



І. С. Бродецький

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

Клінічно-генетичний і міжгенетичний кореляційний аналіз (за експресією мікроРНК-34а) у хворих із плеоморфними аденомами слинних залоз

Вступ. Плеоморфна аденома – найбільш поширена пухлина слинних залоз (60,0–90,0 % усіх доброякісних пухлин слинних залоз) [2]. Вона має типові клінічні ознаки, а тому її діагностика не становить проблеми для сучасного лікаря. Попри це, помилки в діагностиці цієї пухлини (відсутність збігу клінічного та патогістологічного діагнозів) трапляються часто (до 41,8 % випадків) [5]. Тому більшість науковців і лікарів-практиків звертаються до більш сучасних методів діагностики пухлин – імуногістохімічних та генетичних.

Імуногістохімічне дослідження плеоморфних аденом слинних залоз – досить поширений метод. Існує багато різноманітних прогностичних маркерів плеоморфної аденоми: етіологічні – ген плеоморфної аденоми № 1 (ПЛАГ 1), вірусні – вірус папіломи людини (ВПЛ) та М. А. Епштейна – І. Барр вірус (ЕБВ), гормональні – естрогени, прогестерон тощо [4].

Сучасний напрям у генетичному дослідженні пухлин передбачає вивчення ролі молекул мікроРНК (miR). МікроРНК – малі некодуєчі РНК, які складаються з 21–23 нуклеотидів. Відомо близько 2588 мікроРНК, які регулюють такі біологічні процеси, як контроль клітинного циклу [6], апоптоз [10], метаболізм [3], розвиток і диференціація клітин [8]. Водночас вони здатні впливати на виникнення різноманітних хвороб – невродегенеративні [9] та метаболічні розлади [12], рак [11].

МікроРНК відповідають за посттранскрипційну експресію генів і поділяються на дві групи – проапоптозні (miR-15a, miR-16-1, miR-29, miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-1, та miR-214) і 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, and miR-Lat). Найбільший інтерес серед них становить проапоптозна

мікроРНК-34а, яка експресується у 96,0 % плеоморфних аденом слинних залоз. В. С. Flores et al. вказують на те, що у відповідь на ушкодження дезоксирибонуклеїнової кислоти miR-34a, як p53 мішень, індукуює зупинення клітинного циклу в G1 поряд із процесами апоптозу [7].

Окрім використання для діагностики плеоморфних аденом слинних залоз генетичних методів слід враховувати їх взаємозв'язок із клінічними показниками. Як відомо, різні клінічні показники мають певний вплив і дають різний прогноз щодо перебігу пухлинного процесу. Так, що старша людина, то повільніші метаболічні процеси, і тривалість життя з пухлиною, особливо злоякісною, довше, ніж у людей молодого віку. Тривалість хвороби допомагає прогнозувати її перебіг і можливість виникнення рецидивів після проведення оперативного втручання. Визначення розміру пухлини, локалізація біля життєво важливих органів і судин (що більший розмір пухлини, особливо глибокої локалізації, то більша ймовірність охоплення її судинами великого калібру та розташування біля життєво важливих органів) має допомогти лікареві визначитися із лікуванням (хірургічне або консервативне). Глибина розташування пухлини щодо поверхні шкіри є важливим діагностичним критерієм, оскільки що ближче пухлина до шкіри, то швидше людина зауважить наявність новоутворення і звернеться до лікаря [1].

Лише в одній науковій роботі визначали експресію мікроРНК-34а, застосовуючи лише біоптат пухлини, порівнюючи показники експресії між аденокарциномами та плеоморфними аденомами, за відсутності контрольної групи [7]. Наукових праць, у яких би описували клінічно-генетичні та міжгенетичні кореляційні асоціації за експресією мікроРНК-34а у різних біоптатах – пухлина, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна залоза (група контролю) та кров, немає.

Мета дослідження. Проаналізувати клінічно-генетичні та міжгенетичні (за експресією мікроРНК-34а) кореляційні зв'язки в тканинах плеоморфних аденом великих слинних залоз, прилеглих до пухлини тканини слинної залози, інтактній тканині слинної залози, що не була дотична до пухлини, а також у венозній крові.

Матеріали й методи дослідження. Після отримання письмової згоди на проведення комплексного обстеження відповідно до принципів Гельсінкської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину, відповідних законів України та міжнародних актів у рандомізованій спосіб із попередньою стратифікацією за наявністю доброякісних пухлин великих слинних залоз (Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 566 від 23.11.2004 р. «Про затвердження Протоколів надання медичної допомоги за спеціальностями «ортопедична стоматологія», «терапевтична стоматологія», «хірургічна стоматологія», «ортодонція», «дитяча терапевтична стоматологія», «дитяча хірургічна стоматологія»») у дослідження залучено 22 хворих із плеоморфними аденомами (з доброякісними пухлинами привушних залоз 20 (90,9 %) та з підщелепними – 2 (9,1 %) хворих), прооперованих у щелепно-лицевому відділенні № 2 Київської міської клінічної лікарні № 12 за період з 2018 по 2019 рр.

Комплексне клінічно-лабораторне та інструментальне обстеження, в тому числі з застосуванням комп'ютерної томографії (КТ), дозволило отримати інформацію про вік хворих, тривалість недуги, розмір пухлини, віддалі від поверхні шкіри до пухлини, що згодом використано для проведення міжгенетичного кореляційного аналізу за експресією мікроРНК-34а.

Загальну РНК виділяли з тканин плеоморфних аденом великих слинних залоз (тканина пухлини, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна тканина слинної залози, що не була дотична до пухлини) та венозної крові методом екстракції фенол-хлороформ. Потім вимірювали концентрацію і чистоту РНК спектрофотометром ND1000 (NanoDrop Technologies Inc, США).

Експресію MicroRNA-34a оцінювали за допомогою зворотної транскрипції та кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу. Зворотну транскрипцію проводили за допомогою набору зворотної транскрипції TaqMan MicroRNA (Applied Biosystems, США) зі специфічним праймером для мікроРНК та 10,0 нг загальної РНК. У реальному часі були використані аналізи мікроРНК qPCR TaqMan (Applied Biosystems, США): U6 snRNA (некодована мала ядерна мікроРНК), ID 001973 (як ендогенний контроль), hsa-miR-34a (людська (Хомо сапієнс) мікроРНК-34а), аналіз ID000426 (Applied Biosystems, США). Температурні цикли: стадія початкової денатуралізації 95,0 °C – 10 хв, 50 циклів 95,0 °C – 15 с і 60,0 °C – 60 с. Показник експресії мікроРНК нормалізувався до U6 snRNA та був представлений у відносних одиницях. Ампліфікацію проводили за

допомогою ПЛР у режимі реального часу 7500Fast (Applied Biosystems, США). Отримані результати були проаналізовані за допомогою програмного пакета ПЛР у режимі реального часу 7500Fast і представлені у вигляді графіків та діаграм.

Аналіз результатів проводили за допомогою статистичного середовища R (версії 3.5). Усі кількісні показники перевірено щодо нормальності їх розподілу за допомогою тесту А. Н. Колмогорова – Н. В. Смірнова. Тест Г. Левеня був використаний для перевірки рівності дисперсій між групами. Відмінності між середніми значеннями у групах з'ясували за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (One way ANOVA) для змінних, у яких простежувалась рівність дисперсій між групами, а також тестів Б. Л. Уелча та Б. М. Брауна – А. Б. Форсайта тому в випадку, якщо дисперсії суттєво відрізнялись. Апостеріорні тести С. Е. Бонфероні були використані для корекції множинності тестів. Кореляційний аналіз із використанням коефіцієнта кореляції К. Пірсона (r) застосовували для оцінювання зв'язку між кількісними змінними. Статистично значущими результати вважалися за $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати дослідження клінічних, генетичних показників, їх статистичний аналіз у хворих із плеоморфними аденомами слинних залоз наведені в табл. 1–5.

Таблиця 1

Основні клінічні показники хворих із плеоморфними аденомами великих слинних залоз (n = 22; M ± m)

Клінічні показники	Результат
Вік	39,70 ± 14,91 років
Тривалість хвороби	66,075 ± 30,580 місяців
Розмір пухлини	6,27 ± 4,66 см
Віддалі від поверхні шкіри до пухлини	5,600 ± 2,739 мм

Описова статистика показників експресії мікроРНК-34а по групах (тканина пухлини, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна тканина слинної залози, що не була дотична до пухлини) наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Показники експресії мікроРНК-34а у хворих із плеоморфними аденомами слинних залоз за групами біологічних тканин (тканина пухлини, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна тканина слинної залози, що не була дотична до пухлини)

Групи біологічних тканин	Кількість (n)	Середнє значення	Стандартне відхилення	Стандартна похибка
Інтактна залоза	16	47,72	115,73	28,93
Пухлина	15	539,09	614,66	158,70
Прилегла залоза	13	1052,02	1323,98	367,20
Кров	16	17,45	23,73	6,12

Для оцінки рівності дисперсій у показниках експресії мікроРНК-34а між групами був використаний тест Г. Левеня (табл. 3).

Таблиця 3

Результати тесту Г. Левеня для визначення рівності дисперсій у показниках експресії мікроРНК-34а у хворих із плеоморфними аденомами слинних залоз між групами біологічних тканин (тканина пухлини, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна тканина слинної залози, що не була дотична до пухлини)

Критерій Г. Левеня	Статистична значущість
9,600	$p < 0,05$

Оскільки дисперсії між групами нерівні ($p < 0,05$), різницю між середніми значеннями показників експресії мікроРНК-34а буде проаналізовано за допомогою тестів Б. Л. Уелча та Б. М. Брауна – А. Б. Форсайта (табл. 4).

Таблиця 4

Результати тестів Б. Л. Уелча та Б. М. Брауна – А. Б. Форсайта для визначення різниці між середніми значеннями показників експресії мікроРНК-34а у хворих із плеоморфними аденомами слинних залоз між групами біологічних тканин (тканина пухлини, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна тканина слинної залози, що не була дотична до пухлини)

Тест	Статистична значущість
Тест Б. Л. Уелча	$p < 0,05$
Тест Б. М. Брауна – А. Б. Форсайта	$p < 0,05$

Для з'ясування, які самі групи відрізнялись між собою, використано корекцію на множинність тестів С. Е. Бонфероні (табл. 5).

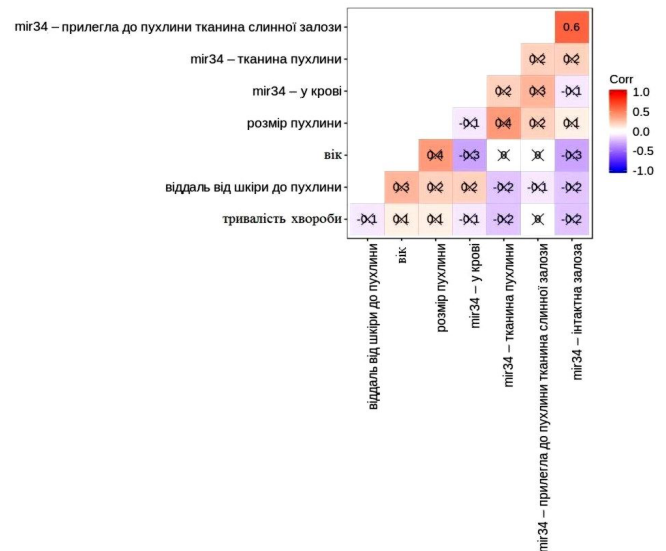
Таблиця 5

Результати корекції на множинність за тестом С. Е. Бонфероні в показниках експресії мікроРНК-34а у хворих із плеоморфними аденомами слинних залоз між групами біологічних тканин (тканина пухлини, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна тканина слинної залози, що не була дотична до пухлини)

Групи порівняння	Різниця в середніх	Статистична значущість
Пухлина – інтактна тканина слинної залози	491,37	$p < 0,05$
Прилегла залоза – інтактна тканина слинної залози	1004,30	$p < 0,05$

Кореляційний аналіз клінічних (вік, тривалість хвороби, розмір пухлини, віддаль від поверхні шкіри до пухлини) і генетичних маркерів за показниками експресії мікроРНК-34а в різних біологічних тканинах (тканина пухлини, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна тканина слинної залози, що

не була дотична до пухлини, а також венозна кров) у хворих із плеоморфними аденомами великих слинних залоз виявив відсутність статистично значущих асоціацій (див. рисунок). Аналіз міжгенетичних показників за експресією мікроРНК-34а у хворих із плеоморфними аденомами великих слинних залоз дав змогу виявити статистично значущу кореляцію лише в одній групі (мікроРНК-34а прилегла до пухлини тканина залози – мікроРНК-34а інтактна тканина слинної залози – $0,6$ ($p < 0,05$)).



Клінічно-генетичні та міжгенетичні кореляції за експресією мікроРНК-34а у хворих із плеоморфними аденомами великих слинних залоз.

Відсутність статистично значущого взаємозв'язку між клінічними та генетичними показниками (за експресією мікроРНК-34а) у хворих із плеоморфними аденомами великих слинних залоз свідчить про те, що ні вік, ні тривалість хвороби, ні розмір пухлини, ні віддаль від поверхні шкіри до пухлини не впливають на молекули мікроРНК в різних фрагментах біологічних тканин (тканина пухлини, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна тканина слинної залози, що не була дотична до пухлини, а також венозна кров). Отже, можна попередньо стверджувати, що експресія мікроРНК-34а генетично детермінована і посилення її експресії є проявом захисних механізмів організму людини у відповідь на виникнення пухлинного процесу.

Водночас наявність статистично значущих асоціацій між генетичними показниками (за експресією мікроРНК-34а) в різних групах біологічних тканин (прилегла залоза – інтактна тканина слинної залози) свідчить про те, що збільшення вмісту мікроРНК-34а у прилеглий до неї тканині слинної залози (яка ймовірно є захисною (додатковою демаркаційною зоною, що стримує пухлинний процес)) стимулює посилення експресії мікроРНК-34а й у віддаленій інтактній тканині слинної залози. Цей факт дає можливість припустити, що організм людини через активацію

апоптозу (проапоптозної мікроРНК-34а) намагається запобігти виникненню пухлинного процесу в інших ділянках слинної залози, що не є дотичними до пухлини. Це ще раз свідчить про наявність системного протипухлинного захисту в тканинах слинних залоз.

Висновки. Клінічно-генетичний кореляційний аналіз за показником експресії мікроРНК-34а різних фрагментів біологічних тканин у хворих із плеомор-

фними аденомами великих слинних залоз показав відсутність статистично значущих асоціацій. Міжгенетичний кореляційний аналіз хворих із плеоморфними аденомами великих слинних залоз із різними фрагментами біопсійного матеріалу підтвердив, що показник експресії мікроРНК-34а статистично значуще відрізняється між групами (прилегла залоза – інтактна тканина слинної залози).

Список літератури

1. Маланчук ВО. Хірургічна стоматологія та щелепно-лицева хірургія. К.: Логос; 2011. 606 с. (Malanchuk VO. Khirurgichna stomatologhiia ta shchelopno-lytseva khirurgiia. Kyiv: Lohos; 2011. 606 s.) (Ukrainian).
2. Матякин ЕГ, Дробышев АЮ, Азизян РИ. Рецидивы смешанных опухолей околоушных слюнных желез. Стоматология. 2010;89(1):75–77 (Matjakin EG, Drobyshev AJu, Azizjan RI. Recidivy smeshannyh opuholej okoloushnyh sljunnyh zhelez. Stomatologija. 2010;89(1):75-77) (Russian).
3. Boehm M, Slack FJ. MicroRNA control of lifespan and metabolism. *Cell Cycle*. 2006;5:837e40. <https://doi.org/10.4161/cc.5.8.2688>
4. Brodetskyi IS, Malanchuk VO, Krotevych MS. Complex immunohistochemical evaluation of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Healthy Aging Research*. 2019;8:1-6. Available from: <https://www.longdom.org/articles/complex-immunohistochemical-evaluation-of-pleomorphic-adenomas-of-the-salivary-glands.pdf>.
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. *J Stoma*. 2019;72(2):70-76. <https://doi.org/10.5114/jos.2019.86986>
6. Carleton M, Cleary MA, Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2007;6:2127e32. <https://doi.org/10.4161/cc.6.17.4641>
7. 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):291-299. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-2049-z>
8. Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15:410e5. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.06.012>
9. Jin P, Alisch RS, Warren ST. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol*. 2004;6:1048e53. <https://doi.org/10.1038/ncb1104-1048>
10. Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene*. 2006;25:6176e87. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209912>
11. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435:834e8. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
12. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma XS, MacDonald PE et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432:226e30. <https://doi.org/10.1038/nature03076>

Стаття надійшла до редакції журналу 19.11.2019 р.

Клінічно-генетичний і міжгенетичний кореляційний аналіз (за експресією мікроРНК-34а) у хворих із плеоморфними аденомами слинних залоз

І. С. Бродецький

Вступ. Плеоморфна аденома – найбільш поширена пухлина слинних залоз (60,0–90,0 % усіх доброякісних пухлин слинних залоз). Сучасним генетичним напрямом у діагностиці пухлин слинних залоз є вивчення ролі молекул мікроРНК. МікроРНК – малі некодуючі РНК, які регулюють клітинний цикл, апоптоз, метаболізм, розвиток і диференціацію клітин. Найбільший інтерес серед них становить проапоптозна мікроРНК-34а, яка експресується у 96,0 % плеоморфних аденом слинних залоз.

Мета. Проаналізувати клінічно-генетичні та міжгенетичні (за експресією мікроРНК-34а) кореляційні зв'язки в тканинах плеоморфних аденом великих слинних залоз, прилеглих до пухлини тканині слинної залози, інтактній тканині слинної залози, що не була дотична до пухлини, а також у венозній крові.

Матеріали й методи. У дослідження залучено 22 хворих з доброякісними пухлинами великих слинних залоз (плеоморфні аденоми). Експресію мікроРНК-34а оцінювали за допомогою зворотної транскрипції та кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу.

Результати. Проведений кореляційний аналіз клінічних (вік, тривалість хвороби, розмір пухлини, віддаль від поверхні шкіри до пухлини) та генетичних показників за показниками експресії мікроРНК-34а в різних біологічних тканинах (тканина пухлини, прилегла до пухлини тканина слинної залози, інтактна тканина слинної залози, що не була дотична до пухлини, та венозна кров) у хворих із плеоморфними аденомами великих слинних залоз виявив відсутність статистично значущих асоціацій.

Висновки. Клінічно-генетичний кореляційний аналіз за показником експресії мікроРНК-34а різних фрагментів біологічних тканин у хворих із плеоморфними аденомами великих слинних залоз виявив відсутність статистично значущих асоціацій. Проведенням міжгенетичного кореляційного аналізу хворих із плеоморфними аденомами великих слинних залоз із різними фрагментами біопсійного матеріалу констатовано, що показник експресії мікроРНК-34а статистично значуще відрізняється між групами (прилегла залоза – інтактна тканина слинної залози).

Ключові слова: плеоморфні аденоми, генетичні дослідження, мікроРНК-34а, апоптоз, клінічно-генетичні кореляції, міжгенетичні кореляції.

Clinical-Genetic and Inter-Genetic Correlation Analysis (with Expression of miRNA-34a) in Patients with Pleomorphic Adenomas of the Salivary Glands

I. Brodetskyi

Introduction. The most common tumor is pleomorphic adenoma - 60.0-90.0 % of all benign tumors of the salivary glands. The modern genetic area of focus in the diagnostics of salivary gland tumors is the study of the role of miRNA molecules. MiRNAs are small non-coding RNAs that regulate the cell cycle, apoptosis, metabolism, cell development and differentiation. Of the greatest interest among them is proapoptotic miRNA-34a. It is expressed in 96.0 % of the pleomorphic adenomas of the salivary glands. There are no articles that would describe the clinical-genetic and inter-genetic correlations with miRNA-34a in other biopsy specimens, except for the tumor, - the salivary gland tissue adjacent to the tumor, the intact gland (control group), and blood.

The aim of the study. Clinical-genetic and inter-genetic (with expression of miRNA-34a) correlation analysis in tissue of pleomorphic adenomas of the large salivary glands, the tissue of the salivary gland which is adjacent to the tumor, intact tissue of the salivary gland, which was out of touch with the tumor, and venous blood.

Materials and methods. 22 patients with benign tumors of the large salivary glands (pleomorphic adenomas) were used for examination materials. The expression of miRNA-34a was evaluated using reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in real time. Total RNA was isolated from benign tumors (pleomorphic adenomas) of the large salivary glands (tumor tissue adjacent to the tumor salivary gland, intact salivary gland tissue that was not contiguous to the tumor) and venous blood by the method of phenol-chloroform extraction. Then we measured the concentration and purity of the RNA with a ND1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc, USA). The results were analyzed with the help of the statistical environment R (version 3.5). A. N. Kolmogorov - N. V. Smirnov, H. Leven, B. L. Welch's, B. M. Brown - A. B. Forsythe, S. E. Bonferroni tests and E. S. Pearson correlation criteria were used for further statistical analysis.

Results. Conducted correlation analysis of clinical (age, size of the tumor, duration of the disease, distance from the surface of the skin to the tumor) and genetic indices for the level of expression miRNA-34a in different biological tissues (tumor, tissue adjacent to the tumor salivary gland tissue, intact salivary gland that was out of touch with the tumor and venous blood) in patients with pleomorphic adenoma of the large salivary glands revealed absence of statistically significant association. The absence of a statistically significant relationship between clinical and genetic parameters (by expression of 34a-miRNA) in patients with pleomorphic adenomas of the large salivary glands indicates that neither age nor duration of the disease nor tumor size nor distance from the surface of the skin affect the miRNA molecules in various fragments of biological tissues (tumor tissue adjacent to the tumor salivary gland, intact salivary gland tissue that was not contiguous to the tumor, and venous blood). Therefore, it can be stated beforehand that the expression of miRNA-34a is genetically deterministic and the enhancement of its expression is a display of the protective mechanisms of the human body in response to the emergence of the tumor process.

Conclusions. The conducted clinical-genetic correlation analysis by the parameter of miR-34a expression of different fragments of biological tissues in patients with pleomorphic adenomas of the large salivary glands revealed the absence of statistically significant associations. The conducted intergenetic correlation analysis of patients with pleomorphic adenomas of the large salivary glands with different fragments of biopsy material revealed that the miR-34a expression statistically significantly differs between the groups (adjacent gland - intact salivary gland tissue).

Keywords: pleomorphic adenomas, genetic studies, miRNAs-34a, apoptosis, clinical-genetic and inter-genetic correlation.