

ТЕРАНОСТИКА ЛЕЙОМІОМИ МАТКИ: СЬОГОДЕННЯ ТА МАЙБУТНЄ

ВСТУП

Міома матки (ММ) залишається актуальною проблемою сучасної гінекології та репродуктології, адже є найпоширенішим доброякісним пухлинним захворюванням жіночих статевих органів. За різними літературними даними, частота ММ у жінок репродуктивного віку становить від 20 до 50%, хоча відсоток справжньої захворюваності значно вищий, оскільки це захворювання може мати безсимптомний перебіг, а отже, існують не діагностовані випадки [1].

ММ – одне з головних показань до гістеректомії, зокрема й у репродуктивному віці (28%), що призводить не тільки до втрати дітородної та менструальної функції, а й до виражених вегетосудинних та психоемоційних порушень [1, 2]. Тому пошук ефективних алгоритмів прогнозування перебігу ММ для вибору персоналізованої лікувальної тактики на підставі епігенетичних механізмів регуляції та клініко-лабораторних характеристик є актуальним науковим завданням сучасної медицини й тераностики. Остання уособлює новітній підхід до діагностики та лікування пацієнтів, який ґрунтується на унікальності кожної людини, коли вибір оптимальної терапевтичної стратегії базується на використанні молекулярно-генетичних технологій, зокрема для визначення епігенетичних змін при гіперпроліферативних захворюваннях.

На сьогодні питання прогнозування перебігу ММ, а особливо персоналізованого прогнозу, є надзвичайно актуальним, адже ця нозологічна форма має негативний вплив як на стан здоров'я, так і на якість життя жінки. Проте можливості прогнозування перебігу ММ обмежені та потребують упровадження нових методик. Модель прогнозування перебігу ММ повинна включати різноманітні клінічні й параклінічні чинники, зокрема епігенетичні. Дослідження останніх років показали значний внесок порушень епігенетичної регуляції у виникнення та перебіг ММ [7]. З'являється дедалі більше доказів щодо ролі епігенетичних змін у перепрограмуванні ключових сигнальних шляхів, що асоційовані з розвитком ММ, і показано, що вивчення прогностичної та діагностичної ролі мікроРНК є одним із найперспективніших напрямів [8]. Найбільш досліджуваними в патогенезі ММ є родини мікроРНК-29 та мікроРНК-146 [1, 9, 10].

Слід зауважити, що персоналізована (прецизійна) медицина (ПМ) останніми роками з теоретичної концепції перетворилася на потужний інструмент удосконалення медичної допомоги [11]. В основі ПМ лежить модель, яка поділяє людей на різні групи, залежно від фенотипу та особливостей перебігу захворювань. Усі види лікування, дози та групи препаратів, інвазивні або неінвазивні втручання добирають для кожного окремого пацієнта на основі його прогнозованої відповіді або ризику захворювання [12, 14]. Іноді автори використовують поняття «4Р-медицина». Воно містить такі детермінанти: predictive, preventive, personalized, participative – передбачувальна, профілактична, персоналізована, залучена [11, 15]. Хоча індивідуалізація лікування залежно від особистості пацієнта бере свій початок принаймні з часів Гіппократа – «лікую хворого, а не хворобу» [11, 16], останніми роками ця концепція набула більшої популярності завдяки появі нових діагностичних та інформаційних підходів. У ПМ діагностичне тестування часто використовують для вибору відповідної та оптимальної терапії на основі генетичного профілю пацієнта або іншого молекулярного чи клітинного аналізу [17, 18].

Однією зі складових ПМ є тераностика – підхід до лікування хвороби з використанням подібних молекул як для візуалізації (діагностики), так і для терапії. Термін «тераностика» походить від поєднання слів «терапія» і «діагностика» [19–21]. Певною мірою тераностика – це ще й застосування молекулярно-генетичних технологій для діагностики та вибору оптимальної лікувальної стратегії. Зокрема, це стосується визначення епігенетичних змін при гіперпроліферативних захворюваннях [11, 22]. Використання генетичної інформації відіграло важливу роль у певних аспектах ПМ (наприклад, фармакогеноміка). Вперше цей термін був уведений у контексті генетики, хоча відтоді він розширився, щоб охопити всі види заходів персоналізації, включно з протеомікою [19], аналізом зображень, тераностикою на основі наночастинок [23].

Якщо сьогодні тераностика переважно використовують в онкології та радіаційній медицині, то в майбутньому цей принцип може бути застосований і для доброякісних новоутворень, як із позицій диференціювання онкопатології, так і для активного ведення пацієнтів групи ризику.

О.С. САЛЕХ
аспірант, кафедра акушерства
і гінекології, Одеський
національний медичний
університет, м. Одеса
ORCID: 0000-0001-7776-7355

Д.М. ЖЕЛЕЗОВ
д. мед. н., медичний директор
КНП «Пологовий будинок № 5»,
м. Одеса
ORCID: 0000-0002-0071-2644

І.З. ГЛАДЧУК
д. мед. н., професор, завідувач
кафедри акушерства і гінекології
Одеського національного
медичного університету, м. Одеса
ORCID: 0000-0003-2926-4125

А.Г. ВОЛЯНСЬКА
д. мед. н., професор, кафедра
акушерства та гінекології,
Одеський національний медичний
університет, м. Одеса
ORCID: 0000-0003-4572-3141

Контакти:
Гладчук Ігор Зіновійович
ОНМедУ, кафедра акушерства і
гінекології
65082, Одеса, пров. Валіховський, 2
Тел.: +38 (067) 654-70-00
Email: igor.gladchuk@gmail.com

Тераностика має справу зі спеціально розробленим планом лікування, що ґрунтується на унікальності кожної людини: правильний препарат для потрібного пацієнта в потрібний час. Це забезпечує перехід від традиційної медицини до персоналізованої. Генетика відіграє значну роль у тераностичі, так само як фармакогенетика, протеоміка та профілювання біомаркерів [19, 24, 25].

Майбутнє в діагностиці й лікуванні гінекологічної патології, зокрема ММ, належить саме тераностичі, яка являє собою цілісний перехід від медицини з методом проб і помилок до прогностичної, профілактичної та персоналізованої медицини, що сприяє покращенню якості життя пацієнтів.

Мета дослідження: розробка алгоритму прогнозування росту ММ з урахуванням стану епігенетичної регуляції; дослідження експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a в пухлинній тканині ММ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на базі клінічних підрозділів кафедри акушерства та гінекології у 2018–2021 рр. і включало 28 пацієток із фіброміомою матки.

Обсяг обстеження пацієток визначали відповідно до чинних клінічних протоколів та рекомендацій Американського коледжу акушерів-гінекологів (American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG) [3]. Проводили оцінювання змін розмірів найбільшого міоматозного вузла впродовж року в абсолютних і відносних величинах.

Додатково в усіх жінок визначали експресію мікроРНК у пухлинній тканині за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу [4]. 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 й до проведення ПЛР зберігали за температури -20 °С.

Одноланцюгову ДНК синтезували з 100 нг загальної РНК з використанням стандартного методу для зворотної транскрипції, для проведення ПЛР зі зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР) використовували готовий набір «Реверта-Л» («Амплісенс», Росія) згідно з інструкцією виробника, із застосуванням специфічних до досліджуваних мікроРНК праймерів hsa-mRNA-29b та hsa-mRNA-146a.

Послідовності праймерів для ЗТ-ПЛР і ПЛР у режимі реального часу були визначені за допомогою інструмента Genomics (Угорщина) [5] та синтезовані компанією Metabion (Німеччина). ЗТ-ПЛР проводили в ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Росія). Відповідно до послідовностей петльового праймера (stem-loop primer) для ПЛР у реальному часі було використано стандартний зворотний праймер (reverse primer) 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' для мікроРНК-29b та -146a, а також прямі праймери (forward primers). Після закінчення ЗТ-ПЛР до продукту реакції додавали суміш реагентів (табл. 1).

Таблиця 1. Склад реакційної суміші для ПЛР

Компонент реакційної суміші	Кількість на 20 мкл реакційної суміші
2x-універсальна суміш Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), ThermoScientific, США	10,00
Вода, очищена від нуклеаз	4,00
20x суміш forward та reverse праймерів для мікроРНК	1,00
кДНК	5,00
Всього	20,00

Як ендогенний контроль для об'єктивізації показників експресії використовували мікроРНК RNU48, оскільки для неї показана мінімальна дисперсія в періоди порогового циклу (Ct) порівняно з іншими ендогенними контролями. Ця мікроРНК є однією з валідованих house-keeping малих РНК для досліджень на пухлинному матеріалі людини як *in vitro*, так і *ex vivo* [4].

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

Для визначення впливу різних чинників на ріст ММ проводили лінійний регресійний аналіз. Індивідуальні кореляції перевіряли за допомогою двовимірної кореляції за Пірсоном або за Спірменом для змінних, які не розподілялися нормально й не були придатні до ранжування за інтервалом шкали співвідношень [6]. Лінійний і багатофакторний регресійний аналіз виконували з використанням абсолютної зміни розміру та відсоткової швидкості росту як залежних величин, з урахуванням віку пацієнтки, рівня естрадіолу та прогестерону, початкового розміру ММ, типу міоми та експресії мікроРНК як незалежної величини. Визначали прості двофакторні кореляції між віком на момент першої консультації та початковим розміром ММ, а також між наявністю симптомів, пов'язаних із міомою, і віком, початковим розміром ММ, швидкістю її росту й локалізацією. Відповідно досліджували вплив віку пацієнтки, початкового розміру та локалізації ММ на її ріст, а також перевіряли, чи може наявність симптомів асоціюватися з епігенетичними чинниками ризику.

Оцінювання даних проводили за допомогою статистичної програми Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Нульова гіпотеза приймалася для $p < 0,05$ [6].

Дослідження виконане з дотриманням сучасних біоетичних стандартів. Дослідження затверджене лікарсько-експертною комісією (протокол № 16 від 18.05.2020 р.). Всі пацієнтки, які прийняли участь у дослідженні, давали письмову інформовану згоду.

РЕЗУЛЬТАТИ

Середній вік пацієток становив $39,3 \pm 1,0$ року. У 39,3% хворих виявлено більш як два міоматозних вузли, середня кількість вузлів налічувала $2,7 \pm 0,4$ вузла. Їхня локалізація варіювала, найчастіше траплялася інтрамурально-субсерозна (39,3%) та множинна гібридна локалізація (клас XX за класифікацією Міжнародної федерації акушерів і гінекологів (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)) – 17,9%. У половині випадків розміри ММ перевищували 7×5 см.

Гормональний профіль обстежених жінок характеризувався помірною гіперестрогенією. Середній вміст естра-

діолу в I фазі менструального циклу (МЦ) становив $222,2 \pm 12,8$ пг/мл, а у II фазі МЦ – $188,6 \pm 11,4$ пг/мл. Середній вміст прогестерону в I фазі МЦ сягав $1,1 \pm 0,1$ нг/мл, у II фазі МЦ – $11,3 \pm 0,3$ нг/мл.

Ознаки зростання ММ впродовж катamnестичного періоду виявлені у 12 жінок (42,8%) із середнім інкрементом за найбільшим діаметром у $14,2 \pm 0,4\%$ з них. У 2 пацієнок (7,1%) відбулося зменшення розмірів пухлини на 6 та 12% відповідно. У решти учасниць або не було змін у розмірах вузла, або було виконане оперативне втручання різного ступеня радикальності (9 осіб). Подальші розрахунки проведені для 19 осіб, у яких був виконаний повний план спостереження.

Оскільки такі ключові процеси росту ММ, як-от клітинний процес, розростання екстрацелюлярного матриксу та апоптоз, перебувають під контролем генних продуктів, а отже, і мікроРНК, ми дослідили експресію мікроРНК. Ґрунтуючись на аналізі літератури та баз даних щодо ролі мікроРНК при рості ММ, для дослідження обрали мікроРНК-29b і мікроРНК-146a.

Аналіз рівнів експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a в пухлинній тканині фіброміоми матки виявив значну варіабельність їхніх показників. Характерною ознакою більшості досліджених зразків тканини були рівні експресії мікроРНК-29b в межах 2–7 умовних одиниць (у.о.) та мікроРНК-146a 30–67 у.о., які визначались у 71,42% ($p < 0,05$) і 75,0% ($p < 0,05$) жінок. Оскільки в межах вибірки було виявлено відносно рівномірний розподіл зразків за експресією досліджуваних мікроРНК, проведено аналіз суміжної експресії мікроРНК-29b та -146a. Проте в загальній вибірці не вдалося виділити когорти зі специфічною експресією зазначених мікроРНК, адже не існувало лінійної залежності між експресією мікроРНК-29b та -146a. Не було також виявлено істотних відмінностей показників мікроРНК-29b та мікроРНК-146a залежно від віку, кількості й розміру фіброматозного вузла. Однак простежувалася чітка кореляція рівнів обох досліджуваних мікроРНК з індексом маси тіла (ІМТ) хворих: для мікроРНК-29b $r = 0,42$ ($p < 0,05$), для мікроРНК-146a $r = 0,45$ ($p < 0,05$) (табл. 2).

У таблиці 3 наведено відносні значення експресії мікроРНК-29b та -146a залежно від кількості й розміру міоматозних вузлів.

Дослідження асоціації рівнів мікроРНК-29b та мікроРНК-146a із кількістю вузлів і розмірами найбільшого вузла не виявило достовірних відмінностей, проте аналіз суміжної експресії зазначених мікроРНК дозволив сформувати когорти хворих, для яких ці показники матимуть прогностичне значення (табл. 2). Так, у 90% зразків із показниками мікроРНК-29b 2–6 у.о. та мікроРНК-146a 30–75 у.о. було виявлено 3 і більше міоматозних вузлів, у 75% хворих із експресією мікроРНК-29b 2–6 у.о. та мікроРНК-146a 20–75 у.о. розмір найбільшого вузла перевищував 7×5 см.

Подальший аналіз показав, що найбільше значення для прогнозу росту має експресія мікроРНК-29b (метод Wald).

Загалом рівняння логістичної регресії має такий вигляд:
 $X(\Delta) = -0,39A + 0,52E_1(1) - 0,90E_2(2) - 0,30PG(1) + 0,35PG(2) - 0,27S - 0,44miRNA-29b - 0,24miRNA-146a$, де А – вік (роки), $E_1(1)$ – рівень естрадіолу в I фазі МЦ (пг/мл), $E_2(2)$ – рівень

Таблиця 2. Показники експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a в пухлинній тканині залежно від ІМТ і віку

Показники	мікроРНК-29b		мікроРНК-146a	
	≤ 40	> 40	≤ 40	> 40
Вік, роки	≤ 40	> 40	≤ 40	> 40
M	4,24	5,15	48,86	56,92
m	2,90	2,74	28,28	20,86
r	0,27		0,45	
ІМТ, кг/м ²	< 24	> 24	< 24	> 24
M	3,91	5,59	44,89	62,22
m	1,01	1,21	23,06	25,43
r	0,42*		0,45*	

* $p < 0,05$.

Таблиця 3. Відносні значення експресії мікроРНК-29b та мікроРНК-146a

Параметр	Показники експресії відносно внутрішнього контролю RNU48	
	мікроРНК-29b	< 4 / > 5
1–2 міоматозних вузли	мікроРНК-29b	< 4 / > 5
	мікроРНК-146a	< 40 / > 50
> 2 міоматозних вузли	мікроРНК-29b	2–6
	мікроРНК-146a	30–75
Розмір найбільшого вузла < 6×6 см	мікроРНК-29b	< 4 / > 6
	мікроРНК-146a	< 40 / > 60
Розмір найбільшого вузла > 7×5 см	мікроРНК-29b	2–6
	мікроРНК-146a	20–75

естрадіолу у II фазі МЦ (пг/мл), PG(1) – рівень прогестерону в I фазі МЦ (нг/мл), PG(2) – рівень прогестерону у II фазі МЦ (нг/мл), S – діаметр найбільшого вузла, miRNA-29b – експресія мікроРНК-29b, miRNA-146a – експресія мікроРНК-146a (табл. 4).

Можна припустити, що виявленими основними каталізаторами росту міоматозного вузла є опосередкований вплив мікроРНК на синтез колагену у тканинах матки, а також їхній вплив на продукцію статевих гормонів та їхню рецепцію тканиною міометрію.

ВИСНОВКИ

1. Результати проведеного дослідження свідчать, що застосування динамічного аналізу профілю експресії мікроРНК як додаткового маркера в діагностиці та лікуванні ММ є перспективним і потребує більш детального дослідження з позицій тераностики. Подальше вивчення кореляції клінічних та параклінічних параметрів може дати змогу прогнозувати перебіг ММ, а отже, застосовувати ефективний персоналізований план лікування.

2. Тераностика – новий підхід до діагностики та лікування пацієнта, що ґрунтується на унікальності кожної людини, з метою вибору оптимальної лікувальної стратегії на тлі використання молекулярно-генетичних технологій, зокрема для визначення епігенетичних змін при гіперпроліферативних захворюваннях. Дослідження експресії мікроРНК надалі може знайти своє місце в тераностіці ММ.

Конфлікт інтересів

Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Таблиця 4. Внесок різних чинників ризику у прогностичній моделі

Показники	b* вільний член	Часткова кореляція	Напівчасткова кореляція	Толерантність	R ²	T (10)	p
Вік	-0,385386	-0,515495	-0,298627	0,600435	0,399565	-1,90238	0,086283
E ₁ (1)	0,523476	0,669599	0,447527	0,730879	0,269121	2,85094	0,017222
E ₂ (2)	-0,896065	-0,789961	-0,639535	0,509389	0,490611	-4,07411	0,002235
PG(1)	-0,303440	-0,477695	-0,269915	0,791242	0,208758	-1,71948	0,116271
PG(2)	0,348822	0,494001	0,282039	0,653748	0,346252	1,79671	0,102601
Розмір	-0,268280	-0,427847	-0,234976	0,767132	0,232868	-1,49690	0,165300
miRNA-29b	-0,435790	-0,599865	-0,372168	0,729330	0,270670	-2,37087	0,039219
miRNA-146a	-0,237977	-0,362780	-0,193249	0,659425	0,340575	-1,23108	0,246461

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

- Yang, Q., Ciebiera, M., Bariani, M.V., et al. "Comprehensive Review of Uterine Fibroids: Developmental Origin, Pathogenesis, and Treatment." *Endocr Rev* 43.4 (2022): 678–19. DOI: 10.1210/endo/bnab039. PMID: 34741454; PMCID: PMC9277653.
- Stewart, E.A., Nowak, R.A. "Uterine Fibroids: Hiding in Plain Sight." *Physiology (Bethesda)* 37.1 (2022): 16–27. DOI: 10.1152/physiol.00013.2021. PMID: 34964688; PMCID: PMC8742728.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG guideline. Management of symptomatic uterine leiomyomas. Available from: [https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/practice-bulletin/articles/2021/06/management-of-symptomatic-uterine-leiomyomas].
- LABOME. MicroRNA Experimental Protocols. Available from: [https://www.labome.com/method/MicroRNA-Experimental-Protocols.html#:~:text=Basic%20principle%3A%20microRNA%20RT%20PCR,transcription%20of%20small%20RNA%20U6].
- Jeelani, S., Reddy, R.C., Maheswaran, T., et al. "Theranostics: A treasured tailor for tomorrow." *J Pharm Bioallied Sci* 6.1 (2014): 56–8. DOI: 10.4103/0975-7406.137249. PMID: 25210387; PMCID: PMC4157283.
- Антомонов, М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М.Ю. Антомонов. — 2-е изд. — Киев: Мединформ, 2017. — 578 с. Antomonov, M.Y. Mathematical processing and analysis of biomedical data. 2nd ed. Kyiv: Mediinform (2017): 578 p.
- Chuang, T.D., Khorram, O. "Regulation of cell cycle regulatory proteins by microRNAs in uterine leiomyoma." *Reproductive Sciences* 26.2 (2019): 250–8.
- Ciarmela, P., Petraglia, F. "New epigenetic mechanism involved in leiomyoma formation." *Fertil Steril* 115.1 (2021): 94–5.
- Marsh, E.E., Steinberg, M.L., Parker, J.B., et al. "Decreased expression of microRNA-29 family in leiomyoma contributes to increased major fibrillar collagen production." *Fertil Steril* 106.3 (2016): 766–72.
- Kolanska, K., Bendifallah, S., Canlorbe, G., et al. "Role of miRNAs in Normal Endometrium and in Endometrial Disorders: Comprehensive Review." *J Clin Med* 10.16 (2021): 3457. DOI: 10.3390/jcm10163457. PMID: 34441754; PMCID: PMC8396961.
- Чехун, В.Ф. От системной биологии рака до методологии персонализированного лечения / В.Ф. Чехун // Онкология. — 2012. — Т. 14, № 2. — С. 84–88. Chekhun, V.F. "From systemic biology of cancer to the methodology of personalized treatment." *Oncology* 14.2 (2012): 84–8.
- Goetz, L.H., Schork, N.J. "Personalized medicine: motivation, challenges, and progress." *Fertil Steril* 109.6 (2018): 952–63. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.006. PMID: 29935653; PMCID: PMC6366451.
- Di Sanzo, M., Cipolloni, L., Borro, M., et al. "Clinical Applications of Personalized Medicine: A New Paradigm and Challenge." *Curr Pharm Biotechnol* 18.3 (2017): 194–203. DOI: 10.2174/1389201018666170224105600. PMID: 28240172.
- National Academy of Engineering. Engineer Better Medicines. Available from: [http://www.engineeringchallenges.org/challenges/medicines.aspx].
- Vicente, A.M., Ballensiefen, W., Jönsson, J.I. "How personalised medicine will transform healthcare by 2030: the ICPeMed vision." *J Transl Med* 18.1 (2020): 180. DOI: 10.1186/s12967-020-02316-w
- Pulciani, S., Di Lonardo, A., Fagnani, C., Taruscio, D. "P4 Medicine versus Hippocrates." *Ann Ist Super Sanita* 53.3 (2017): 185–91. DOI: 10.4415/ANN_17_03_02. PMID: 28956796.
- Zannotti, A., Greco, S., Pellegrino, P., et al. "Macrophages and Immune Responses in Uterine Fibroids." *Cells* 10.5 (2021): 982. DOI: 10.3390/cells10050982. PMID: 33922329; PMCID: PMC8146588.
- Huang, D., Xue, H., Shao, W., et al. "Inhibiting effect of miR-29 on proliferation and migration of uterine leiomyoma via the STAT3 signaling pathway." *Aging (Albany NY)* 14.3 (2022): 1307–20. DOI: 10.18632/aging.203873. PMID: 35113040; PMCID: PMC8876902.
- Dobson, P. Theranostics: A combination of diagnosis and therapy. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-theranostics-nanoparticles-peter-dobson-oxford-university_en.pdf].
- Sanli, Y., Garg, I., Kandathil, A., et al. "Neuroendocrine Tumor Diagnosis and Management: 68Ga-DOTATATE PET/CT." *AJR Am J Roentgenol* 211.2 (2018): 267–77. DOI: 10.2214/AJR.18.19881. PMID: 29975116.
- Herrmann, K., Schwaiger, M., Lewis, J.S., et al. "Radiotheranostics: a roadmap for future development." *Lancet Oncol* 21.3 (2020): e146-e156. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30821-6. PMID: 32135118; PMCID: PMC7367151.
- Navarro, A., Bariani, M.V., Yang, Q., Al-Hendy, A. "Understanding the Impact of Uterine Fibroids on Human Endometrium Function." *Front Cell Dev Biol* 9 (2021): 633180. DOI: 10.3389/fcell.2021.633180. PMID: 34113609; PMCID: PMC8186666.
- Garello, F., Svenskaya, Y., Parakhonskiy, B., Filippi, M. "Micro/Nanosystems for Magnetic Targeted Delivery of Bioagents." *Pharmaceutics* 14.6 (2022): 1132. DOI: 10.3390/pharmaceutics14061132. PMID: 35745705; PMCID: PMC9230665.
- Baranov, V.S., Osinovskaya, N.S., Yarmolinskaya, M.I. "Pathogenomics of Uterine Fibroids Development." *Int J Mol Sci* 20.24 (2019): 6151. DOI: 10.3390/ijms20246151. PMID: 31817606; PMCID: PMC6940759.
- Dumitrescu, R.G. "Early Epigenetic Markers for Precision Medicine." *Methods Mol Biol* 1856 (2018): 3–17. DOI: 10.1007/978-1-4939-8751-1_1. PMID: 30178243.

Lactofem®

ДЛЯ ІНТИМНОГО ЗДОРОВ'Я

Зволожуючий крем

БЕЗ ГОРМОНІВ

ДЛЯ ДОГЛЯДУ
ТА УСУНЕННЯ
СУХОСТІ ПІХВИ

3-х компонентна основа:
РОСЛИННИЙ СПЕРМАЦЕТ
(АНАЛОГ КИТОВОГО ЖИРУ)
+ ВИСОКИЙ ВМІСТ ВОДИ + МОЛОЧНА КИСЛОТА



Супозиторії

ДЛЯ ПІДТРИМКИ
ТА ВІДНОВЛЕННЯ
ПРИРОДНОГО РІВНЯ pH

2-х компонентна основа:
МОЛОЧНА КИСЛОТА
+ натрію лактат



mib

Company of the Dermapharm Group

Згідно сертифікату відповідності № PR-823-19 на медичний виріб Lactofem зволожуючий крем та Lactofem супозиторії вагінальні з молочною кислотою. Дата останнього перегляду інструкції для застосування – квітень 2021.
Виробник: Антон Жобнер GmbH & Co.KG, Шлосс-трассе, 11-17, 79238 Еренкірхен, Німеччина.
Уповноважений представник в Україні: ТОВ «Мібе Україна»: 01021, м. Київ, Кловський узвіз, 13.
Тел./факс: (044) 254-39-36

Перед застосуванням ознайомтесь з повним текстом інструкції. Інформація надається для медичних та фармацевтичних працівників виключно з метою ознайомлення.
Для розміщення у спеціалізованих виданнях, призначених для медичних установ, лікарів та фармацевтичних працівників, а також для розповсюдження на семінарах, конференціях, симпозиумах з медичної тематики.

THE THERANOSTICS OF UTERINE LEIOMYOMA: PRESENT AND FUTURE

O.S. SALEKH

postgraduate student, Department of Obstetrics and Gynecology, Odesa National Medical University, Odesa
ORCID: 0000-0001-7776-7355

D.M. ZHELEZOV

MD, medical director of the City Maternity Hospital No. 5, Odesa
ORCID: HYPERLINK «<https://orcid.org/0000-0002-0071-2644>»
0000-0002-0071-2644

I.Z. HLADCHUK

MD, professor, head of the Obstetrics and Gynecology Department, Odesa National Medical University, Odesa
ORCID: 0000-0003-2926-4125

A.G. VOLYANSKA

MD, professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Odesa National Medical University, Odesa
ORCID: 0000-0003-4572-3141

Contacts:

Ihor Z. Hladchuk
Odesa National Medical University,
Obstetrics and Gynecology
Department
Valihovsky Lane 2, 65082,
Odesa, Ukraine
Tel.: +38 (067) 654-70-00
Email: igor.gladchuk@gmail.com

INTRODUCTION

Uterine myoma (UM) remains an actual problem of modern gynecology and reproductive medicine, as it is the most common benign tumor disease of the female genital organs. According to various literature data, the frequency of UM in women of reproductive age ranges from 20 to 50%, although the percentage of true morbidity is much higher, since this nosological form can have an asymptomatic course, and therefore, undiagnosed cases [1]. UM remains one of the main indications for hysterectomy, including in reproductive age (28%), which leads not only to the loss of reproductive and menstrual function, but also to pronounced vegetative-vascular and psychoemotional disorders [1, 2]. Therefore, the search for effective algorithms for predicting the course of UM for the selection of personalized treatment tactics based on epigenetic mechanisms of regulation and clinical and laboratory characteristics is an urgent scientific task in modern medicine and theranostics.

Today, the issue of predicting the course of uterine fibroids, and especially personalized prognosis, is extremely relevant, because this nosological form has a negative impact on both the state of health and the quality of life of a woman. However, the possibilities of predicting the course of UM are limited and require the introduction of new methods. The model for predicting the course of UM should include a variety of factors, both clinical and paraclinical, including epigenetic ones. Research in recent years has shown a significant contribution of epigenetic regulation disorders to the occurrence and course of UM [7]. There is more and more evidence about the role of epigenetic changes in reprogramming key signaling pathways associated with the development of LM, and it is shown that the study of the prognostic and diagnostic role of miRNA is one of the most promising directions [8]. In our work, we investigated the expression of miRNA-29b and miRNA-146a in tumor tissue, because the families of miRNA-29 and miRNA-146 are the most studied in the pathogenesis of UM [1, 9, 10].

In recent years, personalized (precision) medicine (PM) has turned from a theoretical concept into a powerful tool for improving medical care [11]. The basis of PM is a model that divides people into different groups, depending on the phenotype and features of the course of diseases.

All types of treatment, doses and groups of drugs, invasive or non-invasive interventions are selected for each individual patient based on his predicted response or disease risk [12, 14]. Sometimes the authors use the definition "4P-medicine". This abbreviation contains the following determining definitions: predictive, preventive, personalized, participatory [11, 15]. Although the individualization of treatment depending on the patient's personality dates back at least to the time of Hippocrates – "I treat the patient and not the disease" [11, 16], in recent years this approach has gained more popularity due to the emergence of new diagnostic and informational approaches. In PM diagnostic testing is often used to select appropriate and optimal therapy based on the context of the patient's genetic makeup or other molecular or cellular analysis [17, 18].

One of the components of personalized medicine is theranostics, an approach to disease treatment using similar molecules for both imaging (diagnosis) and therapy. The term "theranostics" comes from the combination of the words "therapy" and "diagnosis" [19–21]. To a certain extent, theranostics is also the application of molecular genetic technologies for diagnosis and selection of the optimal treatment strategy. In particular, this concerns the determination of epigenetic changes in hyperproliferative diseases [11, 22]. The use of genetic information has played an important role in certain aspects of PM (e.g. pharmacogenomics). The term was first introduced in the context of genetics, although it has since expanded to encompass all types of personalization efforts, including the use of proteomics [19], image analysis, and nanoparticle-based theranostics [23].

If today theranostics is mainly used in oncology and radiation medicine, then in the future this principle can be applied to benign neoplasms, both from the point of view of differentiation of oncopathology and for the active management of patients at risk.

Theranostics deals with a tailor-made treatment plan based on the uniqueness of each individual, resulting in the right drug for the right patient at the right time. This enables the transition from traditional medicine to personalized medicine. Genetics plays a significant role in theranostics, as do pharmacogenetics, proteomics and biomarker profiling [19, 24, 25].

Research objectives: to develop an algorithm for predicting the growth of UM, taking into account the state of epigenetic regulation. In our research we investigated the expression of miRNA-29b and miRNA-146a in UM tumor tissue.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted on the basis of clinical divisions of the Department of Obstetrics and Gynecology in 2018–2021. 28 patients with uterine fibroids were examined. The scope of the examination was determined in accordance with current clinical protocols and the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) recommendations [3]. The changes in the size of the largest myomatous node during the year were evaluated in absolute and relative values.

In addition, miRNA expression in tumor tissue was determined in all women using real time PCR [4]. Total RNA was isolated using the commercial kit “RN-easy PFPE Kit” (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer’s protocol. The amount of isolated RNA was determined on a spectrophotometer “NanoDrop 2000c Spectrophotometer” (ThermoScientific, USA). The purity of the isolated RNA was monitored, using the ratio of optical absorption values at wavelengths of 260 and 280 nm. RNA was dissolved in Tris-EDTA buffer and stored at -20 °C until PCR.

Single-stranded DNA was synthesized from 100 ng of total RNA using a standard method for reverse transcription, for PCR with reverse transcriptase (RT-PCR) a ready-made kit “Reverta-L” (Amplisens, Russia) was used according to the manufacturer’s instructions, using microRNAs specific to the studied primers hsa-mRNA-29b and hsa-mRNA-146a.

Primer sequences for RT-PCR and real-time PCR were determined using the Genomics tool (Hungary) [5] and synthesized by Metabion (Germany). RT-PCR was performed in the Tertsik amplifier (DNA-technology, Russia). According to the stem-loop primer sequences, the standard reverse primer 5'-GTGCAGGGTC-CGAGGT-3' was used for real-time PCR for miRNA-29b and miRNA-146a, as well as forward primers, after the RT-PCR, a mixture of reagents was added to the reaction product: (table 1).

Component reaction mix	Amount on 20 µl reaction product
2X-universal mix Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), ThermoScientific, USA	10,00
purified water	4,00
20x mix of forward and reverse primers for miRNA	1,00
cDNA	5,00
Total	20,00

MicroRNA RNU48 was used as an endogenous control for the objectification of expression indicators, since it showed minimal dispersion in the periods of the threshold cycle (Ct) compared to other endogenous controls. This miRNA is one of the validated house-keeping small RNAs for research on human tumor material both *in vitro* and *ex vivo* [4].

Molecular and genetic studies were performed on the basis of LLC “Oncotheranostics” (Kyiv, Ukraine).

Linear regression analysis was performed to determine the influence of various factors on myoma growth. Individual correlations were tested using bivariate Pearson or Spearman correlations for variables that were not normally distributed and were not suitable for ranking on the ratio scale interval [6]. Linear and multivariate regression analyzes were performed using absolute size change and percent growth rate as dependent variables, with patient age, estradiol and progesterone levels, initial fibroid size, fibroid type, and miRNA expression as independent variables. Simple bivariate correlations were determined between age at first consultation and initial fibroid size, and between the presence of fibroid-related symptoms and age, initial fibroid size, fibroid growth rate, and fibroid location. Accordingly, the effects of patient age, its initial size and location on fibroid growth were investigated, and whether the presence of symptoms could be associated with the presence of epigenetic risk factors.

Data were evaluated using the Statistica 10.0 statistical software (StatSoft Inc., USA). The null hypothesis was accepted for $p < 0.05$ [6].

The research was conducted in accordance with modern bioethical standards. The research protocol was approved by the local ethics committee (protocol No. 16 dated May 18, 2020). All patients who participated in the study provided written informed consent.

RESULTS

The average age of the examined patients was 39.3 ± 1.0 years. 39.3% of patients had more than two myomatous nodes, the average number of nodes was 2.7 ± 0.4 . The localization of the nodes varied, the most common was intramural-subserous (39.3%) and multiple hybrid localization (class XX according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification) – 17.9%. In half of the cases, the size of myoma was more than 7×5 cm.

The hormonal profile of the examined women was characterized by moderate hyperestrogeny. The average content of estradiol in the I phase of the menstrual cycle was 222.2 ± 12.8 pg/ml, and in the II phase – 188.6 ± 11.4 pg/ml. The average progesterone content in phase I was 1.1 ± 0.1 ng/ml, in phase II – 11.3 ± 0.3 ng/ml.

Signs of myoma growth during the catamnesis period were determined in 12 women (42.8%) with an average increment in the largest diameter of $14.2 \pm 0.4\%$. In 2 patients (7.1%), the tumor size decreased by 6 and 12%, respectively. The rest of the women either had no changes in the size of the nodule, or underwent surgical interventions of varying degrees of radicality (9 people). Further calculations were carried out for 19 persons in whom the observation plan was fully completed.

Since the cellular process, the growth of the extracellular matrix and apoptosis, the key processes of myoma growth, are under the control of gene products, and therefore miRNA, we conducted a study of miRNA expression. Based on the analysis of the literature and databases regarding the role of microRNAs in the growth of uterine fibroids, miRNA-29b and miRNA-146a were selected.

Analysis of the expression levels of miRNA-29b and miRNA-146a in the tumor tissue of patients with uterine fibroids

revealed significant variability of their indicators. It was found that the characteristic feature of the majority of the examined tissue samples were miRNA-29b expression levels in the range of 2–7 units and microRNA-146a 30–67 units, which were determined in 71.42% ($p < 0.05$) and 75.0% ($p < 0.05$) of cases. Since a relatively uniform distribution of the samples in terms of the expression of the investigated miRNAs was found within the studied sample, we conducted an analysis of the adjacent ex-

els of both studied microRNAs with the body mass index (BMI) of the patients was observed: for miRNA-29b $r = 0.42$ ($p < 0.05$), for miRNA-146a $r = 0.45$ ($p < 0.05$) (Table 2).

Table 3 shows the relative expression values of miRNA-29b and miRNA-146a, depending on the number and size of myomatous nodes.

The study of the association of the levels of miRNA-29b and miRNA-146a with the number of nodes and the size of the largest node did not reveal any significant differences, however, the analysis of the adjacent expression of these miRNAs made it possible to form cohorts of patients for whom these indicators will have prognostic value (Table 3). Thus, in 90% of samples with indicators of microRNA-29b 2–6 units and microRNA-146a 30–75 units 3 or more myomatous nodes were detected, in 75% of patients with miRNA-29b expression 2–6 units and microRNA-146a 20–75 units the size of the largest node exceeded 7×5 cm.

Further analysis showed that the expression of microRNA-29b has the greatest significance for growth prognosis (Wald statistic). In general, the logistic regression equation looks like this:

$$X(\Delta) = -0.39A + 0.52E_2(1) - 0.90E_2(2) - 0.30PG(1) + 0.35PG(2) - 0.27S - 0.44miRNA-29b - 0.24miRNA-146a,$$

where A is age (years), $E_2(1)$ is the level of estradiol in phase I of menstrual cycle (pg/ml), $E_2(2)$ is the level of estradiol in phase II of cycle (pg/ml), PG(1) is the level of progesterone in I phase of cycle (ng/ml), PG(2) – progesterone level in II phase of cycle (ng/ml), S – diameter of the largest node, miRNA-29b – miRNA-29b expression, miRNA-146a – miRNA-146a expression (Table 4).

It can be assumed that the identified main catalysts of myomatous node growth are the mediated effect of microRNAs on collagen synthesis in uterine tissues, as well as their effect on the production of sex hormones and their reception by myometrial tissue. The conducted study shows that the use of dynamic analysis of miRNA expression profile as an additional marker in the diagnosis and treatment of UM is promising and requires more detailed research from the perspective of theranostics.

CONCLUSIONS

1. The future in the diagnosis and treatment of gynecological pathology, in particular UM, belongs to theranostics, which represents a holistic transition from trial-and-error medicine to prognostic, preventive and personalized medicine that is leads to an improvement in the quality of life of patients. Further study of the correlation of clinical and paraclinical parameters

Table 2. Indicators of miRNA-29b and miRNA-146a expression in tumor tissue depending on BMI and age

	miRNA-29b		miRNA-146a	
	≤ 40	> 40	≤ 40	> 40
Age, years				
M	4.24	5.15	48.86	56.92
m	2.90	2.74	28.28	20.86
r	0.27		0.45	
BMI, kg/m ²				
M	3.91	5.59	44.89	62.22
m	1.01	1.21	23.06	25.43
r	0.42*		0.45*	

* $p < 0.05$.

Table 3. Relative expression values of miRNA-29b and miRNA-146a

Index	Indices of miRNA expression vs internal control RNU48	
1–2 fibroids	miRNA-29b	< 4 / > 5
	miRNA-146a	< 40 / > 50
> 2 fibroids	miRNA-29b	2–6
	miRNA-146a	30–75
Size of the largest fibroid < 6×6 cm	miRNA-29b	< 4 / > 6
	miRNA-146a	< 40 / > 60
Size of the largest fibroid > 7×5 cm	miRNA-29b	2–6
	miRNA-146a	20–75

pression of miRNA-29b and conditional miRNA-146a. However, in the total sample, we failed to identify cohorts with specific expression of these miRNAs, as there was no linear relationship between the expression of miRNA-29b and miRNA-146a. There were also no significant differences in miRNA-29b and miRNA-146a indicators depending on age, the number and size of the fibromatous node. However, a clear correlation of the lev-

Table 4. The contribution of various risk factors in the prognostic model

Indicators	b* in	Partial - Cor.	Semipart - Cor.	Tolerance	R-square	t(10)	p
Age	-0.385386	-0.515495	-0.298627	0.600435	0.399565	-1.90238	0.086283
$E_2(1)$	0.523476	0.669599	0.447527	0.730879	0.269121	2.85094	0.017222
$E_2(2)$	-0.896065	-0.789961	-0.639535	0.509389	0.490611	-4.07411	0.002235
PG(1)	-0.303440	-0.477695	-0.269915	0.791242	0.208758	-1.71948	0.116271
PG(2)	0.348822	0.494001	0.282039	0.653748	0.346252	1.79671	0.102601
Size	-0.268280	-0.427847	-0.234976	0.767132	0.232868	-1.49690	0.165300
miRNA-29b	-0.435790	-0.599865	-0.372168	0.729330	0.270670	-2.37087	0.039219
miRNA-146a	-0.237977	-0.362780	-0.193249	0.659425	0.340575	-1.23108	0.246461

can make it possible to predict the course of UM, and therefore to apply an effective personalized treatment plan.

2. Theranostics is a new approach to the diagnosis and treatment of the patient, based on the uniqueness of each person in order to choose the optimal treatment strategy against the background of the molecular genetic technologies, in particu-

lar to determine epigenetic changes in hyperproliferative diseases. The study of miRNA expression may find its place in the theranostics of uterine fibroids in the future.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

ТЕРАНОСТИКА ЛЕЙОМІОМИ МАТКИ: СЬОГОДЕННЯ ТА МАЙБУТНЄ

О.С. Салех, аспірант, кафедра акушерства і гінекології, Одеський національний медичний університет, м. Одеса

Д.М. Железов, д. мед. н., медичний директор КНП «Пологовий будинок № 5», м. Одеса

І.З. Гладчук, д. мед. н., професор, завідувач кафедри акушерства і гінекології Одеського національного медичного університету, м. Одеса

А.Г. Волянська, д.мед.н., професор, кафедра акушерства та гінекології, Одеський національний медичний університет, м. Одеса

Мета дослідження: розробка алгоритму прогнозування росту міоми матки з урахуванням стану епігенетичної регуляції.

Матеріали та методи. Дослідження проведене на базі клінічних підрозділів кафедри акушерства та гінекології у 2018–2021 рр. Обстежено 28 пацієнок із фіброміомою матки. У всіх жінок визначали експресію мікроРНК-29b та мікроРНК-146a у пухлинній тканині фіброміоми матки за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Дані оцінювали за допомогою статистичної програми Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США).

Результати. Середній вік обстежених пацієнок становив $39,3 \pm 1,0$ року. Середня кількість вузлів – $2,7 \pm 0,4$. У більшості досліджених зразків тканини найчастіше визначалися рівні експресії мікроРНК-29b в межах 2–7 умовних одиниць та мікроРНК-146a у межах 30–67 умовних одиниць. Найбільше значення для прогнозу росту має експресія мікроРНК-29b (метод Wald). Одержано рівняння логістичної регресії, відповідно до якого прогностичним чинниками є вік пацієнтки, рівень естрадіолу та прогестерону в I та II фазі менструального циклу, діаметр найбільшого вузла, експресія мікроРНК-29b і мікроРНК-146a.

Висновки. Результати проведеного дослідження свідчать, що застосування профілю експресії мікроРНК як додаткового маркера в діагностиці й лікуванні фіброміоми матки є перспективним і потребує більш детального дослідження. Подальше вивчення кореляції клінічних та параклінічних параметрів може дати змогу прогнозувати перебіг міоми матки, а отже, застосовувати ефективний персоналізований план лікування. Тераностика є новим підходом до діагностики та лікування пацієнтів, що ґрунтується на унікальності кожної людини, з метою вибору оптимальної лікувальної стратегії на тлі використання молекулярно-генетичних технологій, зокрема для визначення епігенетичних змін при гіперпроліферативних захворюваннях. Дослідження експресії мікроРНК надалі може знайти своє місце в тераностіці міоми матки.

Ключові слова: міома матки, епігенетика, тераностика, прогнозування.

TERANOSTICS OF UTERINE LEIOMYOMA: PRESENT AND FUTURE

O.S. Salekh, postgraduate student, Department of Obstetrics and Gynecology, Odesa National Medical University, Odesa

D.M. Zhelezov, MD, medical director of the City Maternity Hospital No. 5, Odesa

I.Z. Hladchuk, MD, professor, head of the Obstetrics and Gynecology Department, Odesa National Medical University, Odesa

A.G. Volyanska, MD, professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Odesa National Medical University, Odesa

Research objectives: to develop an algorithm for predicting the growth of uterine fibrosis, taking into account the state of epigenetic regulation.

Materials and methods. The study was conducted on the basis of clinical divisions of the Department of Obstetrics and Gynecology in 2018–2021. 28 patients with uterine fibroids were examined. Expression of miRNA-29b and miRNA-146a in tumor tissue was determined in all women using real-time PCR. Obtained data were analyzed using the statistical program Statistica 10.0 (StatSoft Inc., USA).

Results. The average age of the patients was 39.3 ± 1.0 years. The average number of nodes was 2.7 ± 0.4 . The expression levels of microRNA-29b were most frequently determined in the range of 2–7 units and microRNA-146a in the range of 30–67 units in most of the examined tissue samples. The expression of miRNA-29b has the greatest significance for the growth forecast (Wald statistic). According to the logistic regression equation the prognostic factors are patient's age, estradiol and progesterone level in the I and II phases of the menstrual cycle, diameter of the largest node, expression of miRNA-29b and miRNA-146a.

Conclusions. This study shows that the use of miRNA expression profile as an additional marker in the diagnosis and treatment of uterine fibroids is promising and requires more detailed research. Further study of the correlation of clinical and paraclinical parameters can make it possible to predict the course of uterine fibroids, and therefore to apply an effective personalized treatment plan. Theranostics is a new approach to the diagnosis and treatment of patients, based on the uniqueness of each person in order to choose the optimal treatment strategy against the background of the molecular genetic technologies, in particular to determine epigenetic changes in hyperproliferative diseases. The study of miRNA expression may find its place in the theranostics of uterine fibroids in the future.

Keywords: uterine myoma, epigenetics, theranostics, prognosis.