

Використання мікроРНК–34а для діагностики плеоморфних аденослинних залоз

І. С. Бродецький¹, В. О. Маланчук¹, В. Є. Досенко²

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ,

²Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, м. Київ

Application of microRNA–34a for diagnosis of pleomorphic adenomas of salivary glands

I. S. Brodetskyi¹, V. O. Malanchuk¹, V. E. Dosenko²

¹Bogomolets National Medical University, Kyiv,

²Bogomolets Institute of Physiology, Kyiv

Реферат

Мета. Визначення експресії мікроРНК–34а у тканинах плеоморфних аденослинних залоз, прилеглих до пухлини тканини слинної залози, інтактній тканині слинної залози, що не мала зв'язку з пухлиною, та венозній крові.

Матеріали і методи. Дослідження проведено щодо 20 хворих з доброякісними пухлинами великих слинних залоз (плеоморфними аденомами). Експресію мікроРНК–34а оцінювали за допомогою зворотної транскрипції та кількісної полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу.

Результати. Проведеним аналізом рівня експресії мікроРНК–34а в тканині пухлини, прилеглий до пухлини тканини слинної залози, інтактній тканині слинної залози, що не мала зв'язку з пухлиною, та венозній крові у хворих з плеоморфними аденомами великих слинних залоз виявлено, що найвищим він був у прилеглий до пухлини тканині слинної залози – $1052,02 \pm 367,20$ порівняно з відповідним показником в інтактній залозі – $47,72 \pm 28,93$.

Висновки. Рівень експресії мікроРНК–34а у тканинах плеоморфних аденослинних залоз, який у 11 разів вище, ніж у нормі (в інтактній тканині слинної залози), може бути використаний як генетичний маркер для верифікації цього виду пухлин.

Ключові слова: плеоморфні аденослини; генетичні дослідження; мікроРНК–34а; апоптоз.

Abstract

Objective. Determination of expression of microRNA–34a in tissues of pleomorphic adenomas of large salivary glands, adjacent to tumor salivary gland tissue, intact tissue of a salivary gland, which was not connected with the tumor, and in a venous blood as well.

Materials and methods. The investigation was conducted in 20 patients, suffering benign tumors of large salivary glands (pleomorphic adenomas). Expression was estimated, using reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction in regime of a real time.

Results. Analysis of the expression level for microRNA–34a was conducted in the tumoral tissue, adjacent to the tumor salivary gland tissue, and in intact tissue of salivary gland, which lacked a link with the tumor, the venous blood in patients, suffering pleomorphic adenomas of large salivary glands, and there was revealed, that it have appeared the highest in the salivary gland adjacent to the tumor – (1052.02 ± 367.20) , comparing with the same index in the intact gland – 47.72 ± 28.93 .

Conclusion. Level of expression of microRNA–34a in the tissues of pleomorphic adenomas of salivary glands, which is in 11 times higher, than in norm (in intact tissue of salivary gland), may be applied as a genetic marker for verification of these tumors.

Keywords: pleomorphic adenomas; genetic investigations; microRNA–34a; apoptosis.

Лише 20% пухлин слинних залоз (СЗ) є злякисними [1]. Ці пухлини виникають у великих і малих СЗ у осіб старше 60 років, однаково часто у чоловіків та жінок [2]. Вони мають розмаїття фенотипів, біологічну та клінічну гетерогенність. Причому у 80% хворих пухлини локалізуються у привушних СЗ, і 40% таких пухлин є злякисними [3].

Найбільш поширена пухлина СЗ – плеоморфна аденослина (ПА). Вона становить 60 – 90% усіх доброякісних пухлин СЗ [4], має типову клінічну картину, тому без труднощів діагностується сучасним лікарем. Незважаючи на це, частота розбіжностей клінічного та патогістологічного діагнозів залишається достатньо високою – до 41,81% [5]. Це спонукає науковців та лікарів звертатися до більш су-

часних методів діагностики пухлин – імуногістохімічних та генетичних. Імуногістохімічні дослідження пухлин СЗ, зокрема ПА, розвиваються достатньо стрімко. Відомо вже чимало різноманітних прогностичних маркерів ПА: етіологічних – ПЛАГ 1 (ген ПА №1), вірусних – вірус папіломи людини (ВПЛ) та вірус Епштейна – Барр (ВЕБ), гормональних – естрогени, прогестерон тощо [6].

Сучасним генетичним напрямом у діагностиці пухлин є вивчення ролі мікроРНК – групи малих некодуєчих РНК, які мають довжину 21 – 23 нуклеотиди та виявляються в усіх еукаріотичних клітинах. У 2014 р. була створена єдина база мікроРНК, яка налічує 2588 мікроРНК людини та 1915 мікроРНК мишей. Також досліджено, що мікроРНК

регулюють приблизно 60% людських генів [7], такі біологічні процеси, як контроль клітинного циклу [8], апоптоз [9], метаболізм [10], розвиток та диференціацію [11] клітин, а також втягнуті в розвиток різноманітних захворювань, зокрема нейродегенеративних [12] та метаболічних [13] розладів, раку [14].

МікроРНК відповідають за постраскрипційну експресію генів і поділяються на дві групи – проапоптозні (miR-15a, miR-16-1, miR-29, miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-1, miR-214) та антиапоптозні (miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-133, miR-146a, miR-146b, miR-191, miR-14, miR-1d, miR-7, miR-148, miR-204, miR-210, miR-216, miR-296, miR-Lat). Найбільший інтерес серед них викликає проапоптозна мікроРНК-34a. Ця мікроРНК експресується у 96% ПА С3. В. С. Flores і співавтори вказують на те, що у відповідь на пошкодження ДНК мікроРНК-34a як мішень р53 індукуює зупинку клітинного циклу в G1-фазі поряд з процесами апоптозу [15]. Втім, є всього одна наукова робота, в якій для вивчення експресії мікроРНК-34a використовували лише біоптат пухлини та порівнювали рівень експресії мікроРНК-34a в тканинах аденокарциноми та ПА без контролю [15]. Статей, у яких було б описано експресію мікроРНК-34a не тільки в тканинах пухлин, а й в інших біоптатах – прилеглий до пухлини тканині С3, інтактній С3 (контроль) та венозній крові, немає.

Мета дослідження: визначення експресії мікроРНК-34a в тканинах ПА великих С3; прилеглий до пухлини тканині С3; інтактній тканині С3, що не мала зв'язку з пухлиною, та венозній крові.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено щодо 20 хворих з доброякісними пухлинами (ПА) великих С3. Привушні пухлини діагностовані у 18 (90%), підщелепні – у 2 (10%) хворих. Чоловіків було – 5 (25%), жінок – 15 (75%). Середній вік хворих становив (39,7 ± 14,91) року. Усім хворим проведено загальноклінічне обстеження (лабораторні дослідження, комп'ютерна або магнітно-резонансна томографія, ультразвукове дослідження).

Загальну РНК виділили з тканин ПА великих С3, прилеглої до пухлини тканині С3, інтактної тканині С3, що не мала зв'язку з пухлиною, та венозної крові методом екстракції сумішшю фенол-хлороформ. Потім виміряли концентрацію та чистоту РНК на спектрофотометрі NanoDrop ND 1000 (Technologies Inc., США).

Експресію мікроРНК-34a оцінювали за допомогою зворотної транскрипції та кількісної полімеразної лан-

цюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу. Зворотну транскрипцію проводили за допомогою набору реактивів TaqMan MicroRNA (Applied Biosystems, США) зі специфічним праймером для мікроРНК та 10 нг загальної РНК. У реальному часі були використані аналізи мікроРНК qPCR TaqMan (Applied Biosystems, США): U6 snRNA, ID001973 (як ендогенний контроль), hsa-miR-34a, ID000426 (Applied Biosystems, США). Температурні цикли були такими: стадія початкової денатуралізації 95 °C 10 хв; 50 циклів 95 °C – 15 с та 60 °C – 60 с. Рівень експресії мікроРНК нормалізувався до U6 snRNA та був представлений у відносних одиницях (RU). Ампліфікацію проводили за допомогою ПЛР у режимі реального часу 7500Fast (Applied Biosystems, США). Отримані результати проаналізовані за допомогою програмного пакета постановки ПЛР у режимі реального часу 7500Fast та представлені у вигляді графіків і діаграм.

Статистичний аналіз даних проведений за допомогою статистичного середовища R (версія 3.5). Усі кількісні фактори перевірені щодо нормальності розподілу даних за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова. Тест Левена використаний для перевірки рівності дисперсій між групами. Для з'ясування відмінностей між середніми значеннями у групах застосований однофакторний дисперсійний аналіз (One way ANOVA) щодо змінних, у яких простежувалась рівність дисперсій між групами, а також тести Уелча та Брауна-Форсайта у разі, коли дисперсії суттєво відрізнялись. Апостеріорні тести Бонфероні використані для корекції множинності. Кореляційний аналіз із використанням коефіцієнта кореляції Пірсона (r) застосовували для оцінки зв'язку між кількісними змінними. Статистично значущими результати вважали, коли значення р були менше 0,05.

Результати

Дані описової статистики рівнів експресії мікроРНК-34a в тканині пухлини, прилеглої до пухлини тканині С3, інтактній тканині С3, що не мала зв'язку з пухлиною, наведені в *табл. 1*.

Для оцінки рівності дисперсій між групами біологічних тканин ми використали тест Левена та отримали такі результати: критерій Левена 9,600; $p < 0,05$.

Оскільки дисперсії між групами виявилися нерівними ($p < 0,05$), різниця між середніми значеннями рівня експресії мікроРНК-34a була проаналізована за допомогою тестів Уелча та Брауна-Форсайта. Для обох тестів різниця між середніми значеннями рівня експресії мікроРНК-34a була статистично значущою: $p < 0,05$.

Отже, за результатами застосування однофакторного дисперсійного аналізу ми виявили статистично значущу різницю між рівнями експресії мікроРНК-34a.

Щоб з'ясувати, які самі групи біологічних тканин відрізнялись за рівнем експресії мікроРНК-34a між собою, нами використані тести Бонфероні для корекції множинності (*табл. 2*).

Таким чином, статистично значущо рівень експресії мікроРНК-34a різнився в пухлині та інтактній тканині

Таблиця 1. Дані описової статистики щодо рівня експресії мікроРНК-34a у групах біологічних тканин

Групи біологічних тканин	Статистичні показники			
	кількість	середнє значення	стандартне відхилення	стандартна похибка
Інтактна С3	16	47,72	115,73	28,93
Пухлина	15	539,09	614,66	158,70
Прилегла С3	13	1052,02	1323,98	367,20

Таблиця 2. Результати використання тестів Бонфероні

Порівнювані групи біологічних тканин	Різниця між середніми значеннями	p <
Пухлина-інтактна тканина С3	491,37	0,05
Прилегла С3 - інтактна тканина С3	1004,3	0,05

С3, а також у прилеглий С3 та інтактній тканині С3 (див. рисунок).

Проведеним аналізом рівня експресії мікроРНК-34а у трьох групах біологічних тканин у хворих з ПА великих С3 виявлено, що найвищим рівень експресії був у прилеглий до пухлини тканині С3 – $1052,02 \pm 367,20$ порівняно з відповідним показником в інтактній С3 – $47,72 \pm 28,93$.

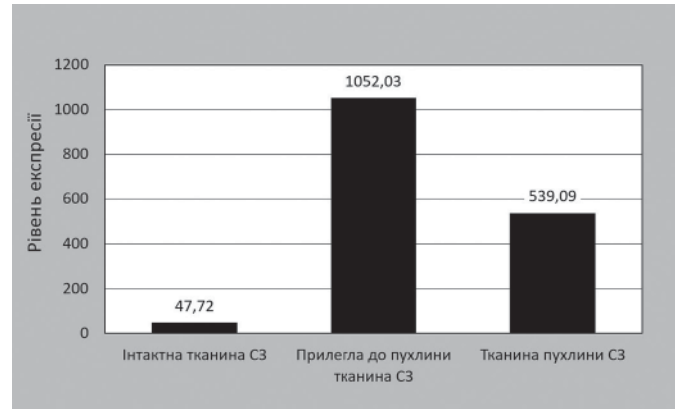
Також нами було визначено рівень експресії мікроРНК-34а в крові (табл. 3)

Як видно з наведених у табл. 1 та 3 даних, рівень експресії мікроРНК-34а у венозній крові є нижчим, ніж у інтактній С3. Таким чином, використовувати визначення рівня експресії мікроРНК-34а в крові як діагностичного маркера для ПА С3 недоцільно.

Обговорення

Генетичний метод дослідження набирає оберті у сучасній науці та медицині. У діагностиці пухлин С3 можна використовувати велику кількість молекул мікроРНК – від 22 до 95, що значно розширює можливості верифікації цих пухлин та дає можливість створити різні групи лікарських засобів для впливу на різні ланки онкогенезу [16]. Серед більшості мікроРНК для пухлин С3 значний інтерес становлять проапоптозні молекули – miR-15a, miR-16-1, miR-29, miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-1 та miR-214.

Проведений нами аналіз експресії мікроРНК-34а у пацієнтів з ПА великих С3 показав, що найвищий рівень експресії спостерігався у прилеглий до пухлини тканині С3, він був більш як у 20 разів вищий, ніж у тканині інтактної С3, що не межувала з пухлиною – відповідно $1052,02 \pm 367,20$ та $47,72 \pm 28,93$. Водночас рівень експресії мікроРНК-34а в тканинах пухлини був у 11 разів вищим, ніж у тканині інтактної С3 – відповідно $539,09 \pm 158,70$ та $47,72 \pm 28,93$. В. С. Flores і співавтори спостерігали експресію мікроРНК-34а в тканинах пухлини, рівень якої дорівнював 8 ум. од. [15]. Нашим аналізом встановлено, що рівні експресії мікроРНК-34а у прилеглий до пухлини тканині С3 та тканині пухлини різнилися між собою майже у 2 рази – відповідно $1052,02 \pm 367,20$ та $539,09 \pm 158,70$. Таке підвищення експресії мікроРНК-34а у прилеглий до пухлини тканині залози може бути пов'язано із захисною (стримуючою) функцією організму щодо розповсюдження пухлинних клітин на навколишні тканини С3. Проапоптозні мікроРНК-34а посилюють апоптоз клітин і в такий спосіб стримують поширення пухлини. З іншого боку, підвищення процесів проліферації та диференціації клітин у прилеглий до пухлини С3 є проявом підвищеної активності (метаболізму) клітин залози і одним із проявів пе-



Рівні експресії мікроРНК-34а у хворих з ПА великих С3 у групах біологічних тканин.

Таблиця 3. Дані описової статистики щодо рівня експресії мікроРНК-34а в крові

Об'єкт дослідження	Статистичні показники			
	кількість	середнє значення	стандартне відхилення	стандартна похибка
Венозна кров	16	17,45	23,73	6,12

реродження та трансформації їх у пухлинний компонент. Ці дослідження ще раз підтверджують на генетичному рівні необхідність виконання не тільки енуклеації пухлини (часткової паротидектомії), а й субтотальної резекції з видаленням прилеглої до пухлини С3, тому що в цій ділянці, окрім бар'єрної функції (підвищений апоптоз), відбуваються активні проліферативні зміни.

У венозній крові рівень експресії мікроРНК-34а становив $17,45 \pm 6,129$ та був нижчим, ніж у інтактній залозі – $47,72 \pm 28,93$, що не є статистично достовірним. Отже, цей показник не може бути діагностичним критерієм для генетичної верифікації ПА на доопераційному етапі. У свою чергу достатньо високий рівень експресії мікроРНК-34а в тканинах пухлини ПА великих С3 у порівнянні з нормою (в інтактній тканині С3) – відповідно $539,09 \pm 158,70$ та $47,72 \pm 28,93$ може бути використаний як генетичний маркер для верифікації (ідентифікації) цього виду пухлин. Високий рівень експресії проапоптозної мікроРНК-34а у прилеглий до пухлини тканині С3 у хворих з ПА великих С3 у порівнянні з нормою (в інтактній тканині С3) – відповідно $1052,02 \pm 367,20$ та $47,72 \pm 28,93$ свідчить про ураження пухлинними клітинами цієї ділянки С3, що може бути однією з причин рецидиву та прогресування росту пухлини.

Підвищений вміст проапоптозної мікроРНК-34а в пухлині та прилеглий до пухлини тканині залози не стримують розвитку пухлини. Закономірно виникає запитання, чому у разі підвищення в 11 разів вмісту мікроРНК у пухлині в порівнянні з нормою протипухлинні механізми людини, зокрема й апоптоз, не спричинюють регресу пухлини? Можлива така відповідь на це запитання: наявність додаткових механізмів захисту у самій пухлині, що самовдосконалюється та адаптується в організмі людини. Як

правило, злоякісні пухлини пригнічують процес апоптозу, зменшуючи експресію більшості проапоптозних мікроРНК, що дозволяє пухлині швидко рости, прогресувати та поширюватися на сусідні ділянки. Можна припустити, що високий вміст проапоптозних мікроРНК у ПА СЗ свідчить про активні захисні механізми організму, які стримують активний ріст пухлини. Клінічно це виражається в повільному рості пухлини протягом тривалого часу, повільній інвазії на сусідні ділянки інтактної залози.

Таким чином, проведення генетичного дослідження ПА СЗ із використанням мікроРНК–34а дає змогу визначити можливі шляхи впливу цього маркера на патогенез зазначених пухлин та підтвердити на генетичному рівні необхідність виконання субтотальної резекції СЗ.

Висновки

1. Проведений аналіз рівня експресії мікроРНК–34а у венозній крові показав, що він у 2,8 рази нижче, ніж у нормі (в інтактній залозі), а отже, не може бути діагностичним критерієм для генетичної верифікації ПА на доопераційному етапі. Тому для визначення рівня експресії мікроРНК–34а необхідно використовувати лише тканини біопсійного матеріалу пухлини.

2. Рівень експресії мікроРНК–34а в тканинах ПА великих СЗ, який у 11 разів вище, ніж у нормі (в інтактній тканині СЗ), може бути використаний як генетичний маркер для верифікації (ідентифікації) цього виду пухлин.

3. Проведеним кореляційним аналізом рівня експресії мікроРНК–34а в різних фрагментах біопсійного матеріалу хворих з ПА великих СЗ виявлено, що він статистично значущо відрізнявся в пухлині та інтактній тканині СЗ, а також у прилеглий СЗ та інтактній тканині СЗ.

4. Дані проведених досліджень біопсійного матеріалу хворих з ПА великих СЗ на генетичному рівні (за експресією мікроРНК–34а) ще раз підтверджують необхідність виконання не тільки енуклеації пухлини (часткової паротидектомії), а й субтотальної резекції з видаленням прилеглої до пухлини СЗ.

Підтвердження

Фінансування. Власним коштом.

Інформація про внесок кожного учасника. Бродецький І. С. – концепція і дизайн дослідження, аналіз отриманих даних; Маланчук В. О., Досенко В. Є. – збір та опрацювання матеріалів.

Конфлікт інтересів. Автори, які взяли участь в цьому дослідженні, заявили, що у них немає конфлікту інтересів щодо цього рукопису.

Згода на публікацію. Всі автори прочитали і схвалили остаточний варіант рукопису. Всі автори дали згоду на публікацію цього рукопису.

References

1. To VS, Chan JY, Tsang RK, Wei WI. Review of salivary gland neoplasms. *ISRN Otolaryngol*. 2012;2012:872982. doi: 10.5402/2012/872982.
2. Licitra L, Grandi C, Prott FJ, Schornagel J H, Bruzzi P, Molinari R. Major and minor salivary glands tumours. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;45(2): 215–25. doi:10.1016/S1040–8428(02)00005–7.
3. Adelstein DJ, Koyfman SA, El–Naggar AK, Hanna EY. Biology and management of salivary gland cancers. *Semin Radiat Oncol*. 2012; 22(3):245–53. doi: 10.1016/j.semradonc.2012.03.009.
4. Matyakin EG, Drobyshev AYU, Azizyan RI. Recidivy smeshannyh opuholey okoloushnyh sljunnyh zhelez. *Stomatologiya*. 2010;89(1):75–7. [In Russian].
5. Brodetskyi IS, Malanchuk VO. Analysis of archive material of patients with salivary gland neoplasms according to the department of O.O. Bogomolets National Medical University for the last five years. *Journal of Stomatology*. 2019;72(2):70–6. doi:10.5114/jos.2019.86986.
6. Brodetskyi IS, Malanchuk VO, Krotevych MS. Complex immunohistochemical evaluation of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Healthy Aging Research*. 2019;8(2):1–6. doi:10.5114/jos.2019.86986.
7. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 23;136(2):215–33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
8. Carleton M, Cleary MA, Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2007;6(17):2127–32. doi: 10.4161/cc.6.17.4641.
9. Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene*. 2006;25(46):6176–87. doi: 10.1038/sj.onc.1209912.
10. Boehm M, Slack FJ. MicroRNA control of lifespan and metabolism. *Cell Cycle* 2006;5(8):837–40. doi: 10.4161/cc.5.8.2688.
11. Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15(4):410–5. doi: 10.1016/j.gde.2005.06.012.
12. Jin P, Alisch RS, Warren ST. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol*. 2004;6(11):1048–53. doi: 10.1038/ncb1104–1048.
13. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma XS, MacDonald PE, et al. A pancreatic islet–specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;432(7014):226–30. doi: 10.1038/nature03076.
14. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez–Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834–8. doi: 10.1038/nature03702.
15. Flores BC, Lourenço SV, Damascena AS. Altered expression of apoptosis–regulating miRNAs in salivary gland tumors suggests their involvement in salivary gland tumorigenesis. *Virchows Arch*. 2017;470(3):291–9. doi: 10.1007/s00428–016–2049–z
16. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer – a brief overview. *Adv Biol Regul*. 2015;57:1–9. doi: 10.1016/j.jbior.2014.09.013.
17. Denaro M, Navari E, Ugolini C, Seccia V, Donati V, Casani AP, et al. A microRNA signature for the differential diagnosis of salivary gland tumors. *PLoS ONE*. 2019;14(1):e0210968. doi:10.1371/journal.pone.0210968.

Надійшла 30.08.2019