

Dagnija Kalniete

MIKRO-RNS EKSPRESIJA  
KĀ PROGNOTISKS RĀDĪTĀJS  
KRŪTS VĒŽA ATTĪSTĪBAI

Promocijas darba kopsavilkums  
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – molekulārā bioloģija

Rīga, 2015

Promocijas darbs izstrādāts: RSU, Onkoloģijas institūtā

Darba zinātniskie vadītāji:

*Dr. med.* profesors **Jānis Gardovskis**,  
RSU Ķirurģijas katedra, Latvija

*Dr. biol.* profesors **Edvīns Miklaševičs**,  
RSU Onkoloģijas institūts, Latvija

Oficiālie recenzenti:

*Dr. med.* profesore **Gunta Purkalne**,  
Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Latvija

*Dr. biol.* asociētais profesors **Jānis Kloviņš**,  
Latvijas Universitāte

*Dr. habil. med.* profesors **Jans Lubinskis**,  
Pomerānijas Medicīnas universitāte, Polija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2015. gada 12. oktobrī plkst. 15.00 Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:  
[www.rsu.lv](http://www.rsu.lv)



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta  
“Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda  
ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu

Promocijas padomes sekretāre:

*Dr. med.* profesore **Juta Kroiča**

# SATURA RĀDĪTĀJS

<b>DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI</b> .....	5
<b>1. IEVADS</b> .....	6
1.1. Pētījuma mērķis .....	8
1.2. Pētījuma uzdevumi.....	8
1.3. Pētījumā izvirzītā hipotēze.....	8
1.4. Pētījuma novitāte.....	8
<b>2. MATERIĀLS UN METODES</b> .....	9
2.1. Pētījuma tips.....	9
2.2. Pētījuma grupa .....	9
2.3. Pacienšu klīniskie dati.....	11
2.4. RNS ekstrakcija no formalinā fiksētiem un parafīna blokos ieguldītiem audiem .....	11
2.5. RNS reversā transkripcija .....	13
2.6. Kvantitatīva mikroRNS noteikšana audos, izmantojot reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju .....	14
2.7. Gēnu ekspresijas profila noteikšana.....	16
2.8. Datu statistiskā apstrāde.....	20
<b>3. REZULTĀTI</b> .....	22
3.1. Pētījumā iekļauto krūts vēža pacienšu klīnisko datu raksturojums un salīdzinājums .....	22
3.2. MikroRNS ekspresijas atšķirības krūts vēža audos.....	25
3.2.1. MikroRNS ekspresijas atšķirības krūts vēža un veselos kontroles audos.....	25
3.2.2. Krūts vēža kopējās dzīvildzes izvērtēšana saistībā ar augstu un zemu mikroRNS relatīvo ekspresiju .....	28
3.2.3. MikroRNS relatīvās ekspresijas atšķirības pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos .....	31
3.2.4. Krūts vēža kopējās dzīvildzes izvērtēšana pacientēm ar augstu un zemu miR-214 relatīvo ekspresiju sporādiskos krūts vēža audos.....	34
3.2.5. MikroRNS relatīvā ekspresija TN un LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audos.....	35
3.2.6. Krūts vēža kopējās dzīvildzes izvērtēšana saistībā ar augstu un zemu mikroRNS relatīvo ekspresiju TN krūts vēža pacientēm .....	38
3.2.7. MikroRNS relatīvā ekspresija TN pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos .....	40
3.3. TNH un TNS kūts vēža pacienšu klīnisko datu analīze .....	44
3.4. TN krūts vēža pacienšu gēnu ekspresijas analīze.....	46

3.4.1. Gēnu ekspresijas datu analīze, izmantojot CLC Workbench.....	46
3.4.2. TN krūts vēža pacienšu gēnu ekspresijas profila analīze .....	48
3.4.3. Atšķirīgi atrasto gēnu analīze saistībā ar augstu un zemu mikroRNS ekspresiju.....	52
<b>4. DISKUSIJA.....</b>	<b>56</b>
<b>5. SECINĀJUMI.....</b>	<b>60</b>
<b>6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI .....</b>	<b>61</b>
6.1. Publikācijas.....	61
6.2. Tēzes.....	62
<b>LITERATŪRAS SARAKSTS .....</b>	<b>67</b>

## DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

*BRCA1* – ar krūts vēzi saistītais gēns 1

*BRCA2* – ar krūts vēzi saistītais gēns 2

cDNS – komplementāra dezoksiribonukleīnskābe

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

EGFR-epidermālās augšanas faktora receptors

ER – estrogēna receptors

H – pārmantots

HER2 – cilvēka epidermālā augšanas faktora receptors 2

LA – lumināla A

LB – lumināla B

mikroRNS – mikroribonukleīnskābes

mRNS – informācijas RNS

PTEN – fosfātā un tensīna homologs

PR – progesterona receptors

RNS – ribonukleīnskābe

S – sporādisks

TN – trīskārši negatīvs

TNH – trīskārši negatīvs pārmantots

TNS – trīskārši negatīvs sporādisks

## 1. IEVADS

Krūts vēzis ir viena no visbiežāk izplatītākajām ļaundabīgo audzēju formām un visbiežākais nāves cēlonis sievietēm visā pasaulē [Jemal, 2011]. Latvijā katru gadu tiek diagnosticēti apmēram 1000 jauni krūts vēža gadījumi [SKPSC, 2013]. Krūts vēzis ir klīniski, morfoloģiski un ģenētiski heterogēna slimība, un tās ārstēšanai ir nepieciešama individuāla pieeja, ņemot vērā katra pacienta ģenētisko fonu [Polyak, 2011]. Šādu stratēģiju ir iespējams realizēt, izmantojot specifiskus prognostiskus marķierus, kas potenciāli varētu ļaut prognozēt slimības attīstības virzību, atbildes reakciju uz terapiju un blaknes, tādējādi nodrošinot iespējami labāko iznākumu. Pašreiz klīniskajā praksē esošie imūnhistoķīmiskie biomarķieri nav pietiekoši informatīvi, lai sniegtu izsmeļošu informāciju par slimības attīstības virzību un terapeitisko efektivitāti, līdz ar to ir nepieciešami jauni prognostiski biomarķieri, kas būtu daudz izsmeļošāki par līdzšinējiem [Heneghan, 2010]. Vieni no šādiem potenciāliem biomarķieriem varētu būt mikroRNS (mikroribonukleīnskābes). MikroRNS ir apmēram 18 līdz 25 nukleotīdus garas nekodējošas molekulas, kas regulē gēnu ekspresiju post-transkripcijas līmenī [Calin, 2002]. Šīs molekulas ir iesaistītas tādos kritiskos šūnas procesos kā diferenciācijā, šūnas augšanā, proliferācijā un apoptozē, līdz ar to tām ir būtiska loma audzēja patoģenēzē [Calin, 2002; Cannell, 2008]. MikroRNS ekspresija audzēja šūnās ir izmainīta un tās uzvedas līdzīgi kā audzēju supresorgēni un onkogēni [Lu, 2005]. Izmainīta mikroRNS ekspresija korelē ar audzēja klīniskām un patofizioloģiskajām iezīmēm [Iorio, 2005; Heneghan, 2010]. Piemēram, viena no visplašāk pētītajām mikroRNS molekulām, ko atrod paaugstinātu dažādu tipu ļaundabīgajos audzējos, tai skaitā arī krūts vēža gadījumā, ir miR-21 un tā korelē ar vēlīnāku audzēja attīstības stadiju, pozitīvu limfmezglu statusu, augstu proliferācijas indeksu Ki67 un sliktu prognozi [Yan, 2008; Huang, 2009]. MiR-21 molekula darbojas līdzīgi kā onkogēns un viens no tās mērķiem, ko tā regulē, ir audzēja supresors

– *PTEN* gēns [Li, 2012]. Paaugstināta miR-21 ekspresija nomāc *PTEN* gēna darbību, kā rezultātā tiek aktivēts PI3K/AKT signālceļš, kas nodrošina šūnas izdzīvotspēju [Li, 2012]. MikroRNS ekspresiju atrod izmainītu ne tikai viena audzēja ietvaros, bet arī viena audzēja dažāda apakštipa ietvaros. Trīskārši negatīvos krūts vēža audos miR-21, miR-210 un miR-221 ekspresija ir augstāka nekā veselos kontroles audos, turklāt tā korelē ar sliktāku krūts vēža specifisko un kopējo dzīvildzi [Radojicic, 2011].

Trīskārši negatīvu krūts vēzi definē kā estrogēna receptora, progesterona receptora un tirozīna proteīnkināzes receptora negatīvu krūts vēzi [Perou, 2000; Sorlie, 2001]. Šī trīskārši negatīva krūts vēža klasifikācija tiek izmantota jau vairāk nekā 10 gadus, taču 2012. gadā Curtis *et al.*, publicēja rakstu, kurā tika parādīts, ka trīskārši negatīvu krūts vēzi var iedalīt 10 dažādos integratīvos apakštipos, par pamatu ņemot kopiju skaita izmaiņas audzējā [Curtis, 2012]. Jau 2000. gadā, kad Perou *et al.*, publicēja krūts vēža apakštipu klasifikāciju, vadoties pēc hormonu receptoru statusa un cilvēka epidermālā augšanas faktora receptora statusa audzējā, uzsvēra, ka krūts vēža histoloģisko un klīnisko heterogenitāti nosaka audzēja bioloģija un tā molekulārais raksturs [Perou, 2000]. Bazāla tipa audzējos ir izmainīti divi signālceļi – JUN/MAPK un PI3K/AKT [Guille, 2013]. Mutācijas *PTEN*, *PIK3CA*, *AKT* un *MAGI3-AKT3* gēnā aktivē PI3K/AKT signālceļu, savukārt mutācijas *MAP3K1*, *MAP3K13* un *MAP2K4* inaktivē JUN/MAPK signālceļu [Banerji, 2012; Ellis, 2012; Shah, 2012, *The Cancer Genome Atlas Network*, 2012].

Trīskārši negatīvām krūts vēža pacientēm ar mutāciju *BRCA1* gēna novēro labāku krūts vēža specifisko dzīvildzi kā trīskārši negatīvām krūts vēža pacientēm bez *BRCA1* gēna mutācijas [Bayraktar, 2011; Gonzalez-Angulo, 2011; Lee, 2010; Maksimenko, 2013]. Turklāt *BRCA1* gēna mutācijas statuss tiek saistīts ar zemāku risku distālu metastāžu attīstībai [Maksimenko, 2013].

## 1.1. Pētījuma mērķis

Atrast mikroRNS, kas ir atšķirīgi ekspresēti starp trīskārši negatīvām pārmantotām un trīskārši trīskārši negatīvām sporādiskām krūts vēža pacientēm un, izmantojot gēnu ekspresijas profilu, izskaidrot iespējamo atšķirības cēloni.

## 1.2. Pētījuma uzdevumi

1. Noteikt mikroRNS (miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214) ekspresiju krūts vēža un veselos kontroles audos.
2. Noteikt mikroRNS ekspresiju dažāda tipa krūts audzējos.
3. Salīdzināt mikroRNS ekspresiju pārmantota un sporādiska krūts vēža audos.
4. Noteikt saistību starp mikroRNS ekspresiju un kopējo dzīvildzi.
5. Identificēt atšķirīgi ekspresētus gēnus starp TNH un TNS krūts audzējiem.
6. Noteikt atšķirīgi ekspresēto gēnu saistību ar mikroRNS ekspresiju.

## 1.3. Pētījumā izvirzītā hipotēze

MikroRNS ekspresija ir kā prognostisks rādītājs krūts vēža attīstībai.

## 1.4. Pētījuma novitāte

Pētījuma gaitā ir atrastas mikroRNS, kas ir atšķirīgi ekspresētas starp TNH un TNS krūts vēža audiem. Ir noteikts, ka paaugstināta miR-214 ekspresija TNS krūts vēža audos ir saistīta ar sliktāku kopējo dzīvildzi. Ir atrasti 20 gēni, kas ir atšķirīgi ekspresēti starp TNH un TNS krūts vēža audiem. Turklāt trīs no atrastajiem gēniem: *C12ORF23*, *C1ORF19* un *AMMECR1L* regulē miR-21 un miR-214.



## 2. MATERIĀLS UN METODEDES

### 2.1. Pētījuma tips

Pētījums balstījās uz retrospektīvu mikroRNS (miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214) un 25000 dažādu gēnu ekspresijas analīzi audzēja audos krūts vēža pacientēm, kuras bija parakstījušas atvērtu piekrišanas formu paraugu izmantošanai pētījumā.

Pētījumā retrospektīvi noteica korelāciju starp mikroRNS ekspresiju audzēja audos un kopējo dzīvildzi pacientēm, kuru klīniskie dati bija pieejami pacienšu slimības vēsturēs un PREDA datu bāzē.

### 2.2. Pētījuma grupa

Pētījumā iekļāva 72 krūts vēža pacientes, kuras laika posmā no 2004. līdz 2011. gadam bija stacionētas Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīcā un bija parakstījušas atklātas piekrišanas formas dalībai pētījumā.

Pētījuma grupu veidoja 2 pacienšu apakšgrupas: pārmantota krūts vēža pacientes un sporādiska krūts vēža pacientes. Pētījumā iekļāva pacientes, kuras atbilda kritērijiem, kas ir norādīti 2.2.1. tabulā. Izslēgšanas kritēriji ir norādīti 2.2.2. tabulā.

Pētījuma grupa sastāvēja no 72 audzēja un 57 rezekcijas līnijas (krūts epitēlija) audu paraugiem. Audzēja audu grupa sastāvēja no 24 pārmantota krūts vēža un 48 sporādiska krūts vēža audiem. Pārmantota krūts vēža grupā bija 4 LA, 1 LB, 1 HER2+ un 18 TN krūts vēža audi. Sporādiska krūts vēža grupas audzēja audus atlasīja, lai, pēc audzēja molekulārā apakštīpa sadalījuma, tā atbilstu pārmantota krūts vēža grupai. Sporādiska krūts vēža grupu veidoja 9 LA, 6 LB, 1 HER2+ un 32 TN audzēja audi. Rezekcijas līnijas audus izmantoja par kontroles grupu.

## Pacienšu iekļaušanas kritēriji

Pārmantota krūts vēža pacientes	Sporādiska krūts vēža pacientes
Pierādīta ciltstēva mutācija <i>BRCA1</i> vai <i>BRCA2</i> gēnā.	Nav ciltstēva mutācija <i>BRCA1</i> vai <i>BRCA2</i> gēnā.
	Ģimenes onkoloģiskā anamnēzē nav norādes par pārmantotu krūts un/vai olnīcu vēža sindromu.
Pieejami audzēja audu materiāli no FFPI blokiem, kas iegūti no biopsijām vai operāciju materiāla.	Pieejami audzēja audu materiāli no FFPI blokiem, kas iegūti no biopsijām vai operāciju materiāla.
FFPI audzēja audu bloki, kas nav uzglabāti ilgāk par 7 gadiem.	FFPI audzēja audu bloki, kas nav uzglabāti ilgāk par 7 gadiem.
Audzēja audu materiāls, kas satur vairāk nekā 50% audzēja šūnu paraugā.	Audzēja audu materiāls, kas satur vairāk nekā 50% audzēja šūnu paraugā.
Pieejami veselu audu (krūts epitēlijaudu) materiāli no FFPI blokiem – rezekcijas līnijas.	Pieejami veselu audu (krūts epitēlijaudu) materiāli no FFPI blokiem – rezekcijas līnijas.
Pieejami klīniskie dati un informācija par audzēja molekulāro apakštipu.	Pieejami klīniskie dati un informācija par audzēja molekulāro apakštipu.
Stacionētas laika posmā no 2004. līdz 2011. gadam Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīcā.	Stacionētas laika posmā no 2004. līdz 2011. gadam Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīcā.
Parakstīta atvērta piekrišanas forma.	Parakstīta atvērta piekrišanas forma.
	Pēc audzēja molekulārā apakštipa sadalījuma atbilst pārmantota krūts vēža grupai.

**Pacienšu izslēgšanas kritēriji**

Pārmantota krūts vēža pacientes	Sporādiska krūts vēža pacientes
Nav pierādīta ciltstēva mutācija <i>BRCA1</i> vai <i>BRCA2</i> gēnā.	Ģimenes onkoloģiskā anamnēzē ir norādes par pārmantotu krūts un/vai olnīcu vēža sindromu.
Audzēja audu materiāls, kas satur mazāk nekā 50% audzēja šūnu paraugā.	Audzēja audu materiāls, kas satur mazāk nekā 50% audzēja šūnu paraugā.
FFPI audzēja audu bloki, kas uzglabāti ilgāk par 7 gadiem.	FFPI audzēja audu bloki, kas uzglabāti ilgāk par 7 gadiem.

**2.3. Pacienšu klīniskie dati**

Pētījumā iekļauto pacienšu klīniskos datus ieguva no Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā pieejamām pacienšu slimības vēsturēm un PREDA datu bāzes.

Informāciju par pētījumā iekļauto krūts vēža pacienšu imūnhistoķīmiskiem datiem: PR, ER, HER2, Ki67 ekspresiju, histoloģisko/molekulāro tipu un diferenciācijas pakāpi (G) ieguva no pacienšu slimības vēsturēm. Informāciju par diagnozes brīdī esošo audzēja TNM stadiju, klīnisko stadiju (I līdz IV) un audzēja dinamiku laikā (recidīvu un nāvi) ieguva no PREDA datu bāzes. Audzēja izmēru noteica pēc T stadijas, vadoties pēc AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) vadlīnijām. Audzējus, kuriem diagnozes brīdī bija T<sub>1</sub> un T<sub>2</sub> pieņēma mazākus par 5 cm, savukārt audzējus, kuriem diagnozes brīdī bija T<sub>3</sub> un T<sub>4</sub> pieņēma lielākus par 5 cm.

**2.4. RNS ekstrakcija no formalinā fiksētiem un parafīna blokos ieguldītiem audiem**

RNS ekstrakciju no formalinā fiksētiem un parafīna blokos ieguldītiem audiem veica ar *Total Nucleic Acid Isolation Kit (Life Technologies)*, vadoties pēc ražotāju instrukcijām.

1. Apmēram 8 \*10 µm biezumā sagrieztus formalīnā fiksētus un parafīna blokos ieguldītus audus izšķīdināja 1 ml 100% ksilēna, samaisīja un centrifugēja 3–4 sekundes pie 8000 rpm apgriezieniem.
2. Audus inkubēja 3 minūtes 50° C temperatūrā un centrifugēja 2 minūtes pie 14000 rpm apgriezieniem. Atbrīvojās no supernatanta.
3. Nogulsnēm pievienoja 1 ml 96% etanola, samaisīja un centrifugēja 2 minūtes pie 14,000 rpm apgriezieniem. Atbrīvojās no supernatanta.
4. Mazgāšanas soli ar 96% etanolu atkārtoja vēl vienu reizi.
5. Nogulsnes žāvēja istabas temperatūrā 45 minūtes.
6. Nogulsnēm pievienoja 200 µl šķelšanas buferi un 4 µl proteāzes. Maisījumu invertēja.
7. Nogulsnes inkubēja 15 minūtes 50 °C temperatūrā, ar tai sekojošu 15 minūšu inkubāciju 80 °C temperatūrā.
8. Izšķīdusajām nogulsnēm pievienoja 240 µl ekstrakcijas aditīvu un 550 µl 96% etanolu.
9. Filtrēšanas kolonnā ienesa 700 µl izšķīdušo nogulšņu, ekstrakcijas aditīva/ etanola maisījumu un centrifugēja 30 sekundes pie 10000 rpm apgriezieniem. Atbrīvojās no filtrāta.
10. Kolonnā ienesa 700 µl mazgāšanas koncentrāta 1/96% etanola maisījumu un centrifugēja 30 sekundes pie 10000 rpm apgriezieniem. Atbrīvojās no filtrāta.
11. Kolonnā ienesa 500 µl mazgāšanas koncentrāta 2/3/96% etanola maisījumu un centrifugēja 30 sekundes pie 10000 rpm apgriezieniem. Atbrīvojās no filtrāta.
12. Filtrēšanas kolonnu papildus centrifugēja 30 sekundes pie 10000 rpm apgriezieniem.
13. No 6 µl 10X DNāzes bufera, 4 µl DNāzes un 50 µl ūdens pagatavoja maisījumu viena parauga šķelšanai.

14. 60 µl pagatavotā maisījuma ienesa filtrēšanas kolonnā un inkubēja 30 minūtes istabas temperatūrā.
15. Kolonnā ienesa 700 µl mazgāšanas koncentrāta 1/96% etanola maisījumu un inkubēja 1 minūti istabas temperatūrā.
16. Kolonnu centrifugēja 30 sekundes pie 10000 rpm apgriezieniem. Atbrīvojās no filtrāta.
17. Kolonnā ienesa 500 µl mazgāšanas koncentrāta 2/3/96% etanola maisījumu un centrifugēja 30 sekundes pie 10000 rpm apgriezieniem.
18. Atbrīvojās no filtrāta.
19. Soli atkārtoja divas reizes.
20. Kolonnu papildus centrifugēja 1 minūti pie 10000 rpm apgriezieniem.
21. Kolonnu ievietoja jaunā 1,5 ml mēģenē, ienesa 60 µl eluēšanas buferi.
22. Kolonnu inkubēja istabas temperatūrā 2 minūtes un centrifugēja 1 minūti pie 14000 rpm apgriezieniem.
23. RNS kvantitatīvu daudzumu paraugā noteica, izmantojot ND1000 spektrofotometru (*NanoDrop*).

## 2.5. RNS reversā transkripcija

RNS reverso transkripciju (RT) veica ar *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Assays (Life Technologies)* reaģentu komplektu, vadoties pēc ražotāju instrukcijām.

RT reakcijas maisījumu vienai reakcijai (kopējais tilpums 15 µl) pagatavoja pēc sekojoša protokola:

10 mM dNTP (ar dTTP)	0,15 µl
<i>MultiScribe</i> reversā transkriptāze (50 u/µl)	1,00 µl
10X reversās transkriptāzes buferis	1,50 µl
RNāzes inhibitors (20u/µl)	0,19 µl
Ūdens	4,16 µl

RNS	5,00 µl
Praimeris*	3,00 µl

\*RT reakcijā izmantotie praimeri norādīti 2.5.1. tabulā.

RT reakcijas maisījumu ievietoja termociklerī un inkubēja reakcijas apstākļos, kas norādīti 2.5.2. tabulā.

2.5.1. tabula

### RT reakcijā izmantotie praimeri

Praimeris	Tips
RNU6B reference	<i>TaqMan MicroRNA RT Assays</i>
hsa-miR-10b	<i>TaqMan MicroRNA RT Assays</i>
hsa-miR-21	<i>TaqMan MicroRNA RT Assays</i>
hsa-miR-29a	<i>TaqMan MicroRNA RT Assays</i>
hsa-miR-31	<i>TaqMan MicroRNA RT Assays</i>
hsa-miR-214	<i>TaqMan MicroRNA RT Assays</i>

2.5.2. tabula

### RNS RT reakcijas apstākļi

Soļa tips	Laiks	Temperatūra
Inkubācija	30 minūtes	16 °C
Inkubācija	30 minūtes	42 °C
Inkubācija	5 minūtes	85 °C
Inkubācija	Pauze	4 °C

## 2.6. Kvantitatīva mikroRNS noteikšana audos, izmantojot reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju

MikroRNS (miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214) kvantitatīvu daudzumu audzēja audu un rezekcijas līnijas audu paraugos noteica ar *TaqMan MicroRNA Assays–TaqMan Universal PCR Master Mix*

(Life Technologies), izmantojot reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju (RL-PĶR).

RL-PĶR maisījumu vienai reakcijai (kopējais tilpums 20 µl) pagatavoja pēc sekojoša protokola:

RL-PĶR praimeris*	1,00 µl
RT produkts	1,30 µl
TaqMan 2X Universal PCR Master Mix	10,00 µl
Ūdens	7,70 µl

\*RL-PĶR izmantotie praimeris norādīti 2.6.1. tabulā.

2.6.1. tabula

### RL-PĶR izmantotie praimeris

Praimeris	Tips
RNU6B reference	<i>TaqMan MicroRNA RT-PCR Assays</i>
hsa-miR-10b	<i>TaqMan MicroRNA RT-PCR Assays</i>
hsa-miR-21	<i>TaqMan MicroRNA RT-PCR Assays</i>
hsa-miR-29a	<i>TaqMan MicroRNA RT-PCR Assays</i>
hsa-miR-31	<i>TaqMan MicroRNA RT-PCR Assays</i>
hsa-miR-214	<i>TaqMan MicroRNA RT-PCR Assays</i>

Katram audzēja un rezekcijas līnijas audu paraugam noteica RNU6B, miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 kvantitatīvu daudzumu paraugā izmantojot reakcijas apstākļus, kas norādīti 2.6.2. tabulā. Katru paraugu lika trijos atkārtojumos un analīzei izmantoja vidējo aritmētisko vērtību no iegūtajām vērtībām. MikroRNS relatīvo ekspresiju noteica, izmantojot salīdzinošās kvantificēšanas metodi, un par referenci izmantoja RNU6B, kur tās kvantitatīvo daudzumu pieņēma par 1. Katra mikroRNS relatīvo ekspresiju noteica, attiecinot tās iegūto kvantitatīvo daudzumu pret RNU6B. Datu analīzei un apstrādei izmantoja *Rotor-Gene Q* v.1.7. programmu.

**RL-PĶR reakcijas apstākļi**

Soļa tips	Laiks	Temperatūra
Inkubācija	10 minūtes	95 °C
Amplifikācija	40*	
Denaturācija	15 sekundes	95 °C
Elongācija	60 sekundes	60 °C*

\* Signālu uztver FAM kanālā ar viļņa garumu no 494 līdz 518 nm

**2.7. Gēnu ekspresijas profila noteikšana**

Gēnu ekspresijas profilu TN krūts vēža audos noteica ar *Whole-Genome Gene Expression DASL HT* mikročipu un reaģentu komplektu, vadoties pēc ražotāja instrukcijām.

1. Platē pie 5 µl RNS parauga (50 ng/µl) pievienoja 5 µl MCS4 un RTE maisījumu.
2. Plati aiztaisīja ar mikrofilmu, samaisīja un centrifugēja 1 minūti pie rpm apgriezieniem.
3. Inkubēja 10 minūtes istabas temperatūrā, ar tai sekojošu 1 stundas inkubāciju 42 °C temperatūrā.
4. Pēc tam centrifugēja 1 minūti pie 290 rpm apgriezieniem.
5. Jaunā platē ienesa 10 µl DAP un 30 µl OB1 reģentu.
6. 10 µl ar biotīnu iezīmēto cDNS paraugu pārnesa platē ar DAP/OB1 maisījumu.
7. Plati aizkausēja ar alumīnija foliju, centrifugēja 1 minūti pie 290 rpm apgriezieniem un maisīja 1 minūti pie 1600 rpm.
8. Ievietoja termoblokā ar 70 °C temperatūru un tūlīt nomainīja termobloka temperatūru uz 30 °C temperatūru.
9. Inkubēja 18 stundas.



10. Pēc tam centrifugēja 1 minūti pie 290 rpm apgriezieniem.
11. Plati novietoja uz magnētiskās plāksnes un atbrīvojās no supernatanta (DAP/OB1 maisījums).
12. Pie nogulsnēm pievienoja 50 µl AM1 reaģentu un aiztaisīja plati ar mikrofilmu.
13. Maisīja 20 sekundes pie 1600 rpm, pēc tam novietoja uz magnētiskās plāksnes un atļāva magnētiskajām lodītēm sakoncentrēties apmēram 2 minūtes.
14. No plates noņēma mikrofilmu un atbrīvojās no supernatanta (AM1).
15. Soli 12 līdz 14 atkārtoja vēl vienu reizi.
16. Plati noņēma no magnētiskās plāksnes un pievienoja 50 µl UB1 reaģentu
17. Pēc tam plati novietoja uz magnētiskās plāksnes un atļāva magnētiskajām
18. lodītēm sakoncentrēties apmēram 2 minūtes. Atbrīvojās no supernatanta (UB1).
19. Soli 16 līdz 17 atkārtoja vēl vienu reizi.
20. Platē ienesa 37 µl MEL reaģentu, aizlīmēja ar mikrofilmu un maisīja 1 minūti pie 1600 rpm.
21. Inkubēja 15 minūtes 45 °C temperatūrā.
22. Jaunā platē ienesa 30 µl SCM maisījumu, kas iepriekš tika pagatavots no 800 µl SCM un 16 µl TopTaq polimerāzes. Plati aiztaisīja ar mikrofilmu un novietoja tumsā.
23. Plati ar MEL reaģentu izņēma no termobloka un novietoja uz magnētiskās plāksnītes un atļāva magnētiskajām lodītēm sakoncentrēties apmēram 2 minūtes.
24. No plates noņēma mikrofilmu un atbrīvojās no supernatanta (MEL reaģents).
25. Plati turot uz magnētiskās plāksnītes, ienesa 50 µl UB1 reaģentu.

26. Plati atstāja novietotu uz magnētiskās plāksnītes, un atļāva magnētiskajām lodītēm sakoncentrēties apmēram 2 minūtes un pēc tam atbrīvojās no supernatanta (UB1).
27. Pie katra parauga ienesa 35 µl IP1 reaģentu un aizlīmēja plati ar mikrofilmu.
28. Maisīja 1 minūti pie 1800 rpm un inkubēja 1 minūti 95 °C temperatūrā.
29. Plati novietoja uz magnētiskās plāksnītes un atļāva magnētiskajām lodītēm sakoncentrēties apmēram 2 minūtes. Noņēma mikrofilmu un 30 µl supernatanta pārnesa platē ar 30 µl SCM maisījuma.
30. Plati aiztaisīja ar mikrofilmu un amplificēja, izmantojot programmu, kas norādīta 2.7.1. tabulā.

2.7.1. tabula

Ciklu skaits	Temperatūra	Laiks
	37 °C	10 minūtes
	95 °C	3 minūtes
34*	95 °C	35 sekundes
	56 °C	35 sekundes
	72 °C	2 minūtes
	72 °C	10 minūtes
	4 °C	5 minūtes

**PQR apstākļi**

31. Pēc tam centrifugēja 1 minūti pie 290 rpm apgriezieniem.
32. Katram paraugam pievienoja 20 µl MPB reaģentu un plātes saturu samaisīja.

33. 85 µl produkta pārnese filtrplatē, uzlikta vāku un inkubēja 1 stundu istabas temperatūrā, sargājot no gaismas.
34. Zem filtrplates novietoja savācējplati un centrifugēja 5 minūtes pie 1300 rpm apgriezieniem.
35. Filtrplatei noņēma vāku un katrā bedrītē pie parauga ienesa 50 µl UB2 reaģentu un uzlika atpakaļ vāku.
36. Filtrplati centrifugēja 5 minūtes pie 1300 rpm apgriezieniem.
37. Jaunā platē atbilstošajās bedrītēs ienesa 30 µl MH1 reaģentu.
38. Filtrplates savācējplati nomainīja pret plati ar MH1 reaģentu.
39. Filtrplatei noņēma vāku un atbilstošajā bedrītē pie parauga ienesa 30 µl 0,1N NaOH šķīdumu.
40. Filtrplatei uzlika vāku un centrifugēja 5 minūtes pie 1300 rpm apgriezieniem. Filtrātu savāca un atbrīvojas no filtrplates.
41. Platē pie filtrāta atbilstošajā bedrītē ienesa 30 µl PS1 reaģentu un 90 µl 2-propanolu. Reaģentus samaisīja un plati aiztaisīja ar mikrofilmu.
42. Plati centrifugēja 40 minūtes pie 3700 rpm apgriezieniem 4 °C temperatūrā. Pēc tam supernatantu dekantēja uz absorbējošas salvetes.
43. Nogulsnes mazgāja ar 150 µl 70% etanola un centrifugēja 15 minūtes pie 3700 rpm apgriezieniem 4 °C temperatūrā.
44. Supernatantu dekantēja un nogulsnes žāvēja 5 minūtes 65 °C temperatūrā.
45. Izžāvētās nogulsnes izšķīdināja 15 µl MH1/H<sub>2</sub>O/HYB maisījumā.
46. Izšķīdinātos paraugus uznesa uz HumanHT-12 v4 mikročipa katram paraugam atbilstošās šūnas.
47. Hibridizācijas kameras kabatiņās ienesa 200 µl HCB buferi.
48. Mikročipu ievietoja hibridizācijas kamerā un inkubēja 16 stundas 58 °C temperatūrā.
49. Mikročipu izņēma no hibridizācijas kameras un ievietoja traukā ar 1 L E1BC buferi.

50. Ar vienmērīgu kustību no mikročipa noņēma mikrofilmu un ievietoja traukā ar 250 ml E1BC buferi.
51. Mikročipu pārnesa uz vannu ar 0,5 L HTW buferi un inkubēja 10 minūtes 55 °C temperatūrā.
52. Mikročipu pārvietoja atpakaļ uz trauku ar 250 ml E1BC buferi un maisīja 5 minūtes uz maisītāja.
53. Mikročipu pārvietoja uz trauku ar 250 ml 96% etanola un maisīja 10 minūtes uz maisītāja.
54. Mikročipu ievietoja traukā ar 350 ml PB1 reaģenta un inkubēja 5 minūtes.
55. Mikročipu pārvietoja uz trauku ar 350 ml XC4/etanola maisījumu un inkubēja 5 minūtes.
56. Mikročipu novietoja uz statīva un ievietoja vakuuma desikātorā.
57. Mikročipu žāvēja vakuumā 55 minūtes pie 508 mm Hg.
58. Mikročipu nolāsīja ar HiScan (Illumina) ģenētisko analizatoru.
59. Iegūtos rezultātus detektēja ar *iScan Control Software*.

## 2.8. Datu statistiskā apstrāde

Datu statistiskai apstrādei izmantoja GraphPad InStat 3 statistikas programmu un *GraphPad Prism 6* datu apstrādes programmu.

MikroRNS relatīvo ekspresijas datu normālsadalījumu noteica, izmantojot Gausa sadalījuma līkni. Ekstremālās vērtības katrā grupā noteica, izmantojot kvartīles. Par ekstremālām vērtībām uzskatīja vērtības, kas atradās ārpus robežām sekojošai formulai:

$$Q_1 - 1,5 * IQR$$

$$Q_3 + 1,5 * IQR$$

Q<sub>1</sub>-pirmā kvartīle; Q<sub>3</sub>-trešā kvartīle; IQR-starpkvartīļu intervāls

Ekspresijas atšķirības dažāda tipa krūts audzēja audos noteica ar neparametriskām statistikas metodēm (Manna–Vitneja U tests). Atšķirības starp TNH un TNS grupas klīniskajiem datiem noteica ar Fišera testu un t-testu. Kopējo dzīvildzi krūts vēža pacientēm izvērtēja saistībā ar augstu un zemu relatīvo mikroRNS ekspresiju audzēja audos. Par augstu un zemu mikroRNS definēja vērtību, kas attiecīgi bija virs un zem mediānās ekspresijas vērtības. Kopējo dzīvildzi izvērtēja no diagnozes brīža līdz brīdim, kad iestājās nāve no audzēja, izmantojot Log-ranga (Mantela–Koksa) testu. Mediānais laika posms, kurā pacientes tika novērotas, bija 46 mēneši. Statistiskās ticamības sliekšņa līmenis bija 95%.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. Pētījumā iekļauto krūts vēža pacientu klīnisko datu raksturojums un salīdzinājums

Pētījumā iekļautām pacientēm veica klīnisko datu analīzi. Pārmantota krūts vēža pacientu mediānais vecums (amplitūda) diagnozes brīdī bija 46 (27–76) gadi, savukārt sporādiska krūts vēža pacientu mediānais vecums (amplitūda) diagnozes brīdī bija 58 (28–78) gadi. Salīdzinot abas grupas, konstatēja, ka pārmantota krūts vēža pacientu diagnozes brīdī bija statistiski ticami jaunākas nekā sporādiskas krūts vēža pacientu ( $p=0,0004$ ;  $t$ -tests). Pārmantota krūts vēža pacientēm 69,57% gadījumu bija *BRCA1* gēna c.5266dupC mutācija, 26,09% bija c.4034delA, savukārt 4,35% gadījumu bija c.181T>G mutācija. Pārmantota un sporādiska krūts vēža pacientēm salīdzināja TNM stadijas diagnozes brīdī. Salīdzinot T stadijas starp abām grupām, netika konstatētas statistiski ticamas atšķirības ( $p=0,4726$ ; Fišera tests). Arī N un M stadijas starp abām grupām statistiski ticami neatšķīrās ( $p=0,4432$ ; Fišera tests) un ( $p=0,4577$ ; Fišera tests) attiecīgi. Salīdzinot pārmantota krūts vēža grupas un sporādiska krūts vēža grupas klīniskās stadijas, netika konstatētas statistiski ticamas atšķirības ( $p=0,0952$ ; Fišera tests). Arī molekulāro apakštipu sadalījums starp pārmantota un sporādiska krūts vēža grupām statistiski ticami neatšķīrās ( $p=0,6713$ ; Fišera tests). Pārmantota krūts vēža pacientēm novēroja statistiski ticami augstāku mediāno proliferācijas indekss Ki67 kā sporādiska krūts vēža pacientēm ( $p=0,0175$ ; Fišera tests). Pārmantota krūts vēža pacientēm biežāk novēroja audzējus ar zemāku diferenciācijas pakāpi kā sporādiska krūts vēža pacientēm, tomēr novērojums nerasniedza statistiskās ticamības sliekšni ( $p=0,0555$ ; Fišera tests). Klīnisko datu raksturojums un salīdzinājums ir redzams 3.1.1. tabulā.

**Pārmantotās un sporādiskās krūts vēža grupu  
klīnisko datu salīdzināšana**

Raksturojums	Pārmantotas N=24 N (%)	Sporādiskas N=48 N (%)	p vērtība
Mediānais vecums (amplitūda)	46 (27–76)	58 (28–78)	0,0004
<i>BRCA1</i> gēna mutācijas c.5266dupC c.4034delA c.181T>G <i>BRCA2</i> gēna mutācijas 886delTG	16 (69,57) 6 (26,09) 1 (4,35) 1 (100)	-	-
T stadijas T <sub>1</sub> T <sub>2</sub> T <sub>3</sub> T <sub>4</sub> Nav datu	10 (41,67) 8 (33,33) 2 (8,33) 3 (12,50) 1 (4,17)	12 (25,00) 20 (41,67) 8 (16,67) 8 (16,67) -	0,4726
N stadijas N <sub>0</sub> N <sub>1</sub> N <sub>2</sub> N <sub>3</sub> Nav datu	9 (37,50) 2 (8,33) 6 (25,00) 1 (4,17) 6 (25,00)	20 (41,67) 12 (25,00) 9 (18,75) 6 (12,50) 1 (2,08)	0,4432
M stadijas M <sub>0</sub> M <sub>1</sub> Nav datu	16 (66,67) 1 (4,17) 7(29,17)	47 (97,92) 1 (2,08) -	0,4577
Stadijas I II III IV	9 (37,50) 7 (29,16) 6 (25,00) 1 (4,17)	7 (14,58) 21 (43,75) 19 (39,58) 1 (2,08)	0,0952

3.1.1. tab. turpinājums

Raksturojums	Pārmantotas N=24 N (%)	Sporādiskas N=48 N (%)	p vērtība
Histoloģiskais tips	14 (58,33)	42 (87,50)	0,0670
D	1 (4,17)	1 (2,08)	
L	4 (16,67)	2 (4,17)	
M	1 (4,17)	-	
P	1 (4,17)	1 (2,08)	
D+M	1 (4,17)	1 (2,08)	
D+P	2 (8,33)	1 (2,08)	
Nav datu			
Diferenciācija			0,0555
G2	6 (25,00)	3 (6,25)	
G3	13 (54,17)	31 (64,58)	
Nav datu	5 (20,83)	14 (29,17)	
Audzēja izmērs			0,2709
≤ 50 mm >	18 (75,00)	32 (66,67)	
50 mm	5 (20,83)	16 (33,33)	
Nav datu	1 (4,17)	-	
Ki67 (%)			0,0175
Mediānais (amplitūda)	70 (5–97)	52 (2–98)	
Molekulārais apakštīps	4 (16,67)	9 (18,75)	0,6713
LA	1 (4,17)	6 (12,50)	
LB	1 (4,17)	1 (2,08)	
HER2	18 (75,00)	32 (66,67)	
TN			
Recidīvis			0,1949
Jā	4 (16,67)	3 (6,25)	
Nē	18 (75,00)	45 (93,75)	
Nav datu	2 (8,33)	-	
Nāve			0,1276
Jā	1 (4,17)	8 (16,67)	
Nē	21 (87,50)	40 (83,33)	
Nav datu	2 (8,33)	-	

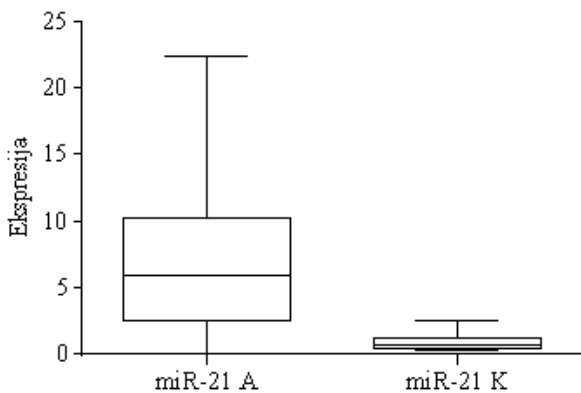
D – duktālas, L – lobulāra, M – medulāra, P – papilāra



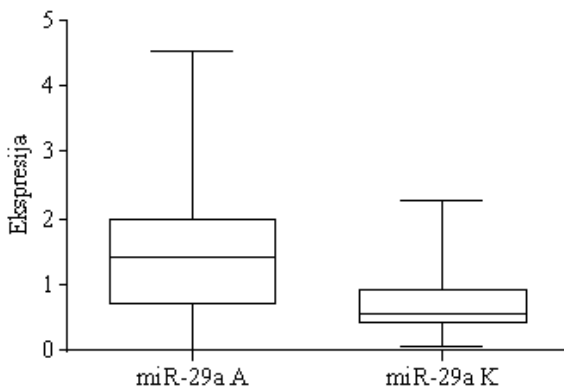
## 3.2. MikroRNS ekspresijas atšķirības krūts vēža audos

### 3.2.1. MikroRNS ekspresijas atšķirības krūts vēža un veselos kontroles audos

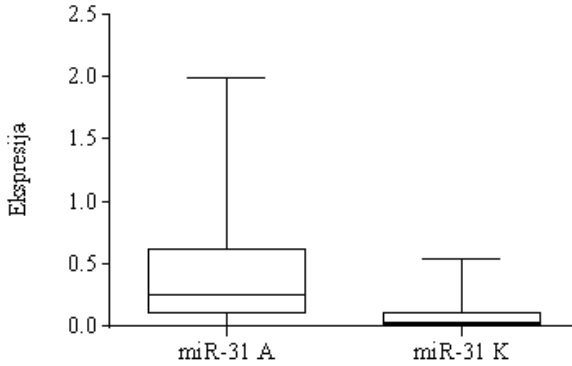
Piecu dažādu mikroRNS (miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214) relatīvās ekspresijas salīdzināja krūts vēža audos un veselos kontroles audos. Mediāna  $\pm$  starpkvartīļu amplitūda (Q1; Q3) krūts vēža audos miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvai ekspresijai attiecīgi bija  $0,315 \pm 0,320$  (0,170; 0,490),  $5,920 \pm 7,688$  (2,587; 10,275),  $1,415 \pm 1,300$  (0,710; 2,010),  $0,260 \pm 520$  (0,105; 0,625) un  $1,110 \pm 1,195$  (0,595; 1,790). Mediāna  $\pm$  starpkvartīļu amplitūda (Q1; Q3) veselos kontroles audos miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvai ekspresijai attiecīgi bija  $0,215 \pm 0,233$  (0,142; 0,375),  $0,720 \pm 0,820$  (0,467; 1,287),  $0,558 \pm 0,493$  (0,432; 0,925),  $0,034 \pm 0,100$  (0,012; 0,112) un  $0,803 \pm 0,633$  (0,487; 1,120). Salīdzinot mikroRNS relatīvās ekspresijas krūts vēža un veselos kontroles audos, konstatēja, ka miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvā ekspresija ir statistiski ticami augstāka krūts vēža audos kā kontroles audos ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  un  $p = 0,002$  attiecīgi; Manna–Vitneja U tests) (rezultāti redzami 3.2.1.1. līdz 3.2.1.4. attēlā).



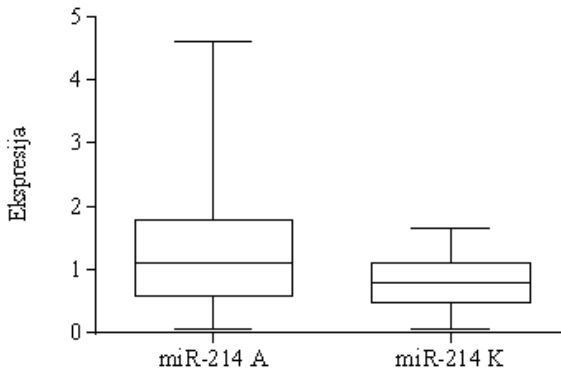
3.2.1.1. att. **MiR-21** relatīvās ekspresijas atšķirības krūts vēža un veselos kontroles audos;  $p < 0,0001$   
 A – krūts vēža audi, K – veseli kontroles audi



3.2.1.2. att. **MiR-29a** relatīvās ekspresijas atšķirības krūts vēža un veselos kontroles audos;  $p < 0,0001$   
 A – krūts vēža audi, K – veseli kontroles audi

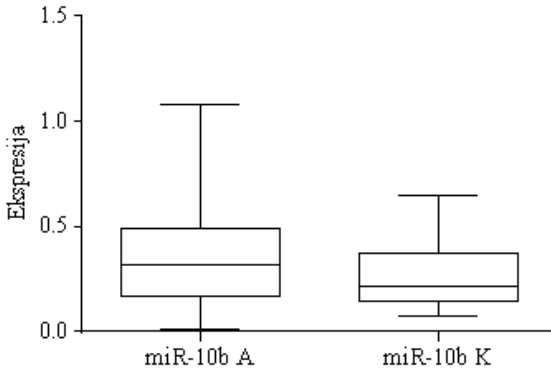


3.2.1.3. att. **MiR-31** relatīvās ekspresijas atšķirības krūts vēža un veselos kontroles audos;  $p < 0,0001$   
 A – krūts vēža audi, K – veseli kontroles audi



3.2.1.4. att. **MiR-214** relatīvās ekspresijas atšķirības krūts vēža un veselos kontroles audos;  $p = 0,002$   
 A – krūts vēža audi, K – veseli kontroles audi

MiR-10b gadījumā nenovēroja statistiski ticamas atšķirības starp krūts vēža audiem un veseliem kontroles audiem ( $p = 0,081$ ; Mann–Vitneja tests) (rezultāti redzami 3.2.1.5. attēlā).

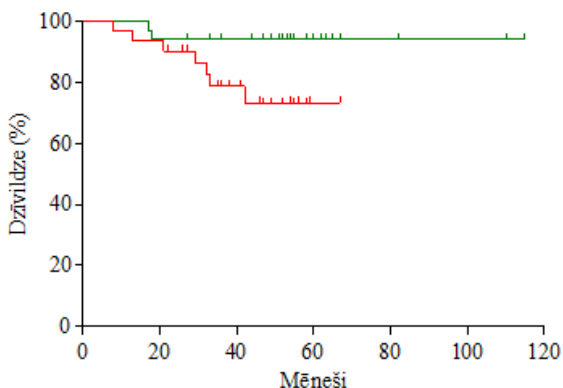


3.2.1.5. att. **MiR-10b relatīvās ekspresijas atšķirības krūts vēža un veselos kontroles audos;  $p=0,081$**

A – krūts vēža audi, K – veseli kontroles audi

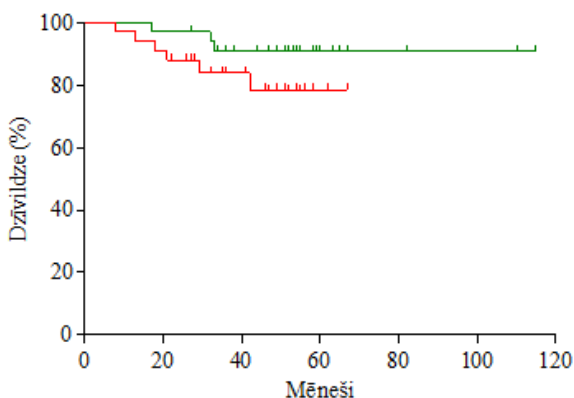
### 3.2.2. Krūts vēža kopējās dzīvildzes izvērtēšana saistībā ar augstu un zemu mikroRNS relatīvo ekspresiju

Četru dažādu mikroRNS: miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvās ekspresijas audzēja audos izvērtēja saistībā ar krūts vēža kopējo dzīvildzi. Par augstu mikroRNS relatīvo ekspresiju atzina vērtību, kas bija augstāka par relatīvās ekspresijas mediāno vērtību, savukārt par zemu ekspresiju – vērtību, kas bija zemāka par relatīvās ekspresijas mediāno vērtību. MikroRNS: miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvās ekspresijas mediānā vērtība krūts vēža audos attiecīgi bija 5,960, 1,400, 0,280 un 1,120. Krūts vēža pacientēm ar augstu miR-31 un miR-214 relatīvo ekspresiju krūts vēža audos novēroja tendenci sliktākai krūts vēža kopējai dzīvildzei kā pacientēm ar zemu ekspresiju (HR=0,283, 95% CI: 0,076–1,052,  $p=0,0596$ ) un (HR=0,413, 95% CI: 0,111–1,542,  $p=0,188$ ). Novērojumi nerasniedza statistiskās ticamības sliekšni (rezultāti redzami 3.2.2.1. un 3.2.2.2. attēlā).



3.2.2.1. att. **Krūts vēža kopējā dzīvildze saistībā ar augstu un zemu miR-31 relatīvo ekspresiju krūts vēža audos; p=0,0596**

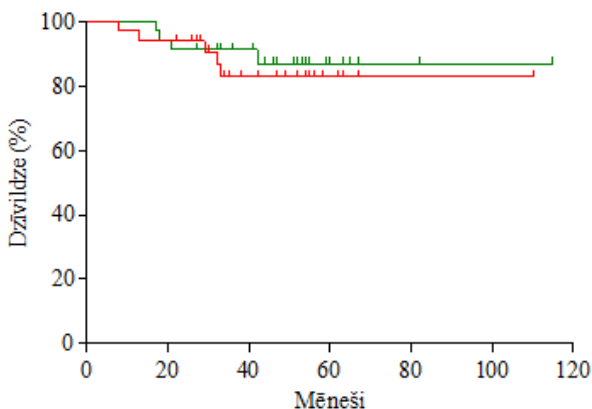
Oranža līnija – augsta ekspresija; zaļa līnija – zema ekspresija



3.2.2.2. att. **Krūts vēža kopējā dzīvildze saistībā ar augstu un zemu miR-214 relatīvo ekspresiju krūts vēža audos; p=0,188**

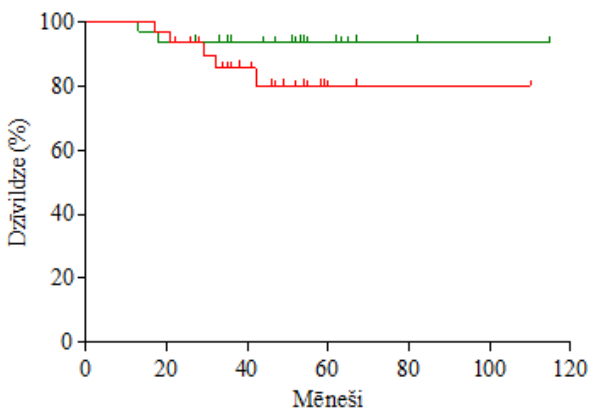
Oranža līnija – augsta ekspresija; zaļa līnija – zema ekspresija

Krūts vēža pacientēm ar augstu un zemu miR-21 un miR-29a relatīvo ekspresiju nenovēroja statistiski ticamas atšķirības krūts vēža kopējā dzīvildzē (HR=0,744, 95% CI: 0,201–0,754, p=0,658) un (HR=0,397, 95% CI: 0,090–1,752, p=0,222) (rezultāti redzami 3.2.2.3. un 3.2.2.4. attēlā).



3.2.2.3. att. **Krūts vēža kopējā dzīvildze saistībā ar augstu un zemu miR21 relatīvo ekspresiju krūts vēža audos;  $p=0,658$**

Oranža līnija – augsta ekspresija; zaļa līnija – zema ekspresija

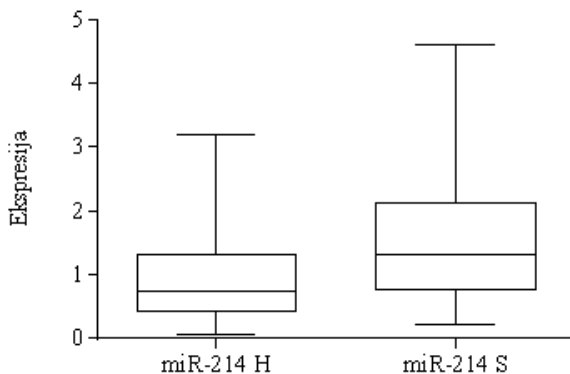


3.2.2.4. att. **Krūts vēža kopējā dzīvildze saistībā ar augstu un zemu miR-29a relatīvo ekspresiju krūts vēža audos;  $p=0,222$**

Oranža līnija – augsta ekspresija; zaļa līnija – zema ekspresija

### 3.2.3. MikroRNS relatīvās ekspresijas atšķirības pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos

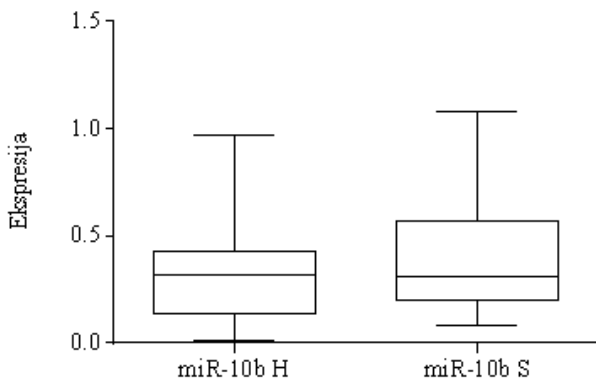
Piecu dažādu mikroRNS (miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214) relatīvās ekspresijas salīdzināja pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos. Mediāna  $\pm$  starpkvartīļu amplitūda (Q1; Q3) pārmantotos krūts vēža audos miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvai ekspresijai attiecīgi bija  $0,320 \pm 0,290$  (0,135; 0,425),  $5,640 \pm 4,540$  (2,520; 7,060),  $1,330 \pm 1,500$  (0,530; 2,030),  $0,220 \pm 0,455$  (0,042; 0,497) un  $0,755 \pm 0,910$  (0,417; 1,327). Mediāna  $\pm$  starpkvartīļu amplitūda (Q1; Q3) sporādiskos krūts vēža audos miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvai ekspresijai attiecīgi bija  $0,305 \pm 0,370$  (0,200; 0,570),  $6,550 \pm 8,940$  (2,610; 11,550),  $1,430 \pm 1,255$  (0,800; 2,055),  $0,300 \pm 0,510$  (0,125; 0,635) un  $1,325 \pm 1,362$  (0,778; 2,140). Salīdzinot mikroRNS relatīvo ekspresiju atšķirības pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos, konstatēja, ka miR-214 relatīvā ekspresija ir statistiski ticami augstāka sporādiskos krūts vēža audos kā pārmantotos krūts vēža audos ( $p=0,003$ ) (rezultāti redzami 3.2.3.1. attēlā).



3.2.3.1. att. **MiR-214 relatīvās ekspresijas atšķirības pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos;  $p=0,003$**

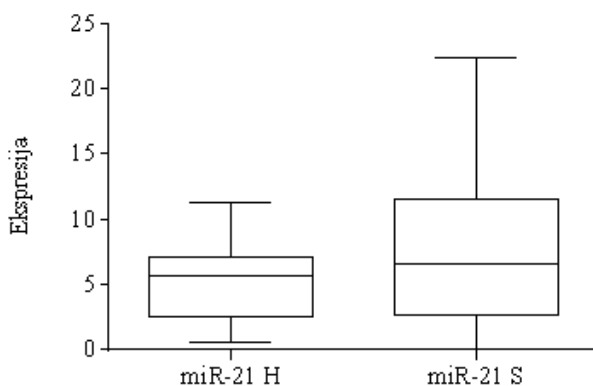
H – pārmantoti krūts vēža audi, S – sporādiski krūts vēža audos

Relatīvās ekspresijas miR-10b, miR-21, miR-29a un miR-31 gadījumā statistiski ticami neatšķirās starp pārmantotiem un sporādiskiem krūts vēža audiem ( $p=0,431$ ,  $p=0,332$ ,  $p=0,909$ , un  $p=0,188$  attiecīgi) (rezultāti redzami 3.2.3.2. līdz 3.2.3.5. attēlā).



3.2.3.2. att. **MiR-10b** relatīvās ekspresijas atšķirības pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos;  $p=0,431$

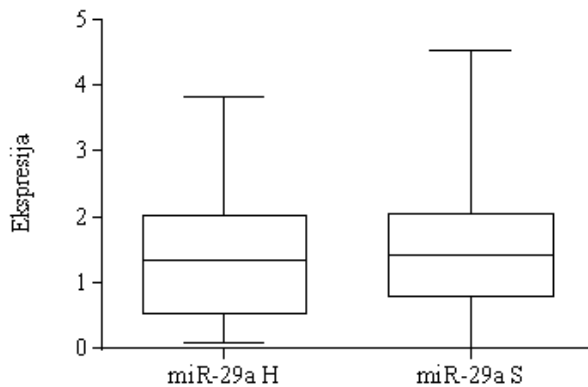
H – pārmantoti krūts vēža audi, S – sporādiski krūts vēža audi



3.2.3.3 att. **MiR-21** relatīvās ekspresijas atšķirības pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos;  $p=0,332$

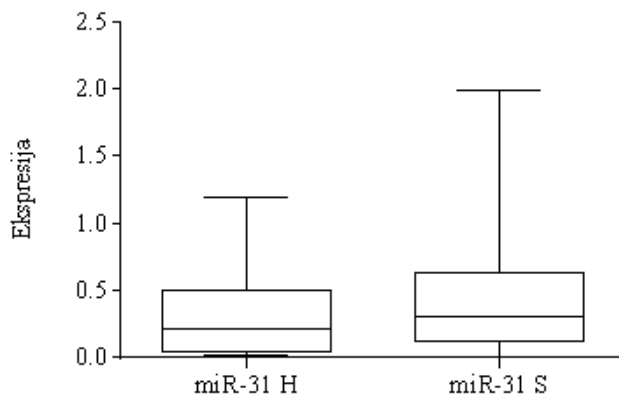
H – pārmantoti krūts vēža audi, S – sporādiski krūts vēža audi





3.2.3.4. att. **MiR-29a** relatīvās ekspresijas atšķirības pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos;  $p=0,909$

H – pārmantoti krūts vēža audi, S – sporādiski krūts vēža audi

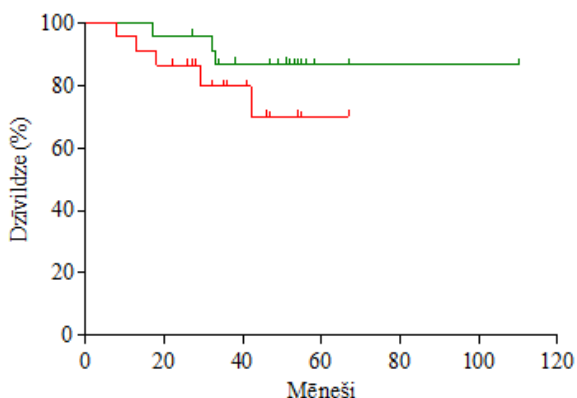


3.2.3.5. att. **MiR-31** relatīvās ekspresijas atšķirības pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos;  $p=0,188$

H – pārmantoti krūts vēža audi, S – sporādiski krūts vēža audi

### 3.2.4. Krūts vēža kopējās dzīvildzes izvērtēšana pacientēm ar augstu un zemu miR-214 relatīvo ekspresiju sporādiskos krūts vēža audos

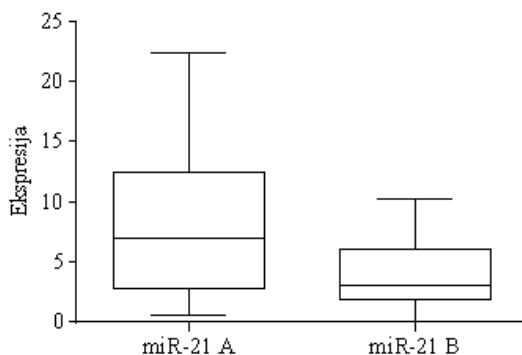
Sporādiska krūts vēža pacientēm izvērtēja krūts vēža kopējo dzīvildzi saistībā ar augstu un zemu miR-214 relatīvo ekspresiju audzēja audos. Par augstu relatīvo ekspresiju atzina vērtību, kas bija augstāka par relatīvās ekspresijas mediāno vērtību, savukārt par zemu ekspresiju – vērtību, kas bija zemāka par relatīvās ekspresijas mediāno vērtību. MiR-214 relatīvās ekspresijas mediānā vērtība sporādiskos krūts vēža audos bija 1,370. Krūts vēža pacientēm ar augstu un zemu miR-214 relatīvu ekspresiju sporādiskos krūts vēža audos nenovēroja statistiski ticamas atšķirības krūts vēža kopējā dzīvildzē (HR=0,421 95% CI: 0,102–1,734, p=0,231) (rezultāti redzami 3.2.4.1. attēlā).



3.2.4.1. att. Krūts vēža kopējā dzīvildze saistībā ar augstu un zemu miR-214 relatīvo ekspresiju sporādiskos krūts vēža audos; p=0,231  
Oranža līnija – augsta ekspresija; zaļa līnija – zema ekspresija

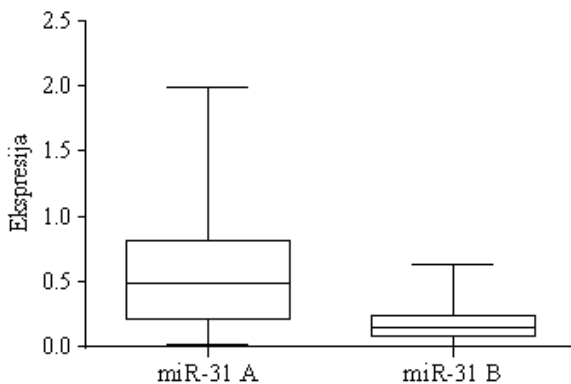
### 3.2.5. MikroRNS relatīvā ekspresija TN un LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audos

Piecu dažādu mikroRNS (miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214) relatīvās ekspresijas izvērtēja TN krūts vēža audos attiecībā pret LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audiem. Mediāna  $\pm$  starpkvartīļu amplitūda (Q1; Q3) TN krūts vēža audos miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvai ekspresijai attiecīgi bija  $0,325 \pm 0,363$  (0,192; 0,555),  $6,990 \pm 9,595$  (2,855; 12,450),  $1,485 \pm 1,330$  (0,832; 2,162),  $0,490 \pm 0,610$  (0,210; 0,820) un  $1,455 \pm 1,645$  (0,607; 2,252). Mediāna  $\pm$  starpkvartīļu amplitūda (Q1; Q3) LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audos miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvai ekspresijai attiecīgi bija  $0,240 \pm 0,275$  (0,120; 0,395),  $3,090 \pm 4,215$  (1,877; 6,092),  $0,975 \pm 1,138$  (0,510; 1,648),  $0,155 \pm 0,155$  (0,087; 0,242) un  $0,945 \pm 0,585$  (0,575; 1,160). Trīskārši negatīvos krūts vēža audos miR-21, miR-31 un miR-214 relatīvā ekspresija bija statistiski ticami augstāka nekā LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audos ( $p=0,002$ ,  $p<0,0001$  un  $p=0,012$  attiecīgi; Manna–Vitneja U tests) (rezultāti redzami 3.2.5.1. līdz 3.2.5.3. attēlā).



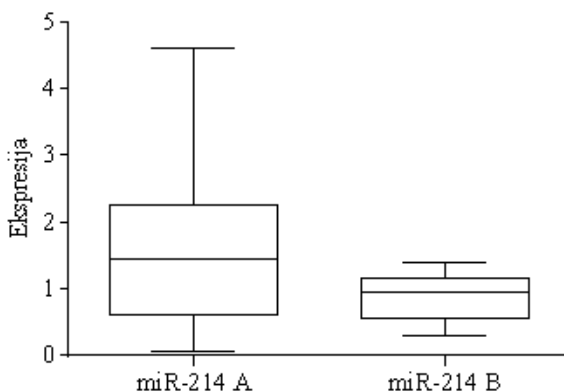
3.2.5.1. att. **MiR-21** relatīvās ekspresijas atšķirības TN un LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audos;  $p=0,002$

A – TN vēža audi, B – LA, LB un HER2 krūts vēža audi



3.2.5.2. att. **MiR-31 relatīvās ekspresijas atšķirības TN un LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audos;  $p < 0,0001$**

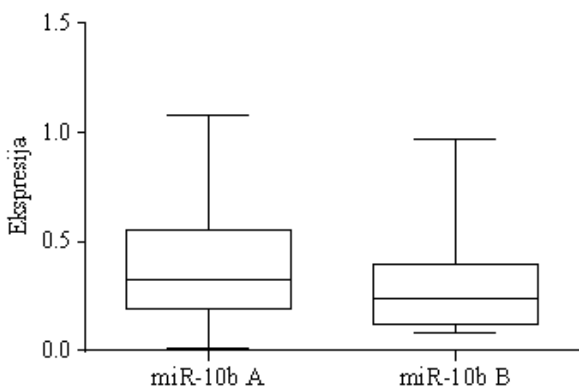
A – TN vēža audi, B – LA, LB un HER2 krūts vēža audi



4.2.5.3. att. **MiR-214 relatīvās ekspresijas atšķirības TN un LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audos;  $p = 0,012$**

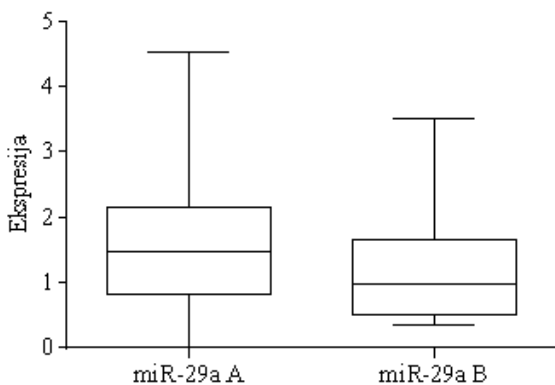
A – TN vēža audi, B – LA, LB un HER2 krūts vēža audi

Relatīvās ekspresijas miR-10b un miR-29a gadījumā starp TN un LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audiem statistiski ticami neatšķirās ( $p = 0,190$  un  $p = 0,171$ ; Manna–Vitneja U tests) (rezultāti redzami 3.2.5.4. un 3.2.5.5. attēlā).



3.2.5.4. att. **MiR-10b** relatīvās ekspresijas atšķirības TN un LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audos;  $p=0,190$

A – TN vēža audi, B – LA, LB un HER2 krūts vēža audi

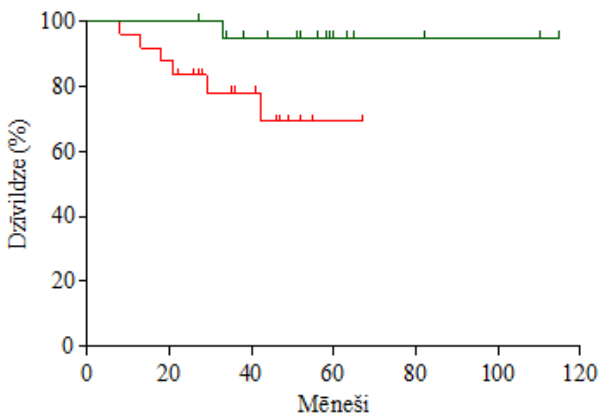


3.2.5.5. att. **MiR-29a** relatīvās ekspresijas atšķirības TN un LA, LB un HER2 grupas krūts vēža audos;  $p=0,171$

A – TN vēža audi, B – LA, LB un HER2 krūts vēža audi

### 3.2.6. Krūts vēža kopējās dzīvildzes izvērtēšana saistībā ar augstu un zemu mikroRNS relatīvo ekspresiju TN krūts vēža pacientēm

Krūts vēža kopējo dzīvildzi TN krūts vēža pacientēm izvērtēja saistībā ar augstu un zemu noteiktu mikroRNS relatīvo ekspresiju audzēja audos. To noteica tiem mikroRNS, kuru relatīvā ekspresija bija statistiski ticami augstāka TN kā LA, LB un HER2 krūts vēža audos. Par augstu mikroRNS relatīvo ekspresiju atzina vērtību, kas bija augstāka par relatīvās ekspresijas mediāno vērtību, savukārt par zemu – vērtību, kas bija zemāka par relatīvās ekspresijas mediāno vērtību. MiR-21, miR-31 un miR-214 relatīvās ekspresijas mediānā vērtība TN krūts vēža audos attiecīgi bija 6,99, 0,48 un 1,45. TN krūts vēža pacientēm ar augstu miR-214 relatīvo ekspresiju bija statistiski ticami sliktāka krūts vēža kopējā dzīvildze kā pacientēm ar zemu miR-214 relatīvo ekspresiju (HR=5,152, 95% CI:1,158–22,930, p=0,0314) 3.2.6.1. attēls

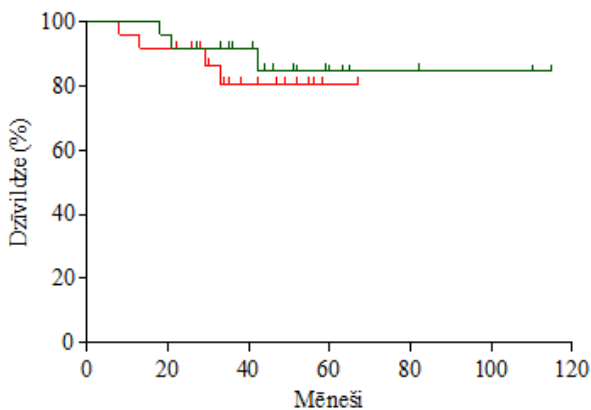


3.2.6.1. att. **Krūts vēža kopējā dzīvildze augstas un zemas miR-214 relatīvās ekspresijas gadījumā TN krūts vēža pacientēm; p=0,0314**

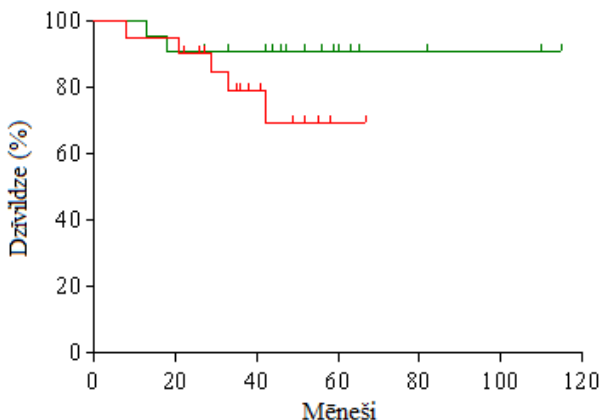
Oranža līnija – augsta ekspresija; zaļa līnija – zema ekspresija

Salīdzinot TN krūts vēža pacienšu sadalījumu pēc miR-214 relatīvās ekspresijas, novēroja, ka TNS krūts vēža pacienšu krūts vēža kopējā dzīvildze

statistiski ticami neatšķirās starp augstu un zemu miR-21 un miR-31 relatīvo ekspresiju audzēju audos (HR=1,443, 95% CI: 0,328–6,367, p=0,628) un (HR=2,622, 95% CI: 0,591–11,630, p=0,205) (rezultāti redzami 3.2.6.2. un 3.2.6.3. attēlā).



3.2.6.2. att. **Krūts vēža kopējā dzīvildze augstas un zemas miR-21 relatīvās ekspresijas gadījumā TN krūts vēža pacientēm; p=0,628**  
Oranža līnija – augsta ekspresija; zaļa līnija – zema ekspresija



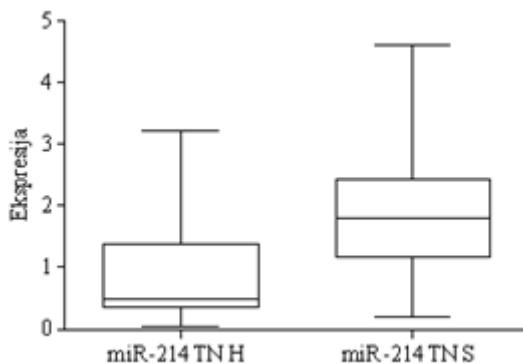
3.2.6.3. att. **Krūts vēža kopējā dzīvildze augstas un zemas miR-31 relatīvās ekspresijas gadījumā TN krūts vēža pacientēm; p=0,205**

Oranža līnija – augsta ekspresija; zaļa līnija – zema ekspresija

### 3.2.7. MikroRNS relatīvā ekspresija TN pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos

Piecu dažādu mikroRNS (miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214) relatīvās ekspresijas izvērtēja TN pārmantotos (TNH) un sporādiskos (TNS) krūts vēža audos. Mediāna ± starpkvartīļu amplitūda (Q1; Q3) miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvai ekspresijai TNH krūts vēža audos attiecīgi bija  $0,275 \pm 0,287$  (0,122; 0,408),  $5,725 \pm 4,250$  (2,408; 6,658),  $1,330 \pm 1,552$  (0,478; 2,030),  $0,254 \pm 0,642$  (0,041; 0,684) un  $0,489 \pm 1,027$  (0,350; 1,378). Mediāna ± starpkvartīļu amplitūda (Q1; Q3) miR-10b, miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214 relatīvai ekspresijai TNS krūts vēža audos attiecīgi bija  $0,330 \pm 0,381$  (0,249; 0,631),  $9,580 \pm 7,545$  (5,405; 12,950),  $1,490 \pm 0,990$  (1,180; 2,170),  $0,592 \pm 0,487$  (0,332; 0,819) un  $1,800 \pm 1,250$  (1,170; 2,420). miR-214 relatīvā ekspresija bija statistiski ticami augstāka TNS krūts vēža audos kā TNH krūts vēža audos ( $p=0,0005$ ; Manna–Vitneja tests) (rezultāti redzami 3.2.7.1. attēlā).

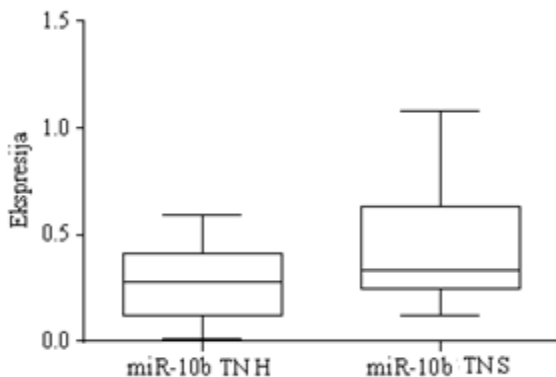




**3.2.7.1. att. MiR-214 relatīvās ekspresijas atšķirības TN pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos; p=0,0005**

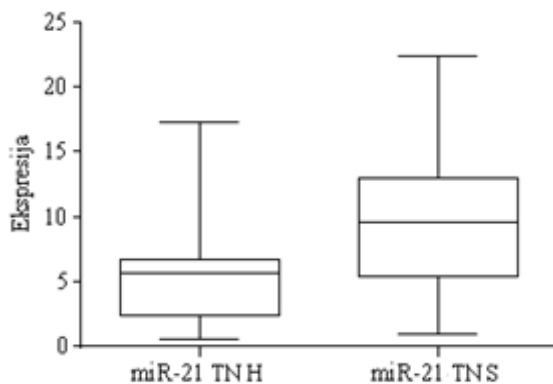
TNH – TN pārmantoti krūts vēža audi, TNS – TN sporādiski krūts vēža audi

MikroRNS: miR-10b, miR-21 un miR-31 relatīvās ekspresijas bija augstākas TNS kā TNH krūts vēža audos ( $p=0,0516$ ,  $p=0,0501$  un  $0,0597$ , attiecīgi; Manna–Vitneja tests), tomēr tikai miR-214 sasniedza augstu statistiskās ticamības sliekšni, pārējo mikroRNS gadījumā atšķirības starp abām grupām tika uzskatītas par ne gluži statistiski ticamām. Rezultāti redzami 3.2.7.2. līdz 3.2.7.4 attēlā.



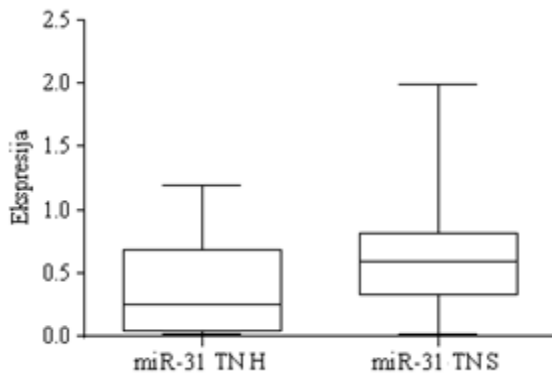
3.2.7.2. att. **MiR-10b** relatīvās ekspresijas atšķirības TN pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos;  $p=0,0516$

TNH – TN pārmantoti krūts vēža audi, TNS – TN sporādiski krūts vēža audi



3.2.7.3. att. **MiR-21** relatīvās ekspresijas atšķirības TN pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos;  $p=0,0501$

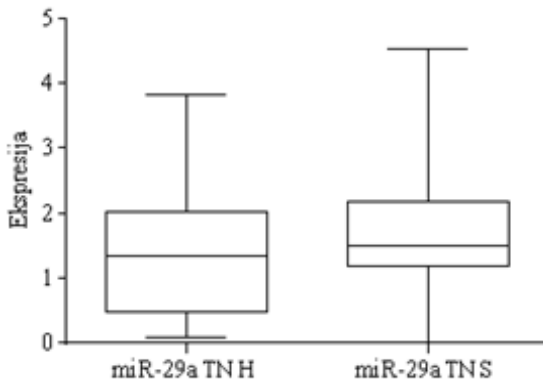
TNH – TN pārmantoti krūts vēža audi, TNS – TN sporādiski krūts vēža audi



3.2.7.4. att. **MiR-31** relatīvās ekspresijas atšķirības TN pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos;  $p=0,0597$

TNH – TN pārmantoti krūts vēža audi, TNS – TN sporādiski krūts vēža audi

MiR-29a relatīvā ekspresija starp TNH un TNS krūts vēža audiem statistiski ticami neatšķīrās ( $p=0,4574$ ) (rezultāti redzami 3.2.7.5. attēlā).



3.2.7.5. att. **MiR-29a** relatīvās ekspresijas atšķirības TN pārmantotos un sporādiskos krūts vēža audos;  $p=0,4574$

TNH – TN pārmantoti krūts vēža audi, TNS – TN sporādiski krūts vēža audi

### 3.3. TNH un TNS krūts vēža pacientu klīnisko datu analīze

TNH un TNS krūts vēža pacientēm veica klīnisko datu analīzi. TNH krūts vēža pacientu mediānais vecums (amplitūda) diagnozes brīdī bija 46 (27–72) gadi, savukārt sporādiska krūts vēža pacientu mediānais vecums (amplitūda) diagnozes brīdī bija 55 (28–78) gadi. Salīdzinot abas grupas, konstatēja, ka TNH krūts vēža pacientu diagnozes brīdī bija statistiski ticami jaunākas nekā TNS krūts vēža pacientu ( $p=0,0300$ ; t-tests). TNH un TNS krūts vēža pacientēm salīdzināja TNM stadijas diagnozes brīdī. Salīdzinot T stadijas starp TNH un TNS grupu, netika konstatētas statistiski ticamas atšķirības ( $p=0,3021$ ; Fišera tests). Arī N un M stadijas starp abām grupām statistiski ticami neatšķīrās ( $p=0,3324$ ; Fišera tests) un ( $p=0,5412$ ; Fišera tests) attiecīgi. Salīdzinot TNH un TNS grupas klīniskās stadijas, netika konstatētas statistiski ticamas atšķirības ( $p=0,1438$ ; Fišera tests). TNS krūts vēža pacientēm biežāk novēroja duktaļu audzēja histoloģisko tipu kā TNH krūts vēža pacientēm ( $p=0,0370$ ; Fišera tests). TNH un TNS krūts vēža pacientu klīnisko datu raksturojums un salīdzinājums ir redzams 3.3.1.tabulā.

3.3.1. tabula

#### TNH un TNS krūts vēža pacientu klīnisko datu raksturojums

Raksturojums	TNH N=18 N (%)	TNS N=32 N (%)	p vērtība
Mediānais vecums (amplitūda)	46 (27–72)	55 (28–78)	0,0300
T stadijas			0,3021
T <sub>1</sub>	7 (38,89)	7 (21,88)	
T <sub>2</sub>	6 (33,33)	16 (50,00)	
T <sub>3</sub>	2 (11,11)	7 (21,88)	
T <sub>4</sub>	3(16,67)	2 (6,25)	

3.3.1. tab. turpinājums

Raksturojums	TNH N=18 N (%)	TNS N=32 N (%)	p vērtība
N stadijas			
N <sub>0</sub>	8 (44,44)	15 (46,88)	0,3324
N <sub>1</sub>	-	6 (18,75)	
N <sub>2</sub>	5 (27,78) 1	8 (25,00)	
N <sub>3</sub>	(5,56)	2 (6,25)	
Nav datu	4 (22,22)	1 (3,13)	
M stadijas			
M <sub>0</sub>	14 (77,78)	31 (96,87)	0,5412
M <sub>1</sub>	1 (5,56)	1 (3,13)	
Nav datu	3(16,67)	-	
Stadijas			
I	7 (38,89)	4 (12,50)	0,1438
II	5 (27,78)	15 (46,88)	
III	5 (27,78)	12 (37,50)	
IV	1 (5,56)	1 (3,13)	
Histoloģiskais tips			
D	9 (50,00)	27 (84,38)	0,0370
L	-	1 (3,13)	
M	4 (22,22)	2 (6,25)	
P	1 (5,56)	-	
D+M	1 (5,56)	-	
D+P	1 (5,56)	1 (3,13)	
Nav datu	2 (11,11)	1 (3,13)	
Diferenciācija			
G2	2 (11,11)	1 (3,13)	0,2763
G3	12 (66,67)	25 (78,13)	
Nav datu	4 (22,22)	6 (18,75)	
Audzēja izmērs			
≤ 50 mm	13 (72,22)	23 (71,88)	0,7438
> 50 mm	5 (27,78)	9 (28,13)	

3.3.1. tab. turpinājums

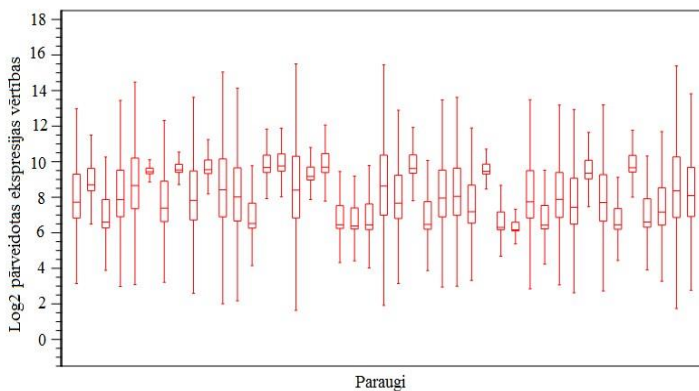
Raksturojums	TNH N=18 N (%)	TNS N=32 N (%)	p vērtība
Mediānais Ki67 (%) (amplitūda)	75 (33-97)	70 (27-98)	0,4269
Recidīvis			
Jā	3 (16,67)	3 (9,37)	0,6538
Nē	15 (83,33)	29 (90,63)	
Nāve			
Jā	1 (5,56)	6 (18,75)	0,3978
Nē	17 (94,44)	26 (81,25)	

### 3.4. TN krūts vēža pacienšu gēnu ekspresijas analīze

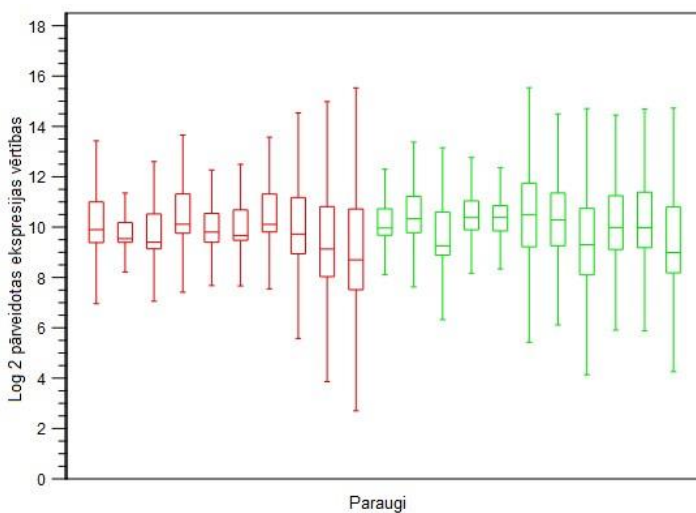
#### 3.4.1. Gēnu ekspresijas datu analīze, izmantojot *CLC Workbench*

Gēnu ekspresijas datus analizēja un vizualizēja, izmantojot CLC Workbench 7, vadoties pēc ražotāja instrukcijām.

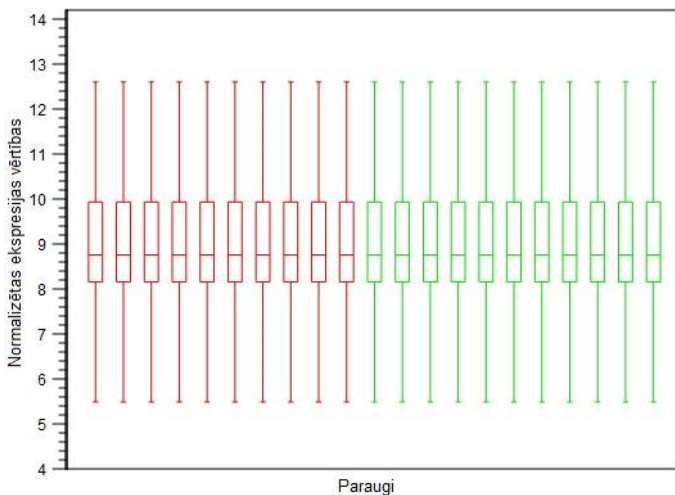
Gēnu ekspresijas profila analīzi noteica 18 TNH un 30 TNS krūts vēža pacientēm. Ģenētiskais analizators nolasīja 43 TN krūts vēža pacienšu paraugu šūnas uz mikročipa, 5 paraugu šūnas to sliktās kvalitātes dēļ netika nolasītas. Tālākā datu analīzē iekļāva 43 (15 TNH un 28 TNS) krūts vēža pacienšu datus. Iegūtajiem gēnu ekspresijas datiem veica kvalitātes kontroles pārbaudi, izmantojot kvartīles. Tā kā datu izkliede starp paraugiem bija pārāk liela (3.4.1.1. attēls) un daļa paraugu neatbilda kvalitātes kontroles prasībām, tad datu tālākai apstrādei atlasīja 21 (10 TNH un 11 TNS) krūts vēža pacientu gēnu ekspresijas datus. Iegūtos datus  $\text{Log}_2$  pārveidoja (3.4.1.2. attēls) un normalizēja, un veica atkārtotu kvalitātes kontroles pārbaudi. Visi atlasītie paraugi atbilda kvalitātes kontroles kritērijiem un tika iekļauti tālākā datu analīzē (3.4.1.3. attēls).



3.4.1.1. att. Iegūto gēnu ekspresijas datu izklike  $\text{Log}_2$  pārveidotām ekspresijas vērtībām



3.4.1.2. att. Gēnu ekspresijas datu izklike  $\text{Log}_2$  pārveidotiem datiem

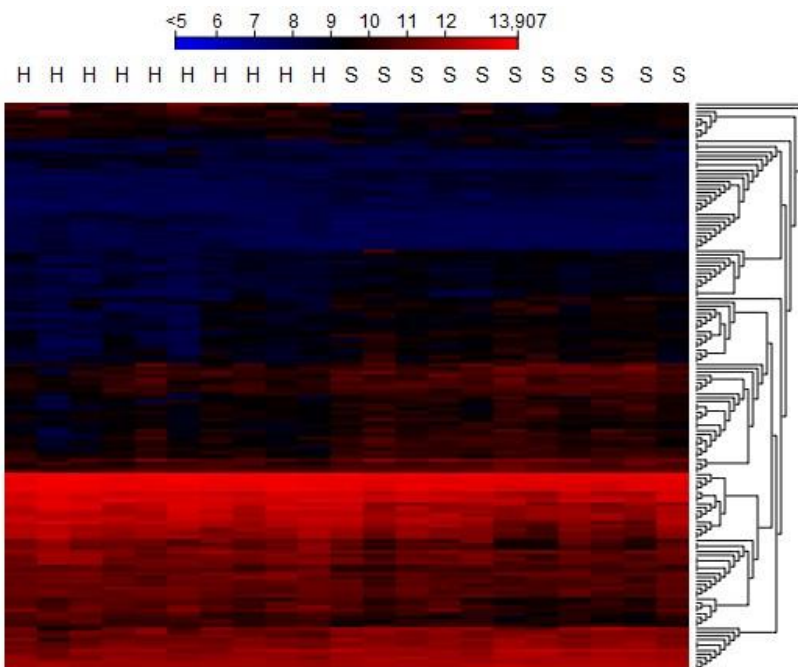


3.4.1.3. att. Gēnu ekspresijas datu izkliede normalizētām ekspresijas vērtībām

### 3.4.2. TN krūts vēža pacienšu gēnu ekspresijas profila analīze

Gēnu ekspresijas analīzei izmantoja 10 TNH un 11 TNS krūts vēža pacienšu gēnu ekspresijas datus. Iegūtos gēnu ekspresijas profilus salīdzināja 10 TNH un 11 TNS krūts vēža pacientēm. Gēnu ekspresijas profila karte pirms datu filtrēšanas TN krūts vēža pacientēm redzama 3.4.2.1. attēlā.

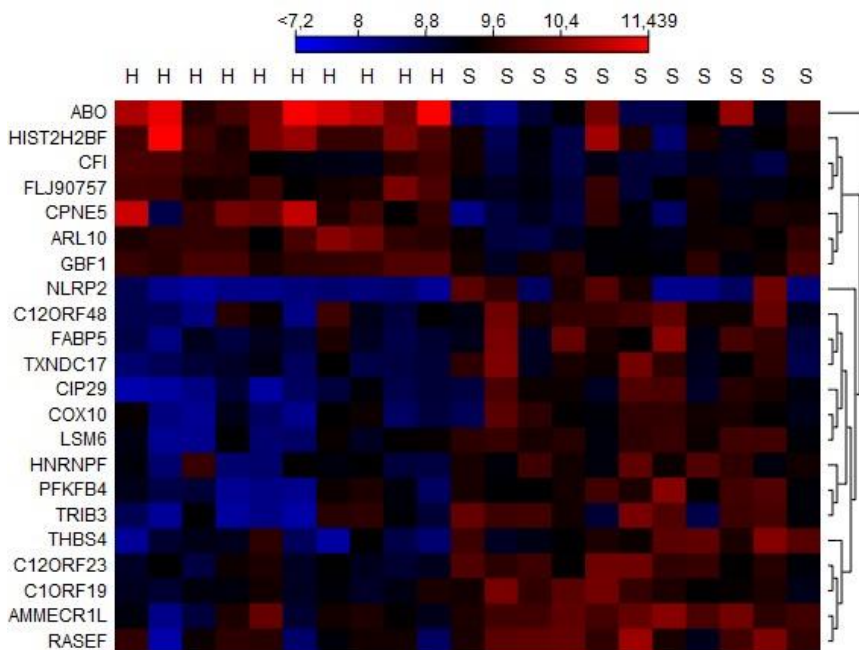




**3.4.2.1. att. Gēnu ekspresijas profils pirms ekspresijas datu filtrēšanas TN krūts vēža pacientēm**

H – TN pārmantoti krūts vēža audi, S – TN sporādiski krūts vēža audi

Lai noteiktu gēnu ekspresijas profila atšķirības starp pārmantoto un sporādisko grupu, veica t-testu ar tam secīgu iegūto datu atlasī zem sliekšņa līmeņa, kas bija mazāks par  $p < 0,0005$ . Starp pārmantoto un sporādisko krūts vēža grupu atrada 22 atšķirīgi ekspresētus gēnus (rezultāti redzami 3.4.2.2. attēlā).



3.4.2.2. att. **Gēnu ekspresijas profila atšķirības starp TN pārmantotu un sporādisku krūts vēža grupu;  $p < 0,0005$**

H – TN pārmantoti krūts vēža audi, S – TN sporādiski krūts vēža audi

TNH krūts vēža audos 7 gēnu (*ABO*, *HIST2H2BF*, *CFI*, *FLJ90757*, *CPNE5*, *ARL10* un *GBF1*) ekspresija bija augstāka nekā TNS krūts vēža audos. Savukārt TNS krūts vēža audos augstāku ekspresiju novēroja *NLRP2*, *C12ORF48*, *FABP5*, *TXNDC17*, *CIP29*, *COX10*, *LSM6*, *HNRNPF*, *PFKFB4*, *TRIB3*, *THBS4*, *C12ORF23*, *C1ORF19*, *AMMECR1L* un *RASEF* gēnā kā TNH krūts vēža audos. Atšķirīgi atrasto gēnu nosaukumi ir atšifrēti 3.4.2.1. tabulā.

**Starp TNH un TNS grupu atšķirīgi ekspresētie gēni**

Gēns	Gēna nosaukums*
<i>ABO</i>	transferāze-A, alfa 1-3-N-acetilgalaktozaminiltransferāze; transferāze B, alfa 1-3-galaktoziltransferāze
<i>HIST2H2BF</i>	histonu klasteris 2, H2bf
<i>CFI</i>	komplementa faktors I
<i>FLJ90757</i>	BAIAP2 antisens RNS 1
<i>CPNE5</i>	kopīns V
<i>ARL10</i>	ATF-ribozilēšanas faktoram-līdzīgs 10
<i>GBF1</i>	goldži brefeldina A rezistences guanīna nukleotīdu apmaiņas faktors 1
<i>NLRP2</i>	NLK ģimene, pirīna 2 domēnu saturošs
<i>C12ORF48</i>	hromosomas 1 atvērts lasīšanas rāmis
<i>FABP5</i>	tauskābju piesaistes proteīns 5
<i>TXNDC17</i>	tioredoksīna domēnu saturošs 17
<i>CIP29</i>	SAP domēnu-saturošs ribonukleoproteīnam līdzīgs
<i>COX10</i>	citohroma c oksidāzes homologs 10
<i>LSM6</i>	LSM6 homologs, ar U6 īsu kodola RNS saistīts
<i>HNRNPF</i>	heterogēns kodola ribonukleoproteīns
<i>PFKFB4</i>	6-fosfofrukto-2-kināze/fruktoze-2,6-bifosfatāze 4
<i>TRIB3</i>	tribbles pseidokināze
<i>THBS4</i>	trombospondīns-4
<i>C12ORF23</i>	transmembrānas proteīns 263
<i>AMMECR1L</i>	AMMECR1-līdzīgs
<i>C1ORF19</i>	TSEN15 tRNS splaisinga endonukleāzes subvienība
<i>RASEF</i>	RAS un EF-domēnu saturošs

\*NCBI- National Center for Biotechnology Information

### 3.4.3. Atšķirīgi atrasto gēnu analīze saistībā ar augstu un zemu mikroRNS ekspresiju

Veicot gēnu ekspresijas profila analīzi saistībā ar mikroRNS regulāciju, konstatēja, ka 3 gēnus (*C12ORF23*, *C1ORF19* un *AMMECRIL*) regulē miR-214. Lielākajā daļā gadījumu šie gēni bija mazāk ekspresēti TNH kā TNS krūts vēža audos. Savukārt iepriekš tika noteikts, ka miR-214 relatīvā ekspresija ir zemāka TNH kā TNS krūts vēža audos. Ņemot vērā iepriekš minēto, tika veikta analīze starp *C12ORF23*, *C1ORF19* un *AMMECRIL* gēnu ekspresiju un relatīvo

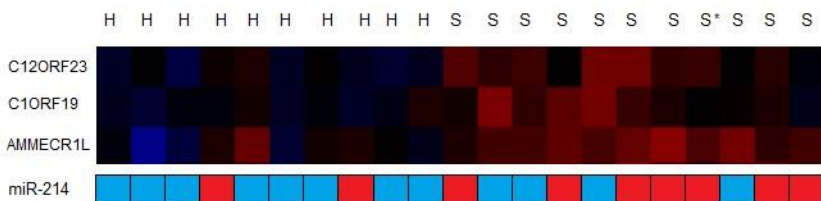
miR-214 ekspresiju, par pamatu ņemot augstu un zemu šī mikroRNS ekspresiju (augsta un zema ekspresija iepriekš bija definēta attiecīgi kā vērtība, kas ir augstāka un zemāka par ekspresijas mediāno vērtību). Analizējot *C12ORF23* gēna ekspresiju saistībā ar miR-214, konstatēja, ka 7 TNH krūts vēža pacientu gēna ekspresija sakrīt ar miR-214 ekspresiju, kas tika definēta kā zema. Savukārt 6 TNH krūts vēža pacientu augsta *C12ORF23* gēna ekspresija sakrīta ar augstu miR-214 ekspresiju (3.4.3.1. attēls). *C1ORF19* gēna gadījumā ar zemu gēna ekspresiju 8 TNH krūts vēža pacientēm bija zema miR-214 ekspresija, savukārt 5 TNS krūts vēža pacientēm ar augsta gēna ekspresiju bija augsta miR-214 ekspresija (3.4.3.1. attēls). Zema *AMMECRIL* gēna ekspresija un zema miR-214 ekspresija bija 6 TNH krūts vēža pacientēm, savukārt augsta gēna un mikroRNS ekspresija bija 5 TNS krūts vēža pacientēm (3.4.3.1. attēls). Analizējot *C12ORF23* gēna ekspresiju ar miR-214 augstu un zemu ekspresiju, konstatēja, ka 9 TNH krūts vēža pacientēm ir zema gēna un zema miR-214 ekspresija. Arī 9 TNS krūts vēža pacientēm bija augsta gēna un augsta miR-214 relatīvā ekspresija (3.4.3.2. attēls). *TRIB3* gēna ekspresiju analizēja saistībā ar augstu un zemu miR-31 relatīvo ekspresiju. Zemu gēna un zemu mikroRNS ekspresiju novēroja 6 TN-H, savukārt augsta gēna un augsta miR-31 ekspresija bija 4 TNS krūts vēža pacientēm (3.4.3.3. attēls). Zema *AMMECRIL* gēna un

miR-31 ekspresija bija 3 TNH krūts vēža pacientēm, savukārt augsta gēna un augsta mikroRNS ekspresija bija 4 TNS krūts vēž pacientēm (3.4.3.3. attēls). *AMMECRIL* gēna ekspresiju analizēja saistībā ar augstu un zemu miR-29a relatīvo ekspresiju. Zema *AMMECRIL* gēna un zema miR-29a ekspresija bija 2 TNH krūts vēža pacientēm. Arī augsta gēna un augsta mikroRNS ekspresija bija 2 TNS krūts vēža pacientēm (3.4.3.4. attēls). Vadoties pēc analizētajiem rezultātiem, var secināt, ka to mikroRNS gadījumā, kas bija statistiski ticami atšķirīgi starp TNH un TNS grupu izvēlētais mediānais sliekšņa līmenis, kā līmenis, definējot augstu un zemu mikroRNS ekspresiju ir tuvu faktiskam, taču to ir nepieciešams optimizēt.

**Starp TNH un TNS grupu atšķirīgi atrastie gēni un mikroRNS, kas regulē šos mērķus krūts audzējā**

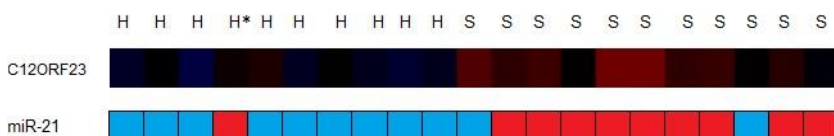
Gēns	mikroRNS regulācija*
<i>ABO</i>	-
<i>HIST2H2BF</i>	miR-623
<i>CFI</i>	miR-1253, miR-186
<i>FLJ90757</i>	miR-1226, miR-1233, miR-1300, miR-143, miR-665 u.c.
<i>CPNE5</i>	miR-1265, miR-220b, miR-223, miR-452, miR-486, miR-661 u.c.
<i>ARL10</i>	let-7a, miR-16, miR-204, miR-211, miR-224, miR-24 u.c.
<i>GBF1</i>	let-7a, miR-1205, miR-15b, miR-17, miR-1182, miR-20a, miR-194 u.c.
<i>NLRP2</i>	miR-580
<i>C12ORF48</i>	miR-10a, miR-134, miR-34a, miR-212 u.c.
<i>FABP5</i>	miR-144, miR-198, miR-203, miR-603, miR620 u.c.
<i>TXNDC17</i>	miR-641
<i>CIP29</i>	miR-1265, miR-1827, miR-320b, miR-335, miR-940 u.c.
<i>COX10</i>	miR-210
<i>LSM6</i>	miR-488, miR-518c
<i>HNRNPF</i>	miR-141, miR-144, miR-19a, miR-19b, miR-27a, miR-27b u.c.
<i>PFKFB4</i>	miR-122, miR-128, miR-188, miR-24, miR-27a, miR-34a u.c.
<i>TRIB3</i>	<b>miR-31</b> , miR-24, miR-204, miR-205, miR-211, miR-212, miR-1237 u.c.
<i>THBS4</i>	miR-190, miR-190b, miR-296-3-p, miR-299-3-p u.c.
<i>C12ORF23</i>	<b>miR-21</b> , <b>miR-214</b> , miR-15b, miR-30a, miR-106a u.c.
<i>CIORF19</i>	<b>miR-214</b> , miR-29b, miR-34a, miR143 u.c.
<i>AMMECR1L</i>	<b>miR-29a</b> , <b>miR-31</b> , <b>miR-214</b> , miR-101, miR-103 u.c.
<i>RASEF</i>	miR-34b, miR-143, miR-224, miR-492, miR-610 miR-630 u.c.

\*G2SBC- Gene-to System Breast Cancer Database



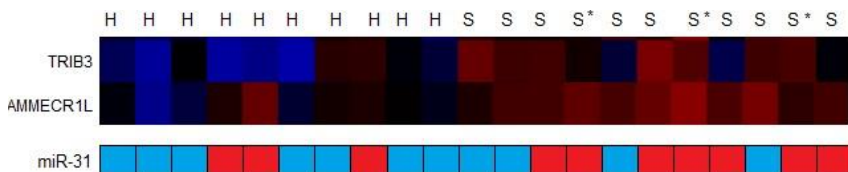
3.4.3.1. att. *C12ORF23*, *C10RF19* un *AMMECR1L* gēnu ekspresijas saistība ar augstu uz zemu miR-214 ekspresiju TN krūts vēža audos

\*Paraugs izņemts no analīzes – augsta ekstremāla miR-214 vērtība



3.4.3.2. att. *C12ORF23* gēna ekspresijas saistība ar augstu uz zemu miR-21 ekspresiju TN krūts vēža audos

\*Paraugs izņemts no analīzes – augsta ekstremāla miR-21 vērtība



3.4.3.3. att. *TRIB3* un *AMMECR1L* gēna ekspresija saistībā ar augstu uz zemu miR-31 ekspresiju TN krūts vēža audos

\*Paraugs izņemts no analīzes-augsta ekstremāla miR-31 vērtība

## 4. DISKUSIJA

Pētījumā TNS krūts vēža audos miR-214 ekspresija bija augstāka nekā TNH krūts vēža audos. Arī citā pētījumā miR-214 ekspresija bija novērota augstāka *BRCA1* gēna mutācijas gadījumā [Lee, 2009]. Augstas diferenciacijas pakāpes olnīcas vēža pacientēm ar *BRCA1* gēna mutāciju novēro augstāka miR-214 ekspresija kā pacientēm bez izmaiņām *BRCA1* gēnā [Lee, 2009]. TN krūts vēža pacientēm noteica krūts vēža kopējo dzīvildzi saistībā ar augstu un zemu miR-214 ekspresiju audzēja audos. TN krūts vēža pacientiem ar augstu miR-214 ekspresijas līmeni audzēja audos bija sliktāka kopējā dzīvildze kā pacientēm ar zemu miR-214 ekspresiju audzēja audos. Turklāt novēroja, ka grupā ar augstu miR-214 lielākā daļa pacienšu bija sporādiska krūts vēža pacientes. Grupā ar zemu miR-214 ekspresiju bija 13 (54%) TNH un 11 (46%) TNS krūts vēža pacientes, savukārt grupā ar augstu miR-214 bija 5 (21%) TNH un 19 (79%) TNS krūts vēža pacientes. Ir zināms, ka TNS krūts vēža pacientēm ir sliktāka dzīvi kā TNH krūts vēža pacientēm [Maksimenco, 2013]. Saskaņā ar šī pētījuma rezultātiem un citos pētījumos atrastiem, var secināt, ka miR-214 darbojas līdzīgi kā onkogēns. Citā pētījumā, kurā veica miR-214 ekspresijas noteikšanu serumā pirms un pēc operācijas, konstatēja, ka pirms operācijas miR-214 ekspresijas līmenis ir būtiski augstāks, turklāt augsta miR-214 ekspresija korelē ar pozitīvu limfmezglu statusu [Schwarzenbach, 2012]. miR-214 ir nozīme ne tikai olnīcu vēža attīstībā, bet arī krūts vēža attīstībā. Nav skaidrs, kā izmaiņas *BRCA1* gēnā ietekmē miR-214 ekspresijas izmaiņas olnīcu vēža gadījumā. Ir zināms, ka miR-214 regulē *PTEN* gēnu, un aktivējot *PTEN/AKT* signālceļu nodrošina šūnas spēju pretoties apoptozei [Yang, 2008].

Šajā pētījumā miR-10b ekspresija bija augstāka TNS krūts vēža audos kā TNH krūts vēža audos. Metastātiska krūts vēža gadījumā miR-10b ekspresija ir augstāka nekā primāra krūts vēža gadījumā [Ma, 2007]. mir10b bloķē *HOXD10* gēnu, kas savukārt inducē pro-metastātiskā gēna *RHOC*



aktivizēšanos

[Ma, 2007]. Augsta mir-10b ekspresija pozitīvi korelē ar audzēja izmēru, diferenciacijas pakāpi, klīnisko stadiju, pozitīvu limfmezglu statusu un HER2 ekspresiju [Liu, 2012]. Turpretim korelācija starp augstu miR-10b ekspresiju un PR un ER statusu ir negatīva [Liu, 2012]. Pacientēm ar paaugstinātu miR-10b\* ekspresiju novēro sliktāku kopējo izdzīvotību kā pacientēm ar zemu miR-10b\* ekspresiju [Biagioni, 2012]. Šajā pētījumā TNS krūts vēža audos miR-21 ekspresija bija augstāka nekā TNH krūts vēža audos. Salīdzinot ar veselīem kontroles audiem, miR-21 ekspresija ir atrasta paaugstināta TN krūts vēža audos [Radojicic, 2011]. Citā pētījumā miR-21 ekspresija ir atrasta augstāka ER $\alpha$ +, ErbB2– un PR+ kā ER $\alpha$ –, ErbB2+ un PR– krūts audzējos [Mattie, 2006]. MiR-21 ekspresiju regulē gan ER $\alpha$ , gan ER $\beta$  receptors [Wickramasinghe, 2009]. Mijiedarbība starp estradiolu (E2) un vienu no diviem ER receptoriem izraisa miR-21 inhibēšanu, kā rezultātā samazinās PDCD4, PTEN un BCL2 proteīna ekspresijas bloķēšana [Wickramasinghe, 2009]. Turklāt mijiedarbība starp E2 un ER $\alpha$  palielina BCL2 transkripciju [Wickramasinghe, 2009]. mRNS profilēšanas analizē konstatēja, ka veselos krūts audos, salīdzinot ar TN krūts vēža audiem, onkogēns BCL2 ir ar samazinātu ekspresiju, savukārt TN krūts vēža audos miR-21 ekspresija bija paaugstināta [Cascione, 2013]. Krūts vēža pacientiem ar ER–un PR– receptoru statusu novēro augstāku miR21 ekspresiju kā krūts vēža pacientēm ar ER+ un PR+ receptoru statusu [Hafez, 2012]. TN krūts vēža pacientiem ar augstu miR-21 ekspresiju novēro sliktāku kopējo un krūts vēža specifisko dzīvildzi kā TN krūts vēža pacientēm ar zemu miR-21 ekspresiju [Radojicic, 2011]. Šajā pētījumā miR-31 ekspresija bija augstāka TNS krūts vēža audos

kā TNH. Paaugstināta miR-31 ekspresija tiek saistīta ar mazāk agresīva krūts vēža izveidi – lumināla tipa audzējos miR-31 ekspresija ir paaugstināta, savukārt TN krūts audzējos tās ekspresiju atrod samazinātu. MDA-MB-231 (TN krūts vēža) šūnu līnijas miR-31 ekspresija ir paaugstināta, turpretim MCF7

(lumināla krūts vēža) šūnu līnijās miR-31 ekspresija ir samazināta [Sossey-Alaoui, 2011; Augoff, 2012].

Atšķirīgi ekspresēto gēnu analīzi saistībā ar to iesaisti dažādos signālceļos un mijiedarbību ar citiem gēniem, noteica izmantojot PathCard/Reactome/KEGG un G2SBC datu bāzes. Izanalizējot gēnu iesaisti signālceļos, konstatēja, ka *TRIB3* gēns, kā ekspresija ir augstāka sporādiskos krūts vēža audos, ir iesaistīts PI-3K superceļā un piedalās sekojošos tajā iesaistītos procesos: PI3K/AKT aktivēšanā, procesā, kurā PIP3 aktivē AKT signalizēšanu, PI-3K kaskādē, piedalās pie PI3K notikumiem ERBB4 signalizēšanā un pašā ERBB4 signalizēšanā [PathCard; Reactome; KEGG; G2SBC]. Šajā signālceļā *TRIB3* piedalās vēl GAB1 signalosomu darbībā, LAT2/NTAL/LAB lomas kalcija mobilizācijā un SCF-KIT signalizēšanā. Analizējot PI-3K kaskādē iesaistītos gēnus un to mijiedarbību ar *TRIB3* gēnu, konstatēja, ka tas mijiedarbojas ar: *STAT1*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KRAS*, *AKT1*, *RHOA*, *MTOR*, *CHEK1* u.c. gēniem. *TRIB3* un *THBS4* gēns ir iesaistīts FGFR signalizēšanas superceļā, kur *TRIB3* darbojas FGFR signalizēšanā, FGFR signalizēšanā slimībā, aktivēta FGFR pa straudi lejupejoša signalizēšanas procesā, pa straudi lejupejošas signāla pārnese DAP12 mijiedarbībā, PDGF signalizēšanā, EGFR signalizēšanā un EGFR signalizēšana audzējā, savukārt *THBS4* gēns ir iesaistīts PDGF signalizēšanā. FGFR superceļā *TRIB3* un *THBS4* mijiedarbojas ar sekojošiem gēniem: *EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *MTOR*, *SPRY2* u.c. gēniem [PathCard; Reactome; KEGG; G2SBC].

*THBS4* gēns ir iesaistīts PI3-AKT signalizēšanā un šajā signālceļā tas mijiedarbojas ar *BRCA1*, *TP53*, *PIK3CA*, *BCL2*, *MYC* u.c. gēniem [PathCard; Reactome; KEGG; G2SBC].

*PFKFB4* gēns, kā ekspresija bija zemāka TNH krūts vēža audos ir iesaistīts *AKT* signālceļā un mijiedarbojas ar sekojošiem gēniem: *TP53*, *FGFR4*, *HRAS*, *NFKB1*, *PAK3*, *ERBB2*, *BCL2*, *ITGA3*, *CHE1* u.c. gēniem

[*PathCard*; *Reactome*; *KEGG*; *G2SBC*]. *C12ORF48* gēns kodē olbaltumvielu, kas mijiedarbojas ar PARP-1 [*Piao*, 2011].

MiRNS ir daudzsoļi biomarkēri, kas var tikt izmantoti ne tikai retrospektīvai analīzei, bet arī, lai monitorētu ķīmijterapijas efektivitāti un iespējamās blaknes terapijas laikā. Viena no šādām monitorēšanas iespējām ir analizēt brīvi cirkulājošās nukleīnskābes (DNS, mRNS un miRNS) plazmas vai seruma paraugos, ievācot tos pirms katras ķīmijterapijas kursa un veicot korelācijas analīzi starp nukleīnskābju izmaiņām terapijas laikā un atbildes reakciju uz noteiktu ķīmijterapijas līdzekli. MikroRNS, kas iespējami var tikt izmantota šādam mērķim varētu būt miR-214. Analizējot miR-214 ekspresiju plazmas paraugos krūts vēža pacientēm, konstatēja, ka miR-214 ekspresija bija statistiski ticami augstāka pirms operācijas paraugos, salīdzinot ar pēcoperācijas seruma paraugiem [*Schwarzenbach*, 2012]. Turklāt tika novērots, ka paaugstināta miR-214 ekspresija korelē ar pozitīvu limfmezglu statusu [*Schwarzenbach*, 2012]. Tādējādi ļoti vērtīgi būtu turpināt šo pētījumu, nosakot miR-214 ekspresijas izmaiņas neoadjuvantām un/vai metastātiskām krūts vēža pacientēm, ievācot seruma vai plazmas paraugos pirms katra ķīmijterapijas kursa. Olnīcu vēža gadījumā ir konstatēts, ka paaugstināta miR-214 ekspresija audzēja audos korelē ar rezistenci pret cisplatīna terapiju [*Yang*, 2008]. Balsoties uz iepriekš minēto, būtu svarīgi izvērtēt, vai pastāv šāda saistība arī krūts vēža gadījumā, kad tiek pielietota uz platīnu balstīta terapija, it īpaši svarīgi to būtu izvērtēt TN krūts vēža pacientēm, kuras ir *BRCA1* gēna mutāciju nēsātājas. Pašreiz uz platīnu balstītas ķīmijterapijas efektivitāte TN krūts vēža gadījumā ir neskaidra. Pētījumā, kurā izvērtēja bez progresijas periodu pacientiem, kuras saņēma uz platīna balstītu terapiju un pacientēm, kuras nesaņēma platīnu balstītu terapiju, konstatēja, ka pirmai grupai ir ilgāks bez notikumu periods, kas bija 10 mēneši, salīdzinot ar otro grupu, kas bija tikai 5 mēneši [*Hong*, 2014].

## 5. SECINĀJUMI

1. MikroRNS (miR-21, miR-29a, miR-31 un miR-214) ekspresija ir augstāka audzēja audos kā veselos kontroles audos. ( $p < 0,05$ )
2. MiR-21, miR-31 un miR-214 ekspresija ir augstāka TN kā LA, LB un HER2+ krūts vēžos ( $p < 0,05$ ).
3. MiR-214 ekspresija ir augstāka TN sporādiskos kā TN pārmantotos krūts vēža audos ( $p = 0,0005$ ).
4. Augsta miR-214 ekspresija audzēja audos korelē ar sliktāku kopējo dzīvildzi TN krūts vēža pacientēm ( $p = 0,0314$ ).
5. Ir identificēti 22 gēni, kas ir atšķirīgi ekspresēti starp TNH un TNS krūts vēža grupu.
6. Ir noteikta saistība starp *C12ORF23*, *C1ORF19* un *AMMECRIL* gēnu un miR-21 un miR-214 ekspresiju.

## 6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI

### 6.1. Publikācijas

1. Dagnija Kalniete, Miki Nakazawa-Miklaševiča, Ilze Štrumfa, Arnis Āboliņš, Arvīds Irmejs, Jānis Gardovskis, Edvīns Miklaševičs. High expression of miR-214 is associated with a worse disease-specific survival of the triple-negative breast cancer patients. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2015, 13(1):7.
2. Dace Bērziņa, Miki Nakazawa-Miklaševiča, Jekaterina Žestkova, Karīna Aksenoka, Arvīds Irmejs, Andris Gardovskis, Dagnija Kalniete, Jānis Gardovskis, Edvīns Miklaševičs: BRCA1/2 mutation screening in high-risk breast/ovarian cancer families and sporadic cancer patient surveilling for hidden high-risk families. *BMC Med Genet* 2013, 14:61.
3. Dagnija Kalniete, Miki Nakazawa-Miklaševiča, Ilze Štrumfa, Arnis Āboliņš, Arvīds Irmejs, Genadijs Trofimovičs, Jānis Gardovskis, Edvīns Miklaševičs. MicroRNA Expression in Different Subtypes of Breast Cancer. *Acta Chirurgica Latviensis*. 2013 (13), 7–12.
4. Dagnija Kalniete, Miki Nakazawa-Miklaševiča, Ilze Štrumfa, Arnis Āboliņš, Arvīds Irmejs, Jānis Gardovskis, Edvīns Miklaševičs. MicroRNA expression in hereditary and sporadic breast cancer tissues. *Collection of Scientific Papers 2011: Research articles in medicine & pharmacy*, Riga Stradins University, 2012 (2), 11–15.
5. Dagnija Kalniete, Arvīds Irmejs, Ilze Štrumfa, Jekaterina Žestkova, Karīna Aksenoka Gardovskis J., Miklaševičs E. Detection of Large Deletions and Duplications in Moderate Risk Breast Cancer Susceptibility Genes in Breast Cancer Patients Negative for the *BRCA1* and *BRCA2* Mutations. *Acta Chirurgica Latviensis*. 2011, 11: 3.–10.
6. Jekaterina Žestkova, Ilze Štrumfa, Dace Bērziņa, Arvīds Irmejs, Andris Gardovskis, Karīna Aksenoka, Dagnija Kalniete, Jānis

Gardovskis, Edvīns Miklaševičs. Mutāciju noteikšana *BRCA2* gēna 8. ekzonā ar Reālā laika-PCR/HRM analīzi. *RSU Zinātniskie raksti* 2009. Internā medicīna. Ķirurģija. Medicīnas bāzes zinātnes. *Stomatoloģija. Farmācija*. 2010, 71–74.

7. Jekaterina Žestkova, Dace Bērziņa, Arvīds Irmejs, Andris Gardovskis, Dagnija Kalniete, Jānis Gardovskis, Edvīns Miklaševičs. SNP RS1799943 salīdzinoša analīze pacientēm ar pārmantoto krūts/olnīcu vēzi un veselām kontroles grupas sievietēm. *RSU Zinātniskie raksti* 2009. Internā medicīna. Ķirurģija. Medicīnas bāzes zinātnes. *Stomatoloģija. Farmācija*. 2010, 75–77.

## 6.2. Tēzes

1. Kalniete, D., Nakazawa-Miklasevica, M., Strumfa, I., Abolins, A., Irmejs, A., Gardovskis, J., Miklasevics, E. MicroRNA expression in triple-negative versus other subtypes of breast cancer. *European Journal of Cancer. Proceedings Book*. 2014. S67.
2. Kalniete, D., Nakazawa-Miklaševiča, M., Štrumfa, I., Āboliņš, A., Irmejs, A., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. TN krūts vēža pacientēm ar augstu miR-214 ir sliktāka kopējā dzīvildze nekā pacientēm ar zemu miR-214 ekspresiju. 2014. gada Zinātniskās konferences tēzes, *RSU* 2014., 314.
3. Ozoliņa, L., Nakazawa-Miklaševiča, M., Daneberga, Z., Kalniete, D., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. Mutāciju *KRAS* gēna 12. un 13. kodonā kvantitatīva noteikšana, izmantojot masspektrometriju. 2014. gada Zinātniskās konferences tēzes, *RSU* 2014., 280.
4. Maksimenko, J., Bērziņa, D., Daneberga, Z., Nakazawa-Miklaševiča, M., Kalniete, D., Irmejs, A., Trofimovičs, G., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. Clinical Significance of Sporadic TP53 mutations in

- the Triple-negative Breast Cancer Group. 2014. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2014., 279.
5. Kalniete, D., Nakazawa-Miklaševiča, M., Štrumfa, I., Āboliņš, A., Irmejs, A., Trofimovičs, G., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. miRNS ekspresijas atšķirības TN pārmantotos un TN sporādiskos krūts vēža audos un dažāda apakštipa krūts vēža audos. 2013. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2013., 245.
  6. Skuja, E., Kalniete, D., Purkalne, G., Miklaševičs, E. *KRAS* un CEA kā metastātiska kolorektālā vēža prognostiskie marķieri. 2013. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2013., 279.
  7. Bērziņa, D., Zvīgule, G., Ozoliņa, L., Sīle, E., Kalniete, D., Nakazawa-Miklaševiča, Gardovskis, J., Miklaševičs, E. *KRAS* SNP rs61764370 ietekme uz krūts vēža attīstību un pacienšu dzīvildzi. 2013. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2013., 254.
  8. Dzalbs, A., Kalniete, D., Krūmiņa, Z., Bauze, D., Miklaševičs, E., Lugovska, R. Submikroskopisku hromosomu aberāciju noteikšana ar SNP genotipēšanas metodi bērniem ar attīstības aizturi un iedzimtām anomālijām. 2013. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2013., 211.
  9. Reste, J., Zvīgule, G., Kurjāne, N., Zvagule, T., Eglīte, M., Hagina, E., Gabruševa, N., Bērziņa, D., Kalniete, D., Miklaševičs, M. Telomēru garuma un TGFβ ilgstošai radiācijas ietekmei pakļautiem cilvēkiem. 2013. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2013., 63.
  10. Kalniete, D., Nakazawa-Miklaševiča, M., Štrumfa, I., Āboliņš, A., Irmejs, A., Trofimovičs, G., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. Event-free survival analysis in regard of high and low expression levels of miR-21 in breast cancer patients. 1<sup>st</sup> Baltic Hereditary Cancer Conference, Vilnius. 2012.

11. Kalniete, D., Plonis, J., Aksenoka, K., Nakazawa-Miklaševiča, M., Irmejs, A., Gardovskis, J., Miklaševičs, M. The prevalence of del5395 mutation of the CHEK2 gene in breast and colon cancer patients in Latvian population. 1<sup>st</sup> Baltic Hereditary Cancer Conference, Vilnius. 2012.
12. Kalniete, D., Plonis, J., Aksenoka, K., Irmejs, A., Gardovskis, J., Miklaševičs, M. Del5395 mutācijas izplatība krūts un prostatas vēža slimniekiem Latvijas populācijā. 2012. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2012., 260.
13. Āboliņš, A., Kalniete, D., Vasiļevska, S., Bērziņa, D., Štrumfa, I., Miklaševičs, E., Gardovskis, J. Sinoviāla sarkoma krūts dziedērī. 2012. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2012., 288.
14. Skuja, E., Kalniete, D., Purkalne, G., Āboliņš, A., Priedīte, I., Gardovskis, A., Miklaševičs, E. Metastātiska resnās zarnas vēža genoma struktūras analīze. 2012. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2012., 273.
15. Skuja, E., Āboliņš, A., Priedīte, I., Purkalne, G., Štrumfa, I., Vilmanis, J., Kalniete, D., Miklaševičs, E., Gardovskis, A. Pilna patoloģiska remisija pacientam ar metastātisku resnās zarnas vēzi. 2012. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2012., 274.
16. Zvīgule, G., Reste, J., Kurjāne, N., Bērziņa, D., Zvagule, T., Gabruševa, N., Kalniete, D., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. Telomēru garuma kvantitatīva salīdzināšana starp mononukleāro un leukocitāro frakciju. 2012. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2012., 262.
17. Kalniete, D., Kalniete, D., Nakazawa-Miklaševiča, M., Štrumfa, I., Irmejs, A., Subatniece, S., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. Micro-RNA expression in heritable and sporadic breast cancer tissues. *Annals of Oncology*, Vol 22, Suppl. 2, 2011, ii34.



18. Kalniete, D., Nakazawa-Miklaševiča, M., Štrumfa, I., Irmejs, A., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. miRNS ekspresija pārmantota un sporādiska krūts vēža audos. RSU Zinātnisā konference 2011., 307.
19. Kalniete, D., Borošenko, V., Švampāne, L., Žestkova, J., Bērziņa, D., Irmejs, A., Subatniece, S., Gardovskis, J., Trofimovičs, G., Miklaševičs, E. *msh2* un *mlh1* gēnu lielo delēciju un insērciju sastopamība pacientiem ar HNPCC sindromu. 2010. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2010., 252.
20. Kalniete, D., Štrumfa, I., Bērziņa, D., Žestkova, J., Aksenoka, K., Irmejs, A., Subatniece, S., Gardovskis, J., Trofimovičs, G., Miklaševičs, E. Pirmā Latvijā konstatētā rietumslāvu populācijai raksturīgā *chk2* gēna 9. un 10. eksona delēcija krūts vēža slimnieci. 2010. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2010., 271.
21. Bērziņa, D., Borošenko, V., Švampāne, L., Žestkova, J., Kalniete, D., Subatniece, S., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. Mutāciju noteikšana *mlh1* un *msh2* gēnos HNPCC un HEC slimniekiem. 2010. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2010., 251.
22. Žestkova, J., Ozoliņa, L., Alikā, M., Kalniete, D., Bērziņa, D., Melbārde-Gorkuša, I., Irmejs, A., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. *BRCA2* gēna aminoskābju maiņas mutāciju klīniskās nozīmības analīze. 2010. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2010., 270.
23. Bērziņa, D., Žestkova, J., Borošenko, V., Švampāne, L., Irmejs, A., Kalniete, D., Trofimovičs, G., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. *MSH2* gēna mutācijas *msh2* IVS5+3 A>T biežums starp pacientiem ar HNPCC un HEC. 2009. gada Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2009., 174.
24. Žestkova, J., Irmejs, A., Gardovskis, A., Bērziņa, D., Kalniete, D., Trofimovičs, G., Gardovskis, J., Miklaševičs, E. SNP rs1799943

saistība ar pārmantoto krūts un olnīcu vēzi (analīze). 2009. gada  
Zinātniskās konferences tēzes, RSU 2009., 186.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Arun BK: Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26:4282–4288.
2. Augoff K, McCue B, Plow EF, Sossey-Alaoui K: miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer* 2012, 11:5.
3. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno K, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, et al.: Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 2012, 486:405–409.
4. Bayraktar S, Gutierrez-Barrera AM, Liu D, Tasbas T, Akar U, Litton JK, Lin E, Albarracin CT, Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Arun BK: Outcome of triple-negative breast cancer in patients with or without deleterious BRCA mutations. *Breast Cancer Res Treat* 2011, 130(1):145–153.
5. Berzina D, Nakazawa-Miklasevica M, Zestkova J, Aksenoka K, Irmejs A, Gardovskis A, Kalniete D, Gardovskis J, Miklasevics E: BRCA1/2 mutation screening in high-risk breast/ovarian cancer families and sporadic cancer patient surveilling for hidden high-risk families. *BMC Med Genet* 2013, 14:61.
6. Biagioni F, Bossel Ben-Moshe N, Fontemaggi G, Canu V, Mori F, Antoniani B, Di Benedetto A, Santoro R, Germoni S, De Angelis F, Cambria A, Avraham R, Grasso G, Strano S, Muti P, Mottolese M, Yarden Y, Domany E, Blandino G: miR-10b\*, a master inhibitor of the cell cycle, is down-regulated in human breast tumours. *EMBO Mol Med* 2012, 4(11):1214–1229.
7. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Alder H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99(24):15524–15529.
8. Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012, 4:61–70.

9. Cannell IG, Kong YW, Bushell M: How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem Soc Trans* 2008, 36:1224–1231.
10. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF: The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 2008, 8(3):187–198.
11. Cascione L, Gasparini P, Lovat F, Carasi S, Pulvirenti A, Ferro A, Alder H, He G, Vecchione A, Croce CM, Shapiro CL, Huebner K: Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS One* 2013, 8(2):e55910.
12. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ: The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996, 77(11):2318–2324.
13. Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Gräf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., et al.: The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012, 486, 346–352.
14. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA: Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res* 2007, 13:4429–4434.
15. Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de Paillerets B, Peyrat JP, Longy M, Guinebretière JM, Sauvan R, Noguchi T, Birnbaum D, Sobol H: Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited. *Cancer Res* 1998, 58(8):1588–1592.
16. Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, et al.: Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 2012, 486:353–360.
17. Fong, PC, Boss, DS, Yap, TA, et al.: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Eng J Med* 2009, 361, 123–134.
18. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH: Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the

- microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008, 283(2):1026–1033.
19. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, Lanchbury JS, Stenke-Hale K, Hennessy BT, Aru BK, Hortobagyi GN, Do KA, Mills GB, Meric-Bernstam F: Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011, 17(5):1082–1089.
  20. Guille A, Chaffanet M, Birnbaum D.: Signaling pathway switch in breast cancer. *Cancer Cell Int* 2013,13(1):66.
  21. Hafez MM, Hassan ZK, Zekri AR, Gaber AA, Al Rejaie SS, Sayed-Ahmed MM, Al Shabanah O: MicroRNAs and metastasis-related gene expression in Egyptian breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012, 13(2):591–598.
  22. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ: MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *J Oncol* 2010, doi: 10.1155/2010/950201.
  23. Hong R, Ma F, Xu B, Li Q, Zhang P, Yuan P, Wang J, Fan Y, Cai R.: Efficacy of platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer patients with metastases confined to the lungs: a single-institute experience. *Anticancer Drugs* 2014,(9):1089–1094.
  24. Huang GL, Zhang XH, Guo GL, Huang KT, Yang KY, Shen X, You J, Hu XQ: Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncol Rep* 2009, 21(3):673–679.
  25. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005, 65(16):7065–7070.
  26. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, 61(2):69–90.

27. Lee CH, Subramanian S, Beck AH, Espinosa I, Senz J, Zhu SX, Huntsman D, van de Rijn M, Gilks CB: MicroRNA profiling of BRCA1/2 mutation-carrying and non-mutation-carrying high-grade serous carcinomas of ovary. *PLoS One* 2009, 4(10):e7314.
28. Lee LJ, Alexander B, Schnitt SJ, Comander A, Gallagher B, Garber JE, Tung N: Clinical outcome of triple negative breast cancer in BRCA1 mutation carriers and noncarriers. *Cancer* 2011, 117(14):3093–3100.
29. Li LQ, Li XL, Wang L, Du WJ, Guo R, Liang HH, Liu X, Liang DS, Lu YJ, Shan HL, Jiang HC: Matrine inhibits breast cancer growth via miR-21/PTEN/Akt pathway in MCF-7 cells. *Cell Physiol Biochem* 2012, 30(3):631–641.
30. Liu Z, Zhu L, Cao H, Ren H, Fang X: miR-10b promotes cell invasion through RhoC-AKT signaling pathway by targeting HOXD10 in gastric cancer. *Int J Oncol* 2012, 40(5):1553–1560.
31. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA: Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007, 449(7163):682–688.
32. Maksimenko J, Irmejs A, Nakazawa-Miklasevica M, Melbarde-Gorkusa I, Trofimovics G, Gardovskis J, Miklasevics E: Prognostic role of BRCA1 mutation in patients with triple-negative breast cancer. *Oncol Lett* 2014, 7(1):278–284.
33. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott G.K, Fedele V, Ginzinger D, Getts R, Haqq C: Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 2006, 5:24.
34. Papagiannakopoulos T, Shapiro A and Kosik KS: MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* 2008, 68(19):8164–8172.
35. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406:747–752.
36. Piao L, Nakagawa H, Ueda K, Chung S, Kashiwaya K, et al.: C12orf48, termed PARP-1 binding protein, enhances poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)

- activity and protects pancreatic cancer cells from DNA damage. *Genes Chromosomes Cancer* 2011, 50(1):13–24.
37. Polyak K: Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest* 2011, 121(10):3786–3788.
  38. Radojicic J, Zaravinos A, Vrekoussis T, Kafousi M, Spandidos DA, Stathopoulos EN: MicroRNA expression analysis in triple negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. *Cell Cycle* 2011, 10(3):507–517.
  39. Schwarzenbach H, Milde-Langosch K, Steinbach B, Muller V, Pantel K: Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012, 134(3):933–941.
  40. Shah P, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al.: The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012, 486:385–399.
  41. Sossey-Alaoui K, Downs-Kelly E, Das M, Izem L, Tubbs R, Plow EF: WAVE3, an actin remodeling protein, is regulated by the metastasis suppressor microRNA, miR-31, during the invasion-metastasis cascade. *Int J Cancer* 2011, 129(6):1331–1343.
  42. Svoboda M, Sana J, Redova M, Palacova M, Fabiana P, Slaby O, Vyzula R: MiR-34b is associated with clinical outcome in triple-negative breast cancer patients. *Diagn Pathol* 2012, 7:31.
  43. Thompson D, Easton D: The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004, 9(3):221–236.
  44. Toyama T, Kondo N, Endo Y, Sugiura H, Yoshimoto N, Iwasa M, Takahashi S, Fujii Y, Yamashita H: High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2012, 42(4):256–263.
  45. Wang YS, Wang YH, Xia HP, Zhou SW, Schmid-Bindert G, Zhou CC: MicroRNA-214 regulates the acquired resistance to gefitinib via the PTEN/AKT pathway in EGFR-mutant cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012, 13 (1):255–260.
  46. Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, Klinge CM: Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target

- gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2009, 37(8):2584–2595.
47. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY: MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 2008, 14(11):2348–2360.
48. Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, Wenham RM, Coppola D, Kruk PA, Nicosia SV, Cheng JQ: MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* 2008, 68(2):425–433.
49. Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang GH: MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* 2010, 411:846–852.
50. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY, MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007, 282(19):14328–14336.