

Н.П. Юрченко,
Н.М. Глуценко,
О.В. Скачкова,
І.О. Марченко,
Л.Г. Бучинська

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.01.039>

ЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ K-RAS ТА ДНК-СТАТУСУ У ПРОГРЕСІЇ ЕНДОМЕТРІОЇДНОЇ КАРЦИНОМИ ЕНДОМЕТРІУ У ХВОРИХ НА РАННІЙ СТАДІЇ РОЗВИТКУ ПУХЛИННОГО ПРОЦЕСУ

Ключові слова: ендометріоїдна карцинома ендометрію, метастазування, експресія онкобілка K-RAS, вміст ДНК, індекс проліферації, анеуплоїдія.

Мета: оцінка плоідності ДНК та експресії онкобілка K-RAS у карциномах ендометрію для визначення метастатичного потенціалу у хворих з початковою стадією злоякісного процесу. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на зразках післяопераційного матеріалу 54 хворих на ендометріоїдну карциному ендометрію (ЕКЕ) I стадії за FIGO (медіана віку: 60,4 року; діапазон: від 38 до 72 років). **Методи дослідження:** клінічний, морфологічний, імуногістохімічний, цитофлуорометричний, статистичний. **Результати:** ретроспективним аналізом історій хвороб жінок з I стадією ЕКЕ виявлено осіб, у яких упродовж 1,8–36,6 міс. виникли метастази у регіонарних лімфатичних вузлах. На основі цього сформовано дві групи дослідження: I — хворі на ЕКЕ без метастазів (n = 34), II — хворі з метастазами (n = 20). В результаті оцінки клініко-патологічних особливостей ЕКЕ встановлено, що у хворих I групи переважали (79,4%) G1-G2-пухлини і у 70,6% випадків визначалась не глибока інвазія у міометрій. ЕКЕ II групи у 55,0% були низького ступеня диференціювання з глибокою інвазією міометрію, що корелювало з високою експресією онкобілка K-RAS та індексом проліферації. У 20,0% ЕКЕ II групи спостерігалась анеуплоїдія з іДНК $\geq 2,0$. У таких пухлинах визначено вірогідно більшу експресію K-RAS порівняно з таким показником у диплоїдних карциномах цієї групи. Крім того, термін виникнення метастазів у хворих з анеуплоїдією був вірогідно меншим, ніж у хворих цієї групи з диплоїдними пухлинами. **Висновки:** встановлено, що експресія онкобілка K-RAS та плоідність ДНК в ЕКЕ асоціюються з клінічним перебігом пухлинного процесу хворих з I стадією, що відкриває можливість верифікувати пацієнтів з високим ризиком виникнення метастазів.

Відомо, що порушення функціонування онкогенів, інактивація генів-супресорів на фоні зниження ефективності систем репарації поряд з клональною еволюцією є тим каскадом подій, внаслідок яких спостерігається накопичення генетичних порушень, що призводить до нестабільності геному та сприяє неконтрольованій проліферації клітин [1–3]. Остання забезпечується складним механізмом сигнальної трансдукції, що визначає проліферативну автономію пухлини, її здатність до прогресування, тобто створюються умови для виникнення біологічно поліморфних клонів пухлинних клітин, і саме тих, які обумовлюють підвищення інвазивного та метастатичного потенціалу [3].

Одну із ключових ролей в генерації таких змін може відігравати реплікаційний стрес, індукований онкогенами (зокрема K-RAS). У більшості злоякісних новоутворень спостерігається аберрантна експресія гена K-RAS, в результаті якої відбуваються порушення роботи компонентів шляхів

RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, MEK/SEK/JNK, внаслідок чого зростає неконтрольована проліферація, втрата контактного інгібування, підвищена рухливість, зміни метаболізму пухлинних клітин та втрата цілісності геному [4].

Наведені механізми прогресування пухлинного процесу простежуються при розвитку багатьох гормонозалежних пухлин, у т.ч. раку молочної залози та раку ендометрію (РЕ), що позначається на варіабельності клінічного перебігу хвороби навіть у осіб з I стадією пухлинного процесу зі сприятливим прогнозом [5]. Проте, майже у 7–20% таких пацієнток спостерігаються рецидиви захворювання [6, 7].

Показано, що РЕ є гетерогенною клітинною популяцією за морфофункціональними характеристиками, показниками текстурної організації хроматину, вмістом ДНК. Поряд з цим визначено, що зі зниженням диференціювання РЕ змінюється популяційний склад клітин із зростанням відсотку анеуплоїдних, збільшується індекс ДНК та

відбувається зсув модальної лінії в бік тетраплоїдних клітин [8].

Встановлено, що у ендометріюїдній карциномі ендометрію (ЕКЕ) з анеуплоїдією гіперекспресія циклінів E, D1 і транскрипційного фактора E2F1 корелює з високою проліферативною активністю [9]. У хворих з такими пухлинами спостерігається висока частота виникнення рецидивів і метастазів [10, 11].

У карциномах ендометрію мутації *K-RAS* визначаються у 22–43% випадків, що супроводжується підвищеною експресією зазначеного онкобілка і асоціюється з агресивністю пухлинного процесу [12]. Крім того, мутації *K-RAS* присутні у 6–16% зразків гіперплазії ендометрію, що розцінюються як рання подія неопластичного процесу [13].

З урахуванням вищенаведеного мета представлено дослідження полягала в оцінці плоідності ДНК та експресії онкобілка *K-RAS* у карциномах ендометрію для визначення метастатичного потенціалу у хворих з початковою стадією злоякісного процесу.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на зразках післяопераційного матеріалу 54 пацієток з I стадією ЕКЕ віком від 38 до 72 років (медіана віку: 60,4 року), серед яких 34 пацієтки були без метастазів пухлини (I група) та 20 — у яких упродовж 1,8–36,6 міс. виникли метастази у регіонарних лімфатичних вузлах (II група).

Усі пацієтки не отримували передопераційної терапії і знаходились на лікуванні у відділенні онкогінекології (зав. д.м.н, професор В.С. Свінцицький) Національного Інституту раку МОЗ України протягом 2018–2021 рр. та дали поінформовану згоду на використання їх біологічного матеріалу для проведення наукових досліджень.

Згідно з висновком комісії з біоетики Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України під час дослідження були дотримані етичні стандарти щодо хворих на ЕКЕ у відповідності до вимог загальноновизнаних міжнародних правил у рамках Гельсінської декларації 2008 р.

Пухлинний матеріал отримували під час оперативних втручань та зберігали до проведення проточно-цитометричних досліджень в замороженому стані (-80°C).

Морфологічну верифікацію характеру патологічного процесу в ЕКЕ та ступінь диференціювання пухлин проводили на препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозинном за загальноновизначеними рекомендаціями Всесвітньої організації охорони здоров'я [14].

Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження експресії біомолекулярного маркера здійснювали на депарфінованих зрізах пухлин ендометрію з викорис-

танням первинних антитіл до *K-Ras* (9.13, Thermo Fisher Scientific, США). Візуалізацію експресії зазначеного маркера проводили зі застосуванням системи детекції PolyVue (Diagnostic BioSystems, США). Результати ІГХ реакції оцінювали напівкількісним методом шляхом підрахунку кількості позитивно забарвлених клітин визначених у відсотках — індекс мітки (ІМ, %). У кожному випадку аналізували 800–1000 пухлинних клітин. При значеннях ІМ менших за медіану (Me), експресію маркера вважали низькою, а при значеннях ІМ, вищих за Me — високою.

Плоідність і відсоток епітеліальних клітин ЕКЕ у фазах мітотичного циклу визначали за допомогою методу проточної цитометрії в суспензії пухлинних клітин після їх забарвлення флуорохромом (пропідіум йодид — PI “Sigma”, США) з використанням проточного цитофлуориметра EPICS-XL (“Beckman Coulter”, США).

Оскільки клітинна популяція ЕКЕ є гетерогенною, перед початком дослідження було визначено локалізацію епітеліальних клітин за експресією пан-цитокератину (клон С11, ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України), міченого вторинним антитілом FITC (“Sigma”, США). Для візуалізації отриманих даних використовували програму FCS Express V3 (De Novo Software).

За допомогою програми ModFit LT 2.0, Mac OS (“Becton Dickinson”, США) аналізували ДНК-гістограми розподілу пухлинних клітин ендометрію за фазами мітотичного циклу (G0/1, S, G2 + M, %). Проліферативну активність пухлинних клітин ендометрію оцінювали за індексом проліферації (ІП), який визначали за кількістю клітин у фазі S + G2/M (%).

Частку клітин з різним вмістом ДНК на гістограмах обчислювали як відсоток від загального числа досліджених клітин; кількість клітин в різних фазах клітинного циклу виражали у відсотках; диплоїдним стандартом слугували лімфоцити периферичної крові умовно здорових донорів. Індекс ДНК (іДНК) обчислювали як співвідношення пікового каналу G0/G1 анеуплоїдних клітин до пікового каналу G0/G1 диплоїдних клітин. іДНК диплоїдного профілю пухлини = 1,0; іДНК $\neq 1,0$ свідчить про анеуплоїдний профіль пухлини (іДНК < 1,0 — гіпоплоїдний, > 1,0 — гіперплоїдний).

Статистичну обробку отриманих результатів проведено за допомогою програмного забезпечення Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.). Використано стандартний описовий статистичний метод. При цьому обчислювали середні значення та їх похибки ($M \pm m$), діапазон та медіану, нижній (Q_1) та верхній (Q_3) квантили. Аналіз відмінностей між вибірками проводили з використанням непараметричного U-критерію Манна Уїтні, оскільки не було виконано вимоги щодо їх нормального розподілу

згідно критерія Шапіро-Уїлка. Для оцінки зв'язку між отриманими даними проводили кореляційний аналіз (коефіцієнт рангової кореляції Спірмена). Достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

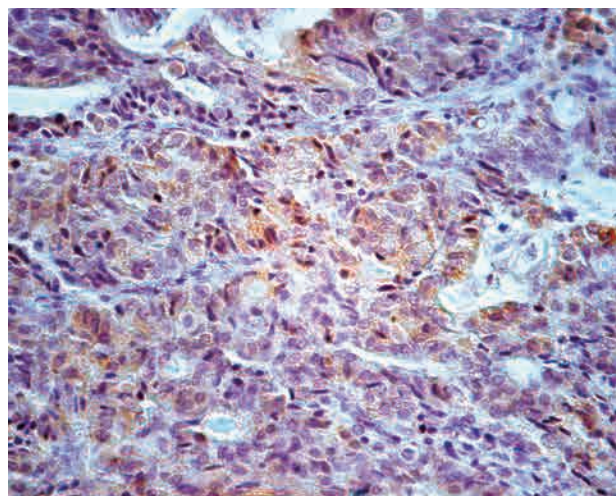
Морфологічний аналіз новоутворень показав, що досліджувані пухлини були ЕКЕ різного ступеня диференціювання та глибини інвазії у міометрії. У 36 випадках (66,7%) виявлено високий і помірний ступінь диференціювання (G1–G2) та 18 (33,3%) були низькодиференційованими (G3) пухлинами. При цьому, у 32 (59,3%) хворих спостерігались пухлини, що інвазували $<1/2$ міометрію і у 22 (40,7%) випадках визначено глибоку ($>1/2$) інвазію міометрію.

При більш детальному аналізі клініко-патологічних особливостей ЕКЕ встановлено, що у хворих I групи більшість (79,4%) були G1–G2-пухлини і у 70,6% з них визначалась не глибока ($<1/2$) інвазія у міометрії. Карциноми ендометрію хворих II групи у 55,0% характеризувались низьким ступенем диференціювання і переважали (60,0%) пухлини з глибокою інвазією у міометрії (табл. 1).

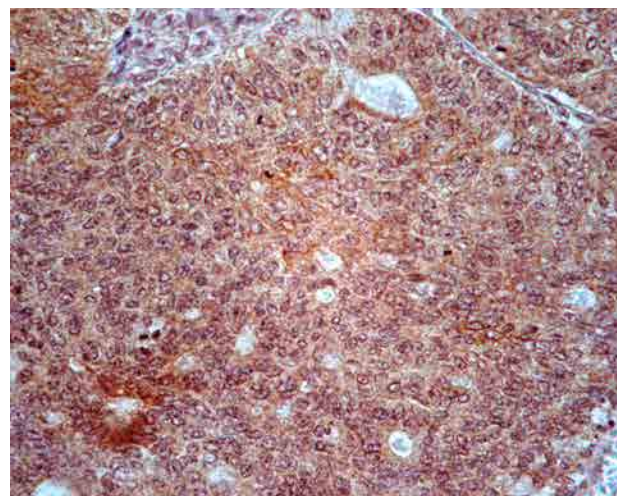
Таблиця 1

Клініко-патологічна характеристика хворих на РЕ (n = 54)

Показник	Кількість хворих, n (%)	
	без метастазів (n = 34)	з метастазами (n = 20)
<i>Ступінь диференціювання</i>		
G1–G2	27 (79,4)	9 (45,0)
G3	7 (20,6)	11 (55,0)
<i>Глибина інвазії пухлини у міометрії</i>		
$<1/2$	24 (70,6)	8 (40,0)
$>1/2$	10 (29,4)	12 (60,0)



а



б

Рис. 1. Експресія онкобілка K-RAS у карциномах ендометрію: а — G2-пухлина; б — G3-пухлина. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. 36. $\times 400$

Аналіз експресії онкобілка K-RAS, який є одним із індукторів реплікаційного стресу, показав, що більшість (96,3%) ЕКЕ були позитивними за експресією досліджуваного маркера (рис. 1). Виявлено значний діапазон показників його експресії у новоутвореннях з коливаннями від 3,6 до 78,9%, що у середньому дорівнювало $26,5 \pm 3,8\%$.

При оцінці експресії досліджуваного маркера у пухлинах ендометрію залежно від наявності у хворих метастазів встановлено варіабельність індивідуальних показників експресії K-RAS, у пухлинах хворих як I, так і II групи (табл. 2). Натомість, виявлено майже у 2 рази більшу експресію онкобілка в ЕКЕ хворих II групи порівняно зі значеннями цього показника у пухлинах пацієнтів без метастазів. У хворих на ЕКЕ виявлено позитивний кореляційний зв'язок ($r = 0,5$; $p < 0,05$) між наявністю метастазів в регіонарних лімфатичних вузлах та експресією маркера K-RAS.

Таблиця 2

Оцінка експресії маркера K-RAS (ІМ, %) у карциномах ендометрію залежно від наявності у хворих метастазів

Клінічний показник пухлинної прогресії	Експресія K-RAS, $M \pm m / \text{min-max}$
I група (без метастазів)	$18,3 \pm 4,5 / 0-60,9$
II група (з метастазами)	$33,9 \pm 5,5 / 3,6-78,9$
<i>p</i>	0,02

Онкогенна активація K-RAS у злоякісно трансформованих клітинах індукуює реплікаційний стрес, що призводить до значних пошкоджень ДНК (зокрема одно- і двониткових розривів). Внаслідок цього можуть виникати популяції клітин з різним вмістом ДНК, які обумовлюють прогресію пухлинного процесу [13, 14].

При дослідженні ДНК-статусу в ЕКЕ хворих залежно від наявності метастазів встановлено, що пухлини ендометрію хворих I групи за вмістом ДНК були диплоїдними. У той же час, у хворих II групи визначалися як диплоїдні, так і анеуплоїдні новоутворення (табл. 3).

Таблиця 3

Характеристика ЕКЕ залежно від плідності новоутворення

Групи хворих	Кількість випадків,%	
	диплоїдні пухлини	анеуплоїдні пухлини
I група (без метастазів)	100,0	0
II група (з метастазами)	80,0	20,0*

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з диплоїдними пухлинами.

Анеуплоїдні карциноми ендометрію характеризувалися гіперплоїдією з $iDNK \geq 2,0$ з індивідуальними показниками від 2,05 до 2,60 (середній показник $2,3 \pm 1,2\%$).

Згідно з результатами проточної цитометрії, наведено декілька прикладів ДНК-гістограм (рис. 2).

Аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу залежно від прогресування захворювання показав, що в ЕКЕ хворих I групи основна маса клітин знаходилась у G0/G1 фазі циклу ($76,0 \pm 0,9\%$), а вміст клітин у G2/M фазі у середньому становив $13,0 \pm 1,0\%$. Поряд з цим, в ЕКЕ хворих II групи визначали вірогідно меншу кількість клітин у G0/G1 та зростання вмісту клітин у G2/M фазах, порівняно з такими показниками

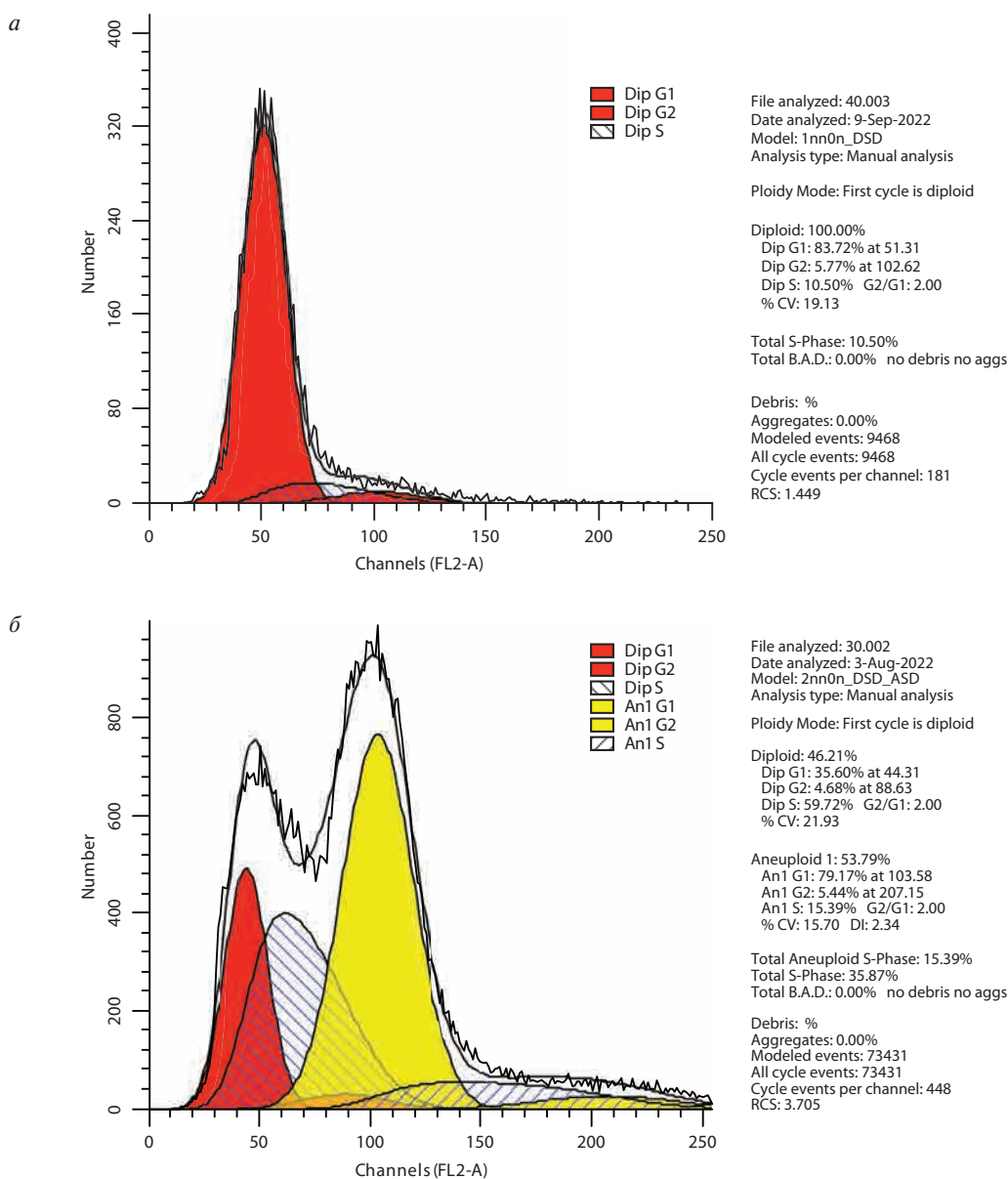


Рис. 2. ДНК-гістограми. Розподіл пухлинних клітин ендометрію за фазами клітинного циклу: диплоїдний ДНК-профіль ЕКЕ (а), анеуплоїдний ДНК-профіль ЕКЕ (б)

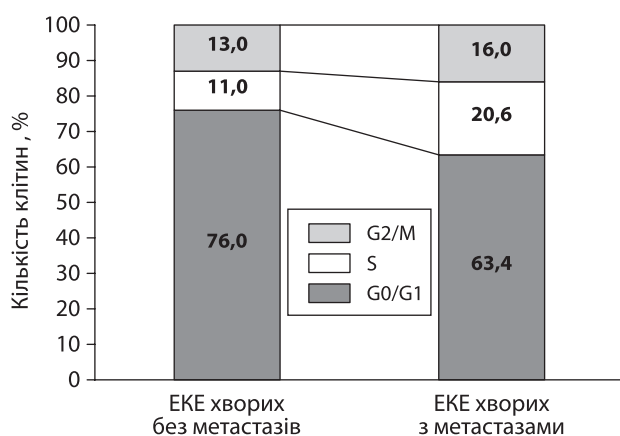


Рис. 3. Розподіл клітин ЕКЕ за фазами мітотичного циклу

в ЕКЕ хворих I групи (рис. 3). Водночас, встановлено, що вміст клітин у S-фазі був в 1,6 раза більший у карциномах ендометрію хворих з метастазами порівняно з альтернативною групою (див. рис. 3).

Крім того, у карциномах ендометрію хворих II групи ІП був у 1,5 раза більший ($p < 0,05$) порівняно із таким у ЕКЕ пацієнток I групи (рис. 4).

Враховуючи, що у хворих II групи зустрічались ЕКЕ з популяцією як диплоїдних, так і анеуплоїдних клітин, нами досліджено розподіл клітин за фазами клітинного циклу та визначено ІП у цих новоутвореннях. Встановлено, що у карциномах ендометрію з анеуплоїдією визначалась вірогідно менша кількість клітин у G0/G1 і зростав вміст клітин у S і G2/M фазах, порівняно з аналогічними показниками у диплоїдних пухлинах (табл. 4). Для анеуплоїдних ЕКЕ характерне значне підвищення ІП у порівнянні з диплоїдними карциномами (відповідно $43,8 \pm 3,2$ і $30,2 \pm 1,4\%$, $p < 0,05$).

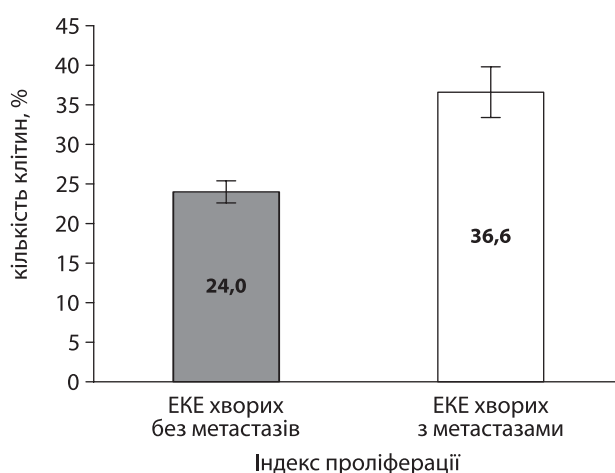


Рис. 4. Індекс проліферації в ЕКЕ залежно від наявності у хворих метастазів

Таблиця 4

Розподіл клітин за вмістом ДНК і фазами мітотичного циклу у хворих на ЕКЕ з метастазами

Характеристика ЕКЕ за плоїдністю	Кількість пухлинних клітин у різних фазах клітинного циклу, %			
	G0/G1	S	G2/M	S+G2/M (ІП)
Диплоїдні	$69,6 \pm 0,9$	$18,0 \pm 0,8$	$12,2 \pm 1,0$	$30,2 \pm 1,4$
Анеуплоїдні	$56,3 \pm 2,2^*$	$25,1 \pm 3,1^*$	$18,7 \pm 1,2$	$43,8 \pm 3,2^*$

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з диплоїдними пухлинами.

Звертає на себе увагу той факт, що при порівнянні ІП в диплоїдних ЕКЕ хворих I і II груп встановлені відмінності при розподілі клітин за фазами циклу та ІП. Зокрема, визначено зростання в 1,5 раза вмісту клітин у S фазі та збільшення в 1,4 раза ІП порівняно з аналогічними показниками в диплоїдних пухлинах хворих без метастазів.

Виявлені особливості проліферативного потенціалу в ЕКЕ хворих I та II груп можуть бути пов'язані з експресією онкогена *K-RAS*. При дослідженні кількості клітин з експресією *K-RAS* у пухлинах з різною плоїдністю ДНК хворих II групи, встановлено, що у карциномах ендометрію з анеуплоїдією спостерігається вірогідно більша експресія онкобілка *K-RAS* порівняно з такою у диплоїдних пухлинах пацієнток цієї групи (табл. 5).

Натомість, у диплоїдних ЕКЕ виявлено в 1,4 раза меншу експресію *K-RAS* у хворих I групи порівняно з відповідним показником хворих II групи (див. табл. 2, 5).

При зіставленні термінів виникнення метастазів у хворих на ЕКЕ II групи з диплоїдними та анеуплоїдними варіантами пухлин встановле-

Таблиця 5

Експресія маркера *K-RAS* в ЕКЕ хворих з метастазами залежно від плоїдності новоутворення

Характеристика ЕКЕ за плоїдністю	Експресія <i>K-RAS</i> (ІМ, %)
Диплоїдні	$25,7 \pm 4,5$
Анеуплоїдні	$67,7 \pm 4,9$
<i>p</i>	0,04

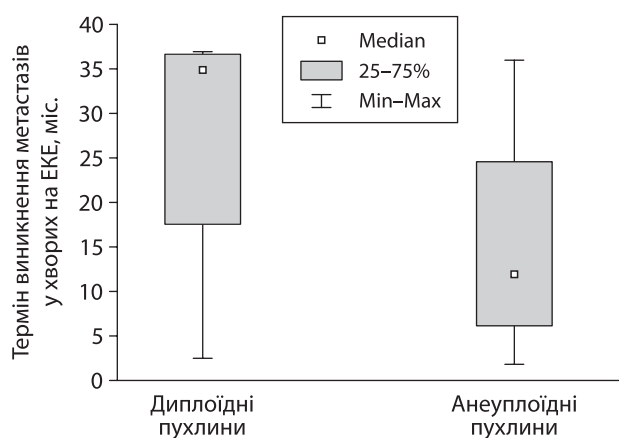


Рис. 5. Порівняння термінів виникнення метастазів у хворих на ЕКЕ II групи з диплоїдними та анеуплоїдними варіантами пухлин

но, що у осіб з анеуплоїдними новоутвореннями метастази виникали раніше ($p = 0,048$), ніж у пацієнток з диплоїдними пухлинами. Визначено, що Ме (Q1; Q3) терміну виникнення метастазів у хворих з анеуплоїдним профілем пухлин становила 11,9 (6,2; 24,9) міс. з мінімальним значенням 1,8 і максимальним — 36,6 міс. порівняно з диплоїдними — 35 (17,5; 36,7) міс., діапазон 2,6–36,9 міс. (рис. 5)

Отже, у хворих II групи, новоутворення яких характеризуються пулом анеуплоїдних клітин, високою експресією онкогена *K-RAS*, вірогідно більшим ІП, метастази виникали раніше, порівняно з пацієнтками цієї групи, пухлини яких були диплоїдними.

У той же час, визначено, що диплоїдні пухлини хворих II групи мають більш високий проліферативний потенціал та експресію онкогена *K-RAS* порівняно до таких показників хворих I групи.

Таким чином, в результаті проведеного дослідження встановлено, що у 11,8% хворих з I клінічною стадією пухлинного процесу через 1,8–36,6 міс. виникли метастази у регіонарних лімфатичних вузлах. Доведено, що ЕКЕ таких хворих характеризувалася анеуплоїдним ДНК-статусом, високою експресією онкогена *K-RAS* та високим проліферативним потенціалом, про що свідчать результати, отриманими при зіставленні пухлин хворих без та з наявністю метастазів.

Отримані дані відображають онкогенний ефект експресії *K-RAS*, як індуктора геномних пошкоджень, який сприяє дестабілізації ДНК пухлинних клітин та обумовлює формування більш агресивних форм карциноми ендометрію, які асоціюються з виникненням метастазів у хворих з I стадією пухлинного процесу.

Це узгоджується з думкою про те, що активація онкогенів (зокрема *K-RAS*) є однією з істотних причин появи генетичної нестабільності у пухлинних клітинах [15, 16]. Безпосереднім доказом

цього може бути продемонстроване в нашому дослідженні вірогідне зростання експресії *K-RAS* в ЕКЕ хворих, у яких виникли метастази, порівняно аналогічним показником хворих без метастазів.

Згідно даних літератури, збільшення експресії *K-RAS* у карциномах ендометрію корелює з низьким ступенем диференціювання, втратою рецепторів естрогенів і ожирінням у хворих на цю онкопатологію [17]. Власні дані засвідчили, що найвища експресія досліджуваного онкогена спостерігається у карциномах ендометрію з анеуплоїдією. За даними літератури, остання може бути результатом мутації в гені *K-RAS*, що часто відбувається при злоякісних новоутвореннях різного генезу, і пов'язана з агресивним перебігом пухлинного процесу [4, 13]. Так, у хворих з інвазивною карциною молочної залози анеуплоїдія корелює з розвитком метастазів у лімфатичних вузлах та несприятливим перебігом захворювання [9, 13, 18].

Згідно даних літератури, одним з найбільш значущих факторів агресивності РЕ є не тільки плідність пухлинних клітин, а також величина показників іДНК [10, 18, 19]. Слід зазначити, що досліджені нами анеуплоїдні карциноми ендометрію зі значеннями іДНК $\geq 2,0$ відрізнялись низьким ступенем диференціювання і глибокою інвазією у міометрій.

Відомо, що ключовою біологічною характеристикою злоякісних новоутворень, яка впливає на особливості пухлинного процесу та його злоякісність і обумовлена не тільки інактивізацією онкогенів, а і генів-супресорів, є проліферативна активність. Так, виявлений високий ІП у клітинах РЕ, особливо у новоутвореннях з анеуплоїдією, може бути результатом аберантної експресії онкогена *K-RAS*, який активує компоненти MEK1/2, ERK1/2 та P38MAPK шляху RAS-RAF-Mek-ERK і, таким чином, сприяє неконтрольованій проліферації злоякісних клітин ендометрію [20].

Не виключено, що зростання проліферативного потенціалу може бути зумовлено низькою експресією білків онкосупресорів — p16^{INK4a} і p21^{WAF1/CIP1}, яка характерна для пухлин ендометрію з високим ступенем злоякісності [9, 21]. Слід зазначити, що білок p21^{WAF1/CIP1} запобігає фосфорилуванню pRb шляхом інгібування активації комплексів цикліну E/cdk2 і є негативним регулятором фактора транскрипції E2F1, онкогена *c-Myc* і *STAT3* [21, 22]. Низький рівень експресії p16^{INK4a} може бути результатом мутації або гіперметилування промотора його гена, внаслідок чого може спостерігатись надмірна активність комплексів циклін D1/Cdk4 і циклін D1/Cdk6 та фосфорилування pRb, що відмічали у багатьох неоплазіях людини [23–25].

Крім цього, більш високий ІП у пухлинах ендометрію з анеуплоїдією порівняно з диплоїдними

новоутвореннями (що показано власними дослідженнями) може бути пов'язаний зі змінами експресії маркерів міжклітинної адгезії, а саме зі зростанням експресії Е-кадгерину у цитоплазмі і β -катеніну у ядрі, що зумовлює активацію експресії онкогенів *C-MYC*, цикліну *D1* і *VEGF*, та призводить до зростання проліферативного та ангиогенного потенціалу злоякісного новоутворення [26, 27].

Таким чином, вперше у хворих на ЕКЕ з I стадією захворювання встановлено, що висока експресія К-RAS асоціюється з такою ознакою генетичної нестабільності, як анеуплоїдія, високим проліферативним потенціалом, глибокою інвазією та корелює з виникненням метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах упродовж 1,8–36,6 міс.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено позитивний кореляційний зв'язок ($r = 0,5$, $p < 0,05$) експресії К-RAS з виникненням метастазів у хворих на ЕКЕ. Більш висока ($p < 0,05$) експресія К-RAS спостерігалась у карциномах ендометрію хворих з метастатичним ураженням порівняно з ЕКЕ хворих без метастазів.

2. У ЕКЕ хворих з метастазами популяція анеуплоїдних клітин визначалась у 20% випадків і такі пухлини характеризувались гіперплоїдним патерном, більш високою експресією К-RAS та індексом проліферації порівняно з цими показниками у диплоїдних пухлинах хворих з метастазами.

3. Встановлено, що в ЕКЕ хворих з анеуплоїдією метастази виникали раніше ($p = 0,048$) порівняно з новоутвореннями осіб цієї групи хворих з диплоїдним набором хромосом.

4. Комплексне дослідження показників ДНК-статусу пухлинних клітин та клініко-морфологічних характеристик ЕКЕ на ранніх стадіях розвитку захворювання становить підґрунтя для визначення можливості виникнення у хворих метастазів і пов'язаної з цим оптимальної тактики лікування, а також прогнозування його ефективності з подальшим моніторингом перебігу пухлинного процесу.

Робота виконувалась у рамках цільового наукового проекту НАН України “Значення експресії маркерів нестабільності геному у прогресуваччій раку ендометрію” (2023 р.), № держреєстрації 0123U102507.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Kotsantis P, Petermann E, Boulton SJ. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *Cancer Discov* 2018; **8** (5): 537–55. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1461.
- Buchynska LG, Glushchenko NM, Nesina IP, et al. Molecular phenotype of high-grade endometrioid carcinoma of the endometrium. *Exp Oncol* 2020; **42** (4): 300–5. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-4.15450.
- Ngoi NYL, Sundararajan V, Tan DS. Exploiting replicative stress in gynecological cancers as a therapeutic strategy. *Int J Gynecol Cancer* 2020; **30** (8): 1224–38. doi: 10.1136/ijgc-2020-001277.
- Cáceres-Gutiérrez RE, Alfaro-Mora Y, Andonegui MA, et al. The Influence of Oncogenic RAS on Chemotherapy and Radiotherapy Resistance Through DNA Repair Pathways. *Front Cell Dev Biol* 2022; **10**: 751367. doi: 10.3389/fcell.2022.751367.
- Concin N, Matias-Guiu X, Vergote I, et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2021; **31** (1): 12–39. doi: 10.1136/ijgc-2020-002230.
- Rabban JT, Gilks CB, Malpica A, et al. Issues in the Differential Diagnosis of Uterine Low-grade Endometrioid Carcinoma, Including Mixed Endometrial Carcinomas: Recommendations from the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol* 2019; **38** (1; Suppl 1): S25–S39. doi: 10.1097/PGP.0000000000000512.
- Movchan OM, Svintsitskiy VS, Tsip NP, et al. Features of recurrence of endometrioid type endometrial cancer of I stage. *Exp Oncol* 2021; **43** (4): 365–9. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-4.17052.
- Buchynska LG. Endometrial cancer: taxonomy of genetic changes of tumor cells and their role in determination of malignant potential: Abstract of the D.Sc. Dissertation (speciality 14.01.07 — oncology). R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2012. 34 p. (in Ukrainian).
- Iurchenko NP, Glushchenko NM, Buchynska LG. Assessment of DNA status and peculiarities of expression of cyclins D1, E and transcription factor E2F1 in cells of epithelial endometrial tumors. *Oncology* 2019, **21** (3): 230–7 (in Ukrainian). doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-21-3-2019-g.7783.
- Song T, Lee J-W, Kim H-J, et al. Prognostic significance of DNA ploidy in stage I endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2011; **122** (1): 79–82. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.03.017.
- Pradhan M, Abeler VM, Danielsen HE, et al. Prognostic importance of DNA ploidy and DNA index in stage I and II endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. *Ann Oncol* 2012; **23** (5): 1178–84. doi: 10.1093/annonc/mdr368.
- Banno K, Yanokura M, Iida M, et al. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics. *J Obstet Gynaecol Res* 2014; **40** (8): 1957–67. doi: 10.1111/jog.12442.
- Sideris M, Emin EI, Abdullah Z, et al. The Role of KRAS in Endometrial Cancer: A Mini-Review. *Anticancer Res* 2019; **39** (2): 533–9. doi: 10.21873/anticancer.13145.
- Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon: IARC 2014: 307 p.
- Al Zubaidi T, Gehrisch OHF, Genoio MM, et al. Targeting the DNA replication stress phenotype of KRAS mutant cancer cells. *Sci Rep* 2021; **11** (1): 3656. doi: 10.1038/s41598-021-83142-y.
- Cáceres-Gutiérrez RE, Alfaro-Mora Y, Andonegui MA, et al. The Influence of Oncogenic RAS on Chemotherapy and Radiotherapy Resistance Through DNA Repair Pathways. *Front Cell Dev Biol* 2022; **10**: 751367. doi: 10.3389/fcell.2022.751367.
- Birkeland E, Wik E, Mjøs S, et al. KRAS Gene Amplification and Overexpression but Not Mutation Associates with Aggressive and Metastatic Endometrial Cancer. *Br J Cancer* 2012; **107** (12): 1997–2004. doi: 10.1038/bjc.2012.477.
- Xu J, Huang L, Li J. DNA aneuploidy and breast cancer: a meta-analysis of 141,163 cases. *Oncotarget* 2016; **7** (37): 60218–29. doi: 10.18632/oncotarget.11130.

19. Pattheya A, Bomanb K, Tavelinb B, *et al.* Combination of aneuploidy and high S-phase fraction indicates increased risk of relapse in stage I endometrioid endometrial carcinoma. *Acta oncol* 2021; **60** (9): 1218–24. doi:10.1080/0284186X.2021.1939146.
20. Bell DW, Ellenson LH. Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma *Annu Rev Pathol* 2019; **14**: 339–67. doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-043609.
21. Kreis NN, Louwen F, Yuan J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 2019; **11** (9): 1220. doi: 10.3390/cancers11091220.
22. Felix AS, Sherman ME, Hewitt SM, *et al.* Cell-cycle protein expression in a population-based study of ovarian and endometrial cancers. *Front Oncol* 2015; **5**: 25. doi: 10.3389/fonc.2015.00025.
23. Bhagat R, Kumar SS, Vaderhobli S, *et al.* Epigenetic alteration of p16 and retinoic acid receptor beta genes in the development of epithelial ovarian carcinoma. *Tumour Biol* 2014; **35** (9): 9069–78. doi: 10.1007/s13277-014-2136-1
24. Salo-Mullen EE, O'Reilly EM, Kelsen DP, *et al.* Identification of germline genetic mutations in patients with pancreatic cancer. *Cancer* 2015; **121** (24): 4382–8. doi: 10.1002/cncr.29664
25. Feng W, Han Z, Zhu R, *et al.* Association of p16 gene methylation with prostate cancer risk: a meta-analysis. *J BUON* 2015; **20** (4): 1074–80. PMID: 26416059.
26. Nesina IP, Iurchenko NP, Buchynska LG. Markers of the epithelial-mesenchymal transition in the cells of endometrial carcinoma. *Exp Oncol* 2018; **40** (3): 218–22. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-21-3-2019-g.7783.
27. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol* 2020; **13** (6): 100773. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100773.

THE VALUE OF THE EXPRESSION OF K-RAS AND DNA-STATUS IN THE PROGRESSION OF ENDOMETRIOID ENDOMETRIAL CARCINOMA IN PATIENTS WITH EARLY STAGES OF TUMOR PROCESS

N.P. Iurchenko, N.M. Glushchenko, O.V. Skachkova, I.O. Marchenko, L.G. Buchynska

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: evaluation of DNA ploidy and K-RAS oncoprotein expression in endometrioid endometrial carcinoma (EEC) to determine the metastatic potential of patients with an initial stage of the malignant process.

Objects and methods: the study was conducted on samples of postoperative material of 54 patients with EEC stage I according to FIGO (average age: 60.4 years; part from 38 to 72 years). Clinical, morphological, immunohistochemical, flow cytometry, and statistical methods were used for the research. **Results:** retrospective analysis of medical history revealed patients with EEC who developed metastases in regional lymph nodes within 1.8–36.6 months. On the basis of this, two groups of studies were formed: I — EEC of patients without metastases ($n = 34$), II — patients with metastases ($n = 20$). As a result of the evaluation of the clinical and pathological features of EEC, it was established that G1–G2 tumors predominated (79.4%) in patients of the I group, and

in 70.6% of cases, not deep invasion of the myometrium was detected. 55.0% of EEC of the II group had a low degree of differentiation with the deep invasion of the myometrium, which was correlated with a high expression of the oncoprotein K-RAS and the proliferation index. Aneuploidy with $iDNA \geq 2.0$ was observed in 20.0% of EEC II group. In such regions, a probably higher expression of K-RAS was determined with this indicator in diploid carcinomas of this group. In addition, the term of occurrence of metastases in patients with aneuploidy was probably shorter than in patients of this group with diploid statuses. **Conclusions:** it was established that the expression of the K-RAS oncoprotein and DNA ploidy in EEC are associated with the course of the tumor process in stage I patients, which makes it possible to verify patients with a high risk of metastasis.

Key words: endometrioid endometrial carcinoma, metastasis, K-RAS oncoprotein, DNA content, proliferation index, aneuploidy.

Адреса для листування:

Юрченко Н.П.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: laboncogen@gmail.com

Одержано: 13.03.2023