Рогоза Олександра Євгенівна, здобувачка вищої освіти медичного факультету
Дніпровський державний медичний університет, Україна

Науковий керівник: Абраімова Ольга Євгенівна, старший викладач, кандидат біологічних наук
Дніпровський державний медичний університет, Україна

ЕНДОМЕТРІОЗ ТА ЙОГО ДОСЛІДЖУВАННІ БІОМАРКЕРИ

Ендометріоз — гостре, естрогензалежне захворювання, що характеризується розростанням тканини, подібної до ендометрію, поза межами матки, що призводить до хронічного болю, безпліддя та зниження якості життя. Його патофізіологія включає генетичні, епігенетичні, імунні та молекулярні фактори [1]. Існує декілька видів ендометріозу: *ендометріоз яєчників* — виникає у вигляді поверхневих уражень та ендометріальних кіст; *перитонеальний* — може виникати у різних формах: білі нальоти на очеревині, дефекти очеревини, червоні, коричневі, чорно-сині та чорні вогнища, безбарвні яскраві везикули та вогнищеві розширені кровоносні судини та петехії; *глибокий інфільтративний ендометріоз*; *ендометріоз інших локалізацій* [2].

Однією з основних проблем в діагностиці та лікуванні ендометріозу, окрім того, що він проблематично визначається методами візуалізації (УЗД, МРТ тощо), а на ранніх стадіях лише «золотим стандартом» діагностики цього захворювання — лапароскопією, є відсутність біомаркерів, які б давали змогу точно визначити наявність патологічного процесу, але наразі вчені активно досліджують це питання, тому цей літературний огляд охопить основну інформацію про потенційний біомаркер, вивчення якого може в майбутньому полегшити діагностику й лікування, а саме — lcnRNA – довгі некодуючі РНК.

Можемо казати про те, що довгі некодуючі РНК – це тип РНК, який зазвичай за прийнятою класифікацією перевищує в розмірах більше ніж 200 нуклеотидів, які не транслюються в білок [3]. Некодувальні РНК (нкРНК) можна згрупувати за їхньою довжиною, локалізацією та/або функцією: довгі некодувальні РНК (днкРНК), мікроРНК (міРНК), малі інтерферуючі РНК (міРНК), малі ядерцеві РНК (мяРНК), малі ядерні РНК (мнРНК) та РНК, що взаємодіють з PIWI (піРНК). ДнкРНК мають довжину понад 200 нуклеотидів і можуть бути підрозділені відповідно до локусів їх біогенезу: міжгенні днкРНК (лінкРНК), інтронні днкРНК, антисенсові днкРНК (аслнкРНК або природні антисенсові транскрипти, NAT), двонаправлені днкРНК та енхансерні РНК (еРНК).

Біогенез довгої некодуючій РНК (нкРНК) здебільшого подібний до біогенезу матричної РНК (мРНК), оскільки цей процес також опосередковується РНК-полімеразою II. Крім того, довгі некодуючі РНК можуть з'являтися з поліаденілюванням або без нього, альтернативним розщепленням, альтернативним поліаденілюванням та альтернативним сплайсингом, що призводить до різних ізоформ з одного локусу.

Гени довгих нетранскрипційних РНК (lncRNA) мають спільні риси з промоторами кодуючих генів і можуть регулюватися деякими транскрипційними

факторами (TF), такими як p53, ядерний фактор-каппа B (NF-κB), Sox2 та Oct4. Деякі довгі нетранскрипційні РНК мають унікальні вимоги для їхньої належної експресії та функціональності, що може бути опосередковано cMyc TF та Dicer, ключовим ферментом, що бере участь у процесингу мікроРНК. Антисенсові довгі нетранскрипційні РНК походять з комплементарного ланцюга генів, що кодують білки; близько 30% анотованих генів людини мають антисенсовий компонент, який сильно впливає на експресію профілю генів [4].

Низка досліджень показала, що порушення метаболізму глюкози може бути причетною до патогенезу ендометріозу, а саме те, що висока експресія довгої некодуючої РНК H19 призводить до підвищеного рівня аеробного гліколізу та лактиляції гістонів при ендометріозі.

Для багатьох молекулярних досліджень постає питання виведення чистої культури специфічних клітин. Дослідження експресії днкРНК H19 проводиться на HESCs — іммортализовані стромальні клітини ендометрію, отримані з лейоміом матки у дорослих жінок. Умови культивування HESC були середовищем DMEM/F12, доповненим 10% фетальною бичачою сироваткою та 1% пеніциліну-стрептоміцину. Клітини підтримували при температурі 37°C, вологості 95% та 5% CO_2 у стерильному інкубаторі для тканинних культур. Клітини обробляли, коли щільність клітин досягала 75–85%. Транзиторний нокдаун H19 проводили шляхом трансфекції 10 нмоль/л siРНК, таргетної проти людського H19, або неспецифічної контрольної siРНК у HESC протягом 48 годин з використанням Lipofectamine 3000 згідно з інструкціями виробника. Для надмірної експресії H19 HESC трансфікували 3 мкг плазміди H19 або 3 мкг порожньої плазміди, що служила контролем протягом 48 годин з використанням Lipofectamine 3000. [5]

РНК отримували за допомогою реагенту TRIzo та зворотно транскрибували в кДНК. Кількісну ПЛР у реальному часі проводили за допомогою набору реагентів TaKaRa PrimeScript™ RT з gDNA Eraser.

Вимірювання споживання глюкози, вироблення лактату та вміст АТФ проводили через 24 години, користуючись, відповідно, наборами для аналізу глюкози, лактату й системою аналізу з подвійною люциферазою-репортером. HESC збирали та лізували на льоду з використанням буфера для радіоімунопреципітації (RIPA, Beyotime), змішаного з коктейлем інгібіторів протеази/фосфатази. Білки розділяли за допомогою 4–20% попередньо переробленого протеїнового гелю, на 15 лунок, а потім переносили на полівініліденфторидну мембрану. Після блокування за допомогою блокувального буфера для вестерн-блоттингу мембрану інкубували з первинним антитілом проти цільового білка на струшувачі при 4°C протягом ночі. Потім мембрани промивали та інкубували з відповідними вторинними антитілами протягом 1 години при 37°C. Білкові смуги виявляли за допомогою субстрату Clarity Western.[5]

Після ще декількох етапів підготовки тканинної й клітинної культур (імунофлуоресцентці фарбування, фарбування гематоксилін-еозином, аналізи проліферації клітин, трансвелл-аналізів), переходили до моделювання ендометріозу у піддослідних тварин, в цьому випадку — лабораторних мишей лінії BALB/c віком від шести до восьми тижнів. Тварини також пройшли етапи підготовки: перебування в умовах вільних від специфічних патогенів, розподіл на донорську та реципієнту групи, введення донорській групі естрадіолбензоату в певні дні після стимуляції

росту ендометрію, після чого донорським мишам, ще через декілька днів, видаляли матку й подрібнювали її, потім вводили реципієнтам внутрішньочеревно.

Для виявлення потенційних метаболічних змін в евтопічному ендометрії та тканині ектопічного ендометріозу було проведено аналіз експресії білків, пов'язаних з гліколізом, за допомогою імуногістохімії та вестерн-блоттингу. Імуногістохімічний аналіз нормального ендометрію (НК/UC) , евтопічного ендометрію (ЕЕ/UE) та ектопічної тканини (ЕНДО/ENDO) показав, що білки лактатдегідрогенази А, альдолази та піруваткінази М2 експресувалися як залозистими клітинами ендометрію, так і стромальними клітинами та переважно локалізувалися в цитоплазмі. Експресія білків LDHA, ALDOA та PKM2 була значно вищою в ектопічній тканині. Тим часом вестерн-блоттинг підтвердив, що експресія LDHA, ALDOA та PKM2 була підвищена на рівні білка в ектопічній тканині порівняно з нормальним ендометрієм. Ці спостереження узгоджуються з попередніми висновками про те, що рівні білків, що беруть участь в аеробному гліколізі, підвищені в ектопічній тканині, що утворюється при ендометріозі. [5]

Нещодавно було показано, що лактат, незамінний метаболіт, що утворюється в результаті гліколізу, регулює ріст раку шляхом лактат-опосередкованих епігенетичних модифікацій гістонів (лактилювання). Тому була проведена ще низка досліджень, а саме: лактилювання гістонів при ендометріозі, досліджуючи рівні лактилювання гістонів у тканинах UC, UE та ENDO. Кількісне визначення рівнів білків H3K9lac, H3K14lac, H3K18lac PAN лактильованого лізину (KLA) та загального гістону 3 (H3), нормалізованих до тубуліну, показало, що рівні лактилювання в UE не відрізнялися від рівнів в UC. Однак, ENDO мав вищі рівні лактилювання гістонів порівняно з UC. Порівняно з UC, рівень H3K18la був значно збагачений в ENDO порівняно з UC у порівнянні з іншими типами модифікацій, але не відрізнявся між UE та UC. Далі було проведено імунофлуоресцентне фарбування, яке виявило, що ектопічна тканина ендометрію мала вищий рівень загального лактильованого лізину та вищий рівень гістону H3K18lac. Спільне фарбування PAN KLA та H3 показало високу колокалізацію в ядрі ENDO порівняно з іншими групами, що узгоджується з вищими рівнями H3K18lac, що спостерігаються в ENDO порівняно з іншими. Ці результати показали, що підвищене лактилювання гістонів було присутнє у значній частині випадків ендометріозу, і що це може відігравати певну роль в етіології цього стану. [5]

Можемо казати про те, що при дослідженні надмірної експресії H19 і умов нокдауну H19, було виявлено різні показники глікотичної активності в HESC. Нокдаун H19 знижував рівні LDHA, PKM2, ALDOA. В той час як підвищена експресія провокувала більшу глікотичну активність, підвищуючи рівні відповідних сполук. Ці результати дають змогу зрозуміти, що експресія H19 регулює рівень аеробного гліколізу в досліджуваних тканинах. З чого можна зробити висновок, що висока експресія H19 буде викликати ефект Варбурга – схильність клітин, що активно діляться (в тому числі ракових) до використання аеробного гліколізу, замість анаеробного для енергозабезпечення, з подальшим утворенням лактату. [5, 6]

Використовуючи моделі нокдауну та надмірної експресії, вчені дослідили рівні лактилювання гістонів після модуляції рівнів H19 у HESC. За допомогою вестерн-блоттингу спостерігали позитивну кореляцію рівнів лактилювання гістонів з експресією H19. Результати імунофлуоресценції показали, що рівні лактилювання

гістонів та H3K18lac були підвищені у HESC з надмірною експресією H19, разом зі збільшенням сигналу ядерної флуоресценції. Ці результати продемонстрували, що підвищення експресії H19 призводить до збільшення лактилювання гістонів (пострансляційна модифікація, що є основним епігенетичним механізмом, що не залежить від екзо- чи ендогенних фаткорів, проте впливає на активність експресії генів, без змін в ДНК) HESC. [5, 7].

Спираючись на багатогранні результати досліджень, чітко можна сказати, що підвищена експресія H19 дійсно впливає на глікотичну активність LDHA, PKM2, ALDOA, а також призводить до активації аеробного швидкого гліколізу, ефекту Варбурга, що є характерним для онкоклітин (можна казати про ракову етіологію ендометріозу), що буде призводити до підвищення утворення лактату в організмі жінки і до лактилювання гістонів. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що активність експресії довгих некодуючих РНК й активність метаболізму глюкози може виступати потенційним маркерним показником до постановки діагнозу ендометріоз.

Також хотілось би висунути гіпотезу про те, що коли жінка починає відчувати симптоматику, яка характерна для ендометріозу (дисменорея, тазовий біль, менорагія, порушення циклу, радіючі болі в попереку тощо) і маємо результати гормональних досліджень (підвищення естрогену й прогестеронрезистентність), то можемо направляти жінку на додаткові аналізи, а саме дослідження рівня лактату, оскільки можемо назвати цей показник потенційним маркером до захворювання. Можливо, це зможе принести зміни в діагностиці та лікуванні захворювання на ранніх стадіях, і буде менш травматичним для пацієнток, ніж лапароскопія.

Список використаних джерел:

1. Mariadas H, Chen JH, Chen KH. The Molecular and Cellular Mechanisms of Endometriosis: From Basic Pathophysiology to Clinical Implications. International Journal of Molecular Sciences. 2025 Mar 10;26(6):2458.
2. Smolarz B, Szyłło K, Romanowicz H. Endometriosis: Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Treatment and Genetics (Review of Literature). International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2021 Sep 29;22(19):10554. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8508982/
3. Perkel JM. Visiting “Noncodarnia.” BioTechniques. 2013 Jun 1;54(6).
4. Fernandes J, Acuña S, Aoki J, Floeter-Winter L, Muxel S. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. Non-Coding RNA [Internet]. 2019 Feb 17;5(1):17. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468922/
5. Wen X, Zhang J, Xu Z, Li M, Dong X, Du Y, et al. Highly expressed lncRNA H19 in endometriosis promotes aerobic glycolysis and histone lactylation. Reproduction. 2024 Jul 2;168(2).
6. Alfarouk KO, Muddathir AK, Shayoub MEA. Tumor Acidity as Evolutionary Spite. Cancers. 2011 Jan 20;3(1):408–14.
7. O.E. Abaturov, A.O. Nikulina. Post-translational histone modifications associated with the development of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. Part 1. General provisions. GASTROENTEROLOGY. 2024 Sep 13;58(3):210–21.