključene v potranskripcijsko uravnavanje izražanja genov. Vežejo se na 3'-neprevedljivo regijo tarčnih mRNA, kar vodi do zmanjšanja translacije ali celo razgradnje mRNA (6). Pri raku je uravnavanje miRNA spremenjeno, kar lahko spodbudi ali inhibira napredovanje tumorjev ali metastaz (2). Različne miRNA lahko uravnavajo celični cikel, apoptozo, celično proliferacijo in diferenciacijo, migracijo, invazijo in metastaziranje (7). V tumorskem tkivu in krvi bolnic z rakom dojk je pogosto povišana raven izražanja onkogenih miRNA, ki uravnavajo izražanje tumor supresorskih genov. Pri DCIS so miRNA vpletene v regulacijo adhezije celic, signalizacijo TGF- $\beta$  in v modulacijo zunajceličnega matriksa (2). Raziskave kažejo, da lahko miRNA sodelujejo

tudi pri odgovoru na zdravljenje z obsevanjem, njihova vloga pri razvoju neželenih učinkov obsevanja pa še ni dobro pojasnjena (8).

V naši raziskavi želimo poiskati miRNA, ki bi lahko služile kot označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem, ter raziskati povezavo med izražanjem miRNA v plazmi in neželenimi učinki zdravljenja z obsevanjem pri bolnicah z DCIS.

## **Zasnova raziskave in metode**

### **Bioinformatična analiza**

S pomočjo podatkovnih zbirk in pregleda literature smo določili nabor miRNA, ki so povezane z izpostavljenostjo sevanju v različnih modelnih sistemih (6). Z uporabo podatkovne zbirke Human microRNA Disease Database (HMDD) smo poiskali miRNA, povezane z rakom dojk, za katere so potrdili, da se spremenjeno izražajo v krvi (9). Za miRNA smo preverili tudi izražanje v tumorskem tkivu raka dojk v podatkovni zbirki miR-TV, ki omogoča analizo podatkov, zbranih v zbirki The Cancer Genome Atlas (TCGA) (10).

Ker na izražanje miRNA lahko vplivajo tudi genetske spremembe, smo v genih, ki kodirajo za izbrane miRNA, s pomočjo pregleda literature in podatkovne zbirke dbSNP poiskali še potencialno funkcionalne polimorfizme, ki so pogosti v evropski populaciji (frekvenca redkejšega alela več kot 5 %).

### **Klinična raziskava**

V prospektivno raziskavo bomo vključili 121 bolnic z DCIS, ki so bile zdravljene z obsevanjem na Onkološkem inštitutu Ljubljana. Za vse bolnice smo zbrali vzorce krvi pred začetkom zdravljenja z obsevanjem, po zaključku obsevanja in ob kontrolnem pregledu po 6 mesecih. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko.

Za bolnice bomo pridobili podatke o akutnih neželenih učinkih zdravljenja z obsevanjem. Za spremljanje neželenih učinkov na koži bomo uporabili kriterije CTCAEv.5 in LENT-SOMA, za spremljanje neželenih učinkov na srcu pa nivo N-konca pro-B-tipa natriuretičnega peptida (NT-proBNP) in oceno morebitnega srčnega popuščanja s pomočjo lestvice Newyorškega združenja za srce (angl. New York Heart Association, NYHA). Prav tako bomo pri bolnicah spremljali pojav morebitnih zgodnjih sprememb na srcu s pomočjo slikovnih preiskav (ultrazvok in magnetna resonanca).

Pri bolnicah bomo spremljali izražanje izbranih miRNA v plazmi in določili prisotnost pogostih polimorfizmov v genih za miRNA. Za izolacijo miRNA bomo uporabili vzorce plazme, za izolacijo DNA pa vzorce periferne krvi. Za določanje izražanja miRNA v različnih časovnih točkah bomo uporabili kvantitativni PCR, za določanje polimorfizmov pa alelno-specifični PCR. Preverili bomo, ali se izražanje izbranih miRNA pri bolnicah z DCIS pri zdravljenju z obsevanjem spremeni, ter ovrednotili povezavo teh miRNA in njihove genetske variabilnosti s pojavom neželenih učinkov obsevanja.

## Rezultati

### Rezultati bioinformatične analize

V različnih modelnih sistemih je bilo 20 miRNA povezanih z izpostavljenostjo sevanju (6). Glede na podatke HMDD so v dosedanjih raziskavah poročali o 163 miRNA, katerih izražanje v krvi je bilo spremenjeno pri vsaj eni obliki raka dojke. Od teh je bilo 53 (32,5 %) miRNA identificiranih v več kot eni raziskavi. S presekom rezultatov obeh analiz smo dobili nabor 11 miRNA, ki bi lahko služile kot potencialni neinvazivni označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri raku dojke (Tabela 1). Pri vseh teh miRNA je bilo tudi v tumorskem tkivu pri raku dojke izražanje drugačno kot v normalnem tkivu. V genih za miRNA smo identificirali 9 pogostih polimorfizmov, ki bi lahko vplivali na njihovo izražanje (Tabela 1).

### Pričakovani rezultati prospektivne raziskave

V raziskavi bomo opredelili, kako se izražanje izbranih miRNA spreminja tekom zdravljenja z obsevanjem ter preverili, ali miRNA oziroma njihova genetska variabilnost vpliva na izid zdravljenja. Pričakujemo, da bomo tako identificirali nove biološke označevalce, povezane z akutnimi neželenimi učinki zdravljenja z obsevanjem, kar bi lahko pripomoglo k boljšemu razumevanju odgovora na zdravljenje pri bolnicah z DCIS. Izražanje cirkulirajočih miRNA pred terapijo bi lahko pomagalo napovedati akutne neželene učinke, izražanje miRNA po obsevanju pa bi lahko pomagalo pri identifikaciji bolnic, ki potrebujejo spremembo zdravljenja ali pa bi pomagalo napovedati pojav neželenih učinkov (11).

Tabela 1. Seznam miRNA, ki bi lahko služile kot neinvazivni označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri raku dojke.

miRNA	Izražanje v tumorskem tkivu pri raku dojke	Izbrani polimorfizmi v genih za miRNA
hsa-let-7a	Znižano	rs10739971
hsa-miR-16	Povišano	rs9535416
hsa-miR-17	Povišano	rs9588884
hsa-miR-19b	Povišano	/
hsa-miR-20a	Povišano	/
hsa-miR-21	Povišano	rs1292037
hsa-miR-34a	Povišano	rs2666433
hsa-miR-106b	Povišano	rs999885
hsa-miR-125b	Znižano	rs2241490
hsa-miR-143	Znižano	rs4705343
hsa-miR-221	Minimalno povišano	rs2858060

### Zaključek

V raziskavi želimo identificirati miRNA, ki bi lahko služile kot označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri raku dojke. Boljše poznavanje molekularnih mehanizmov, ki sodelujejo pri odgovoru na zdravljenje z obsevanjem, je ključno za identifikacijo novih

napovednih dejavnikov, ki bi omogočili bolniku prilagojeno zdravljenje, na primer stratifikacijo bolnic in izbor zdravljenja pri DCIS, kar bi lahko zmanjšalo pojav neželenih učinkov in izboljšalo izid zdravljenja.

## Zahvala

Zahvaljujemo se vsem sodelavkam in sodelavcem OI, MF in UKC Ljubljana, ki sodelujejo v raziskavi, ter vsem bolnicam, ki so že ali pa še bodo privolile v sodelovanje v raziskavi.

Raziskovalna sredstva: ARRS J3-1753, ARRS J3-2527 in ARRS P3-0321.

## Literatura

1. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1194-220.
2. Hannafon BN, Ding WQ. Functional Role of miRNAs in the Progression of Breast Ductal Carcinoma in Situ. *Am J Pathol.* 2019;189(5):966-74.
3. Karlsson P. Postoperative radiotherapy after DCIS: Useful for whom? *Breast.* 2017;34 Suppl 1:S43-s6.
4. Benson JR, Wishart GC. Predictors of recurrence for ductal carcinoma in situ after breast-conserving surgery. *Lancet Oncol.* 2013;14(9):e348-57.
5. Pajic M, Froio D, Daly S, Doculara L, Millar E, Graham PH, et al. miR-139-5p Modulates Radiotherapy Resistance in Breast Cancer by Repressing Multiple Gene Networks of DNA Repair and ROS Defense. *Cancer Res.* 2018;78(2):501-15.
6. Jacobs LA, Bewicke-Copley F, Poolman MG, Pink RC, Mulcahy LA, Baker I, et al. Meta-analysis using a novel database, miRStress, reveals miRNAs that are frequently associated with the radiation and hypoxia stress-responses. *PloS One.* 2013;8(11):e80844.
7. Khordadmehr M, Shahbazi R, Ezzati H, Jigari-Asl F, Sadreddini S, Baradaran B. Key microRNAs in the biology of breast cancer; emerging evidence in the last decade. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8316-26.
8. Gandellini P, Rancati T, Valdagni R, Zaffaroni N. miRNAs in tumor radiation response: bystanders or participants? *Trends Mol Med.* 2014;20(9):529-39.
9. Huang Z, Shi J, Gao Y, Cui C, Zhang S, Li J, et al. HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1013-D7.
10. Pan CY, Lin WC. miR-TV: an interactive microRNA Target Viewer for microRNA and target gene expression interrogation for human cancer studies. *Database : the journal of biological databases and curation.* 2020;2020.
11. Tomasik B, Chałubińska-Fendler J, Chowdhury D, Fendler W. Potential of serum microRNAs as biomarkers of radiation injury and tools for individualization of radiotherapy. *Transl Res.* 2018;201:71-83.