

УДК 618.14-006.36-08(075.8)

DOI 10.54229/2226-2008-2023-2-4

І. З. Гладчук, Н. М. Рожковська, О. С. Салех

ЗВ'ЯЗОК ЕКСПРЕСІЇ МІКРОРНК-29В ТА -146А З КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ХВОРИХ НА МІОМУ МАТКИ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 618.14-006.36-08(075.8)

І. З. Гладчук, Н. М. Рожковська, О. С. Салех

ЗВ'ЯЗОК ЕКСПРЕСІЇ МІКРОРНК-29В ТА -146А З КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ХВОРИХ НА МІОМУ МАТКИ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

З метою дослідження зв'язку експресії мікроРНК-29b та -146a з клініко-патологічними характеристиками хворих на міому матки було обстежено 28 пацієнок з міомою матки, у яких проводили визначення експресії мікроРНК у пухлинній тканині за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі.

Аналіз рівнів експресії мікроРНК-29b та -146a в пухлинній тканині хворих з фіброміомою матки встановив значну їх варіабельність. Середній рівень експресії мікроРНК-29b склав $4,6 \pm 0,5$ у.о., мікроРНК-146a – $52,0 \pm 4,8$ у.о. Встановлено пряму кореляцію індексу маси тіла (ІМТ) та експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a ($p < 0,05$), а також експресії мікроРНК-29b та показників доплерометрії судин матки ($p < 0,05$). Проте в тканині міоматозного вузла виявлено зворотню кореляцію експресії мікроРНК-146a з індексом резистентності ($p < 0,05$) та пульсаційним індексом вузла ($p < 0,05$).

Ключові слова: фіброміома матки, епігенетика, біомаркери прогнозу, мікроРНК, діагностика.

UDC 618.14-006.36-08(075.8)

I. Z. Gladchuk, N. M. Rozhkovska, O. S. Saleh

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF MICRORNA-29B AND -146A WITH CLINICAL AND PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH UTERINE FIBROIDS

Odesa National Medical University, Odesa, Ukraine

In order to investigate the relationship between the expression of miRNA-29b and -146a and the clinical and pathological characteristics of patients with uterine myoma, 28 patients with uterine myoma were examined, in whom the expression of miRNA in tumor tissue was determined using polymerase chain reaction (PCR) in real time.

Analysis of miRNA-29b and -146a expression levels in the tumor tissue of patients with uterine fibroids, establishing their significant variability. The average expression level of microRNA-29b was 4.6 ± 0.5 units, miRNA-146a – 52.0 ± 4.8 units. A direct correlation between body mass index (BMI) and miRNA-29b and miRNA-146a expression was established ($p < 0.05$), as well as miRNA-29b expression and uterine vessel dopplerometry indicators ($p < 0.05$). However, an inverse correlation of miRNA-146a expression with the resistance index ($p < 0.05$) and the pulsatility index of the node ($p < 0.05$) was found in the myomatous node tissue.

Key words: uterine fibroids, epigenetics, biomarkers of prognosis, miRNA, diagnostics.

Вступ. Міома матки (ММ) є доброякісним моноклональним новоутворенням міометрія та найбільш поширеною пухлиною жіночої репродуктивної системи [1; 2]. ММ у віці до 45 років зустрічаються у більш ніж 75% жінок та є основним чинником гінекологічної та репродуктивної дисфункції, починаючи від профузних маткових кровотеч і тазового болю до безпліддя, втрати плода та передчасних пологів, а також є одним з основних показань до гістеректомії проте клінічні прояви виникають лише у 25% жінок цього віку [3].

Механізми, що лежать в основі патогенезу (ММ), значною мірою є невідомими. Наразі найбільш поширеною є гіпотеза щодо генетичної трансформації однієї стовбурової клітини міометрія в клітину, що ініціює ріст моноклональної пухлини та обумовлює збільшення клі-

тинної проліферації, інтенсивну продукцію компонентів екстрацелюлярного матриксу під впливом ендокринних, аутокринних, паракринних факторів росту, а також цитокінів [1; 2; 4]. Важливе місце у патогенезі ММ займають мікроРНК – малі некодуючі одноланцюгові РНК довжиною до 22 пари основ [5–7], які контролюють низку важливих біологічних процесів, у тому числі пухлиногенез. Декілька геномних досліджень показали, що мікроРНК відіграють вирішальну роль у клітинних процесах апоптозу та проліферації, епігенетичному контролі експресії генів, що призводить до розвитку міоми матки [5].

Метою дослідження була оцінка зв'язку експресії мікроРНК-29b та -146a з клініко-патологічними характеристиками хворих на міому матки.

Матеріал та методи. Дослідження проведено на базі клінічних підрозділів кафедри акушерства та гінекології у 2018–2021 рр. Обстежено 28 пацієнок з фіброміомою

матки віком від 29 до 32 років. Обсяг досліджень визначався відповідно до чинних клінічних протоколів та рекомендацій АСОГ [8]. Пацієнткам проведено комплексне загальноклінічне, клініко-лабораторне та клініко-інструментальне обстеження з детальним вивченням скарг, акушерсько-гінекологічного та соматичного анамнезу. Також проведено УЗД органів малого тазу у конвексному та дуплексному режимі як трансабдомінально, так й трансвагінально.

Додатково у всіх жінок проведено визначення експресії мікроРНК у пухлинній тканині за допомогою ПЛР у реальному часі (real time PCR) [9]. Тотальну РНК виділяли за допомогою комерційного набору «RN-easy PFPE Kit» (QIAGEN, Німеччина) за протоколом виробника. Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі «NanoDrop 2000c Spectrophotometer» (ThermoScientific, США). Чистоту виділеної РНК контролювали, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання при довжині хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у трис-ЕДТА буфері та до проведення ПЛР зберігали при температурі -20°C.

Одноланцюгову ДНК синтезували з 100 нг загальної РНК з використанням стандартного методу для зворотньої транскрипції; для проведення ПЛР зі зворотньою транскриптазою (ЗТ-ПЛР) використовували готовий набір «Реверта-Л» («Амплісенс») згідно з інструкцією виробника, із застосуванням специфічних до досліджуваних мікроРНК праймерів.

Послідовності праймерів для ЗТ-ПЛР та ПЛР в реальному часі були визначені за допомогою інструмента Genomics (Угорщина) [10] та синтезовані компанією Metabion (Німеччина). Згідно з послідовностями stem-loop праймера для ПЛР в реальному часі було використано стандартний reverse primer 5'-GTG-CAGGGTCCGAGGT-3' для мікроРНК-29b та -146a, а також forward праймери, після закінчення ЗТ-ПЛР до продукту реакції додавали суміш реагентів.

В подальшому проводили ПЛР у реальному часі за заданими умовами (таблиця 1).

В якості ендogenous контролю для об'єктивізації показників експресії використовували мікроРНК RNU48, оскільки для неї показана мінімальна дисперсія в періоди порогового циклу (Ct) порівняно з іншими ендogenous контролюями. Ця мікроРНК є однією з валідованих house-keeping малих РНК для досліджень на пухлинному матеріалі людини як in vitro так й ex vivo [11].

Молекулярно-генетичні дослідження виконані на базі ТОВ «Онкогераностика» (Київ, Україна).

Ультразвукове дослідження з доплерометрією виконувалось на апараті Toshiba Aplio 500 (Японія). Використовували класифікацію міом матки за FIGO (2018 р).

Статистична обробка проведена з використанням програмного забезпечення JASP 0.14.1 (Нідерланди).

Результати дослідження. Середній вік обстежених пацієнток склав 39,3±1,0 років. Найбільш частими скаргами були: аномальні маткові кровотечі (АМК) (22 або 78,6%), альгодисменорея 7 (25,0%). Тазовий біль відзначався у 4 (14,3%), дизуричні явища – у 5 (17,9%) жінок. На диспауренію мали скарги 3 (10,7%) хворих.

Обтяжений спадковий анамнез був у 14 (50,0%) пацієнток. Раннє менархе відзначали 8 (28,6%) хворих, пізнє – 3 (10,7%).

Первинне безпліддя констатоване у 4 (14,3%) хворих, вторинне – у 9 (32,1%). Скарги загального характеру (підвищена втомлюваність, загальна слабкість, часті головні болі) відзначали 8 (28,6%) пацієнток з АМК.

Більшість жінок мали нормотрофний аліментарний статус (19 або 67,9%). У 5 (17,9%) була надлишкова вага тіла (ІМТ більше 25,0 кг/м²), з них 2 (7,1%) мали ознаки ожиріння (ІМТ більше 30,0 кг/м²). У решти 4 (14,3%) хворих відзначався гіпотрофний аліментарний статус (ІМТ менше 18,0 кг/м²).

При ультразвуковому дослідженні встановлено, що у 39,3% хворих було більше двох міоматозних вузлів (середня кількість вузлів складала 2,7±0,4). Локалізація вузлів варіювала, найбільш часто зустрічалася інтрамурально-субсерозна (39,3%) та множинна гібридна локалізація (клас XX за FIGO) – 17,9%. У половині випадків розміри міоми були більше 7x5 см.

Середня швидкість кровотоку по маткових артеріях була 39,1±1,3 см/с при індексі резистентності 0,7±0,02 та пульсаційному індексі 1,4±0,08. Натомість середня швидкість кровотоку у судинах найбільшого вузла не перевищувала 15,2±1,2 см/с при індексі резистентності 0,7±0,03 та пульсаційному індексі 1,2±0,09.

Дослідження рівнів експресії мікроРНК-29b та -146a в пухлинній тканині хворих з фіброміомою матки встановив значну варіабельність їх показників. Згідно даних, представлених на рисунку 1, середній рівень експресії мікроРНК-29b склав 4,59±2,82 у.о. при амплітуді значень від 0,536 до 13,477 у.о. Натомість показник експресії мікроРНК-146a був 52,03±25,51 у.о. з індивідуальними коливаннями від 3,654 до 97,967 у.о., тобто дисперсія показника була на порядок більшою.

В таблиці 2 представлені результати доплерометрії судин матки та показники експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a у пацієнток з міомою матки. Аналізуючи дані, представлені в таблиці, 2 було встановлено: пряму кореляцію експресії мікроРНК-29b та індексу резистентності судин матки (r =+ 0,53); пряму кореляцію експресії мікроРНК-29b та пульсаційного індексу судин матки (r =+ 0,43); пряму кореляцію експресії

Таблиця 1

Умови проведення ПЛР (кількість зразка – 20 мкл)

Параметри	Активация білка Ampil Taq Gold	ПЛР, 40 циклів	
	HOLD	Денатурація	Подовження ланцюга
час	10 хвилин	15 с	60с
температура, °С	95	95	60

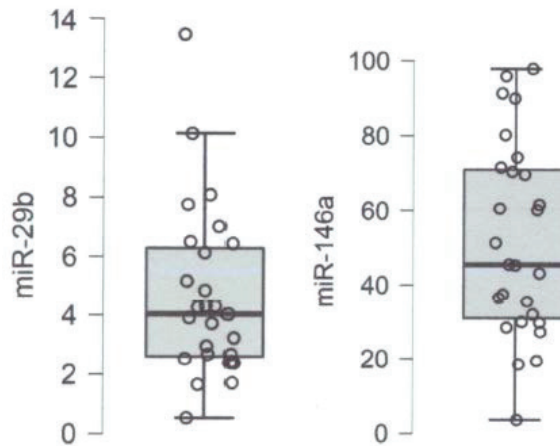


Рисунок 1. Показники експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a у тканині фіброміоми

мікроРНК-29b та середньої швидкості артеріального кровотоку в маткових артеріях ($r = +0,53$).

Для показників мікроРНК-146a не виявлено достовірного кореляційного зв'язку з характеристиками кровотоку матки.

Також було проведено вивчення стану кровоплину у міоматозному вузлі та рівень експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a в пухлинній тканині. Результати наведені в таблиці 3.

Таблиця 2

Показники експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a в пухлинній тканині в залежності від стану кровотоку в судинах матки

середня швидкість артеріального кровотоку в маткових артеріях	мікроРНК-29b		мікроРНК-146a	
	≤40 см/с	>40см/с	≤40см/с	>40 см/с
M	3,33	6,06	49,08	56,20
m	1,06	1,12	24,96	25,22
r	0,53*		0,39	
індекс резистентності судин матки	<0,73	>0,73	<0,73	>0,73
M	3,97	5,32	50,72	54,71
m	1,33	2,24	22,83	27,87
r	0,53*		0,31	
пульсаційний індекс судин матки	<1,29	>1,4	<1,29	>1,4
M	3,82	5,5	54,91	49,47
m	0,67	1,09	24,19	26,32
r	0,43*		0,11	

* $p < 0,05$

Таблиця 3

Показники експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a в пухлинній тканині в залежності від стану кровотоку в судинах найбільшого міоматозного вузла

середня швидкість артеріального кровотоку у вузлі	мікроРНК-29b		мікроРНК-146a	
	≤15см/с	>15см/с	≤15см/с	>15см/с
M	5,01	4,13	65,1	49,36
m	2,41	1,97	24,11	26,38
r	0,28		-0,48*	
індекс резистентності судин вузла	<0,63	≥0,63	<0,63	≥0,63
M	4,32	4,92	55,53	48,75
m	2,31	3,38	25,91	24,14
r	0,16		0,21	
пульсаційний індекс судин вузла	<1,07	>1,12	<1,07	>1,12
M	5,13	3,99	61,86	41,45
m	3,44	1,82	25,78	19,37
r	-0,31		-0,45*	

Примітка: відмінності між групами є статистично значущими * $p < 0,05$

Аналіз отриманих даних, представлених в таблиці 3, не виявив достовірного кореляційного зв'язку характеристик кровотоку судин найбільшого вузла з показниками експресії мікроРНК-29b. Доведена зворотна кореляція експресії мікроРНК-146a та середньої швидкості артеріального кровотоку в найбільшому вузлі ($r = -0,48$); зворотна кореляція експресії мікроРНК-146a та пульсового індексу в найбільшому вузлі ($r = -0,45$). Не виявлено достовірного кореляційного зв'язку експресії мікроРНК-146a та індексу резистентності судин найбільшого вузла.

Обговорення результатів дослідження. Деякі автори повідомляють про дерегуляцію експресії мікроРНК у хворих з ЛМ [12].

Численні гени-мішені мікроРНК, окрім злоякісного росту, також задіяні в основних регуляторних каскадах, пов'язаних з проліферацією та апоптозом клітин ендометрію. Крім того, мікроРНК беруть участь у регуляції відповіді клітин на жіночі статеві гормони, в тому числі ростові сигнали, проходження клітинного циклу, утворення екстрацелюлярного матриксу тощо. З врахуванням наведеного вплив порушень експресії мікроРНК на регуляцію процесів у міометрії та в міомі, на нашу думку, можна представити таким чином (рис. 2).

Продукти генів-мішеней мікроРНК беруть участь у регулюванні активності онкогенів/онкосупресорних

генів, різних клітинних процесів, включаючи запальну реакцію, апоптоз, ангиогенез, ріст клітин, диференціювання, процеси, що призводять до росту міоми матки та розростання міоматозного вузла.

Виявлена зворотня кореляція експресії мікроРНК, зокрема мікроРНК-146a та показників доплерометрії у міоматозному вузлі, узгоджується з даними літератури, які свідчать про зниження експресії мікроРНК в тканині міоми [13]. Це призводить до підвищення експресії білків позаклітинного матриксу та колагену, а отже, росту міоматозного вузла [14; 15]. Тому, на нашу думку, можна зробити висновок, що у разі виявлення зворотньої експресії мікроРНК-146a та показників доплерометрії судин міоматозного вузла можна прогнозувати прогресування міоми матки, а це дасть можливість розробити ефективну тактику ведення хворих.

Висновки. Виявлена зворотня кореляція експресії мікроРНК, зокрема мікроРНК-146a та показників доплерометрії у судинах міоматозного вузла ($r = -0,48$; $r = -0,45$), може бути використана для прогнозування росту міоми матки.

Проведене дослідження свідчить, що застосування динамічного аналізу профілю експресії мікроРНК як додаткового маркера у діагностиці та лікуванні фіброміоми матки є перспективним і потребує подальшого вивчення.

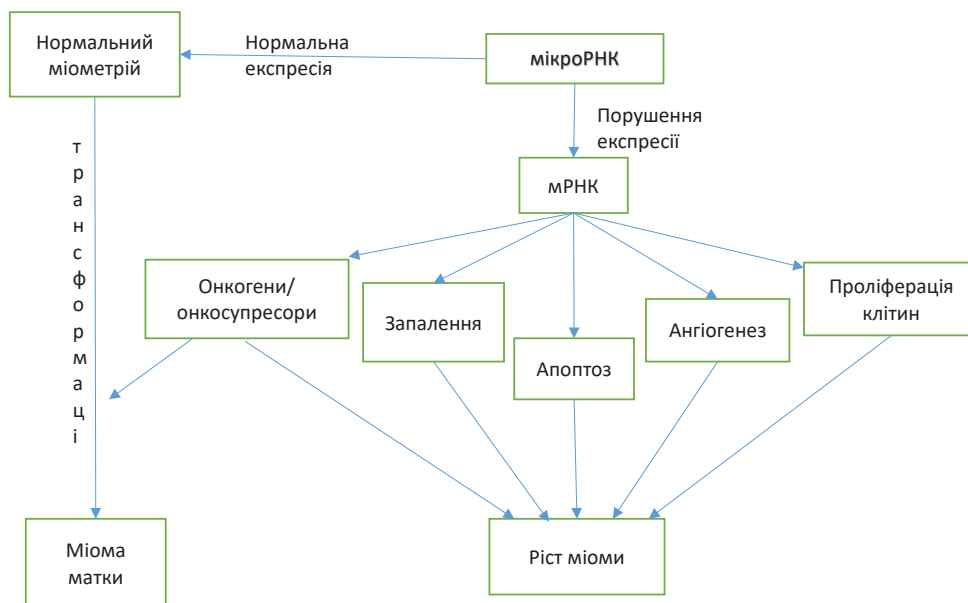


Рис. 2. Схематичне зображення впливу порушень експресії мікроРНК на регуляцію процесів у міометрії та в міомі

ЛІТЕРАТУРА

- Harris HR, Petrick JL, Rosenberg L. The epidemiology of uterine fibroids: Where do we go from here? *Fertil Steril.* 2022 Apr;117(4):841-842. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.01.037. Epub 2022 Mar 9. PMID: 35277259.
- Yang Q, Ciebiera M, Bariani MV, Ali M, Elkafas H, Boyer TG, Al-Hendy A. Comprehensive Review of Uterine Fibroids: Developmental Origin, Pathogenesis, and Treatment. *Endocr Rev.* 2022 Jul 13; 43(4):678-719. doi: 10.1210/endo/bnab039. Erratum in: *Endocr Rev.* 2022 Mar 02;; Erratum in: *Endocr Rev.* 2022 Mar 02;; PMID: 34741454; PMCID: PMC9277653.

3. Stewart EA, Nowak RA. Uterine Fibroids: Hiding in Plain Sight. *Physiology* (Bethesda). 2022 Jan 1; 37(1):16-27. doi: 10.1152/physiol.00013.2021. PMID: 34964688; PMCID: PMC8742728.
4. Baranov VS, Osinovskaya NS, Yarmolinskaya MI. Pathogenomics of Uterine Fibroids Development. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 6; 20(24):6151. doi: 10.3390/ijms20246151. PMID: 31817606; PMCID: PMC6940759.
5. Zota AR, Geller RJ, VanNoy BN, Marfori CQ, Tabbara S, Hu LY, Baccarelli AA, Moawad GN. Phthalate Exposures and MicroRNA Expression in Uterine Fibroids: The FORGE Study. *Epigenet Insights*. 2020 Feb 18;13:2516865720904057. doi: 10.1177/2516865720904057. PMID: 32128507; PMCID: PMC7031793.
6. Islam MS, Ciavattini A, Petraglia F, Castellucci M, Ciarmela P. Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: a potential target for future therapeutics. *Hum Reprod Update*. 2018 Jan 1;24(1):59-85. doi: 10.1093/humupd/dmx032. PMID: 29186429.
7. Ciebiera M, Włodarczyk M, Zgliczyński S, Łoziński T, Walczak K, Czekierdowski A. The Role of miRNA and Related Pathways in Pathophysiology of Uterine Fibroids-From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 24; 21(8):3016. doi: 10.3390/ijms21083016. PMID: 32344726; PMCID: PMC7216240.
8. ACOG guideline. Management of symptomatic uterine leiomyomas. Retrieved from: <https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/practice-bulletin/articles/2021/06/management-of-symptomatic-uterine-leiomyomas>.
9. LABOME MicroRNA Experimental Protocols. Retrieved from: <https://www.labome.com/method/MicroRNA-Experimental-Protocols.html#:~:text=Basic%20principle%3A%20microRNA%20RT%2DPCR,transcription%20of%20small%20RNA%20U6>.
10. Genomics.Hu Project. Retrieved from: <http://genomics.hu>.
11. Torres A, Torres K, Wdowiak P, Paszkowski T, Maciejewski R. Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecol Oncol*. 2013 Sep;130(3):588-94. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.06.026. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23811003.
12. Wang, T., Zhang, X., Obijuru, L., Laser, J., Aris, V., Lee, P., ... & Wei, J. J. (2007). A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 46(4), 336–347.
13. Chuang, T. D., & Khorram, O. (2019). Regulation of cell cycle regulatory proteins by microRNAs in uterine leiomyoma. *Reproductive Sciences*, 26(2), 250–258.
14. Xu, X., Kim, J. J., Li, Y., Xie, J., Shao, C., & Wei, J. J. (2018). Oxidative stress-induced miRNAs modulate AKT signaling and promote cellular senescence in uterine leiomyoma. *Journal of Molecular Medicine*, 96(10), 1095–1106.
15. Qiang, W., Liu, Z., Serna, V. A., Druschitz, S. A., Liu, Y., Espona-Fiedler, M., ... & Kurita, T. (2014). Down-regulation of miR-29b is essential for pathogenesis of uterine leiomyoma. *Endocrinology*, 155(3), 663–669.

Надійшла до редакції 15.05.2023 р.

Прийнята до друку 30.05.2023 р.

Електронна адреса для листування lazatimus@ukr.net