

Lek. Marta Żeberkiewicz

Znaczenie zjawiska metaplazji nabłonkowo-mezenchymalnej w patogenezie endometriozy.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jacek Malejczyk

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Anna Hyc

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2019

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii
prof. dr hab. Jacek Malejczyk

Endometrioza charakteryzuje się występowaniem ognisk błony śluzowej macicy (endometrium) poza jej jamą. Choroba objawia się najczęściej różnymi cyklicznymi lub przewlekłymi dolegliwościami bólowymi, niepłodnością oraz obecnością torbieli endometrioidalnych. Patogeneza endometriozy wciąż nie została wyjaśniona. Najbardziej rozpowszechnionym poglądem, tłumaczącym etiologię tej choroby jest teoria wstecznej menstruacji zaproponowana w 1927 r przez John'a Sampson'a. Ponieważ wsteczna menstruacja występuje fizjologicznie u 90% kobiet, podstawową kwestią pozostaje pytanie co powoduje, że tylko u niektórych kobiet ektopowe komórki endometrium przeżywają w jamie otrzewnej. Może się na to składać kilka czynników: niewystarczająca eliminacja nieprawidłowych komórek przez układ odpornościowy, obniżona apoptoza lub zaburzenie funkcji komórek macierzystych. Istnieją również przypuszczenia, że przyczyną może być niedawno opisane zjawisko metaplastji nabłonkowo-mezenchymalnej (epithelial-mesenchymal transition – EMT).

W prawidłowych warunkach tkanka nabłonkowa tworzy określoną strukturę, w której komórki są spolaryzowane i ściśle przylegają do błony podstawnej i sąsiadujących komórek. W wyniku EMT komórki nabłonkowe tracą swoje charakterystyczne właściwości: oddziaływania międzykomórkowe, uporządkowanie oraz polarność. Zmiana morfologii komórek nabłonkowych wynika ze zmniejszenia ekspresji genów dla: E-kadheryny, desmoplakiny, mucyny-1, okludyny i kładyny oraz zwiększenia ekspresji genów dla komórek mezenchymalnych: N-kadheryny, aktyny mięśni gładkich (smooth-muscle actin - SMA), wimentyny i fibronektyny. Powyższe zmiany skutkują nabyciem przez komórki zdolności do migracji, cech inwazyjnych i oporności na apoptozę, czyli właściwości, które ułatwiająby tworzenie ektopowych ognisk endometriozy.

Główną rolę w indukcji EMT przypisuje się $TGF\beta$ ($TGF\beta 1$, $TGF\beta 2$, $TGF\beta 3$). $TGF\beta$ stymuluje ekspresję genów dla czynników transkrypcyjnych z rodziny ZEB (ZEB1 i ZEB2) oraz SNAI (SNAI1 i SNAI2). Wyżej wymienione czynniki transkrypcyjne są kluczowymi aktywatorami EMT. Powodują one represję genu dla E-kadheryny i stymulację ekspresji genu dla N-kadheryny. Ponadto czynniki transkrypcyjne ZEB i SNAI blokują transkrypcję mikroRNA z rodziny 200 (miR-200), które odpowiadają za utrzymanie fenotypu nabłonkowego komórek. Do rodziny miR-200 należą: miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 i miR-429. Hamują one potranskrypcyjnie ekspresję genów dla ZEB1 i ZEB2. Czynniki transkrypcyjne ZEB i miR-200 działają na zasadzie

podwójnej ujemnej pętli sprzężenia zwrotnego, wzajemnie kontrolując swoją ekspresję. W podobny sposób przebiega regulacja EMT z udziałem SNAI1 i SNAI2 oraz miR-200.

Celem pracy była próba ustalenia roli metaplastji nabłonkowo-mezenchymalnej w patogenezie endometriozy, poprzez zbadanie ekspresji genów biorących udział w jej regulacji w endometrium eutopowym zdrowych kobiet oraz w endometrium eutopowym i ektopowym pacjentek z endometriozą. W tym celu stosując metodę ilościowej reakcji RT-PCR zbadalam poziom mRNA TGF β 1 i TGF β 2, ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2, N-kadheryny i E-kadheryny oraz miR-200b i miR-200c w próbkach endometrium eutopowego zdrowych kobiet oraz endometrium eutopowego i torbieli endometrioidalnych kobiet z endometriozą.

Porównanie ekspresji badanych genów pomiędzy fazą proliferacyjną, a sekrecyjną cyklu menstruacyjnego wykazało istotny statystycznie spadek ekspresji N-kadheryny w endometrium eutopowym pacjentek bez endometriozy w drugiej fazie cyklu. Podobnej tendencji nie zaobserwowałam w endometrium eutopowym i torbielach endometrioidalnych u pacjentek z endometriozą. N-kadheryna jest markerem charakterystycznym dla nabłonkowych komórek macierzystych dna gruczołów. Brak spadku ekspresji tego genu w drugiej fazie cyklu u pacjentek z endometriozą może być spowodowany, albo zmianą proporcji, albo zwiększeniem liczby komórek nabłonkowych o cechach komórek macierzystych. W endometrium eutopowym u pacjentek z endometriozą nie zaobserwowałam zmian ekspresji TGF β 1 i TGF β 2, czynników transkrypcyjnych ZEB i SNAI oraz cząsteczek z rodziny miR-200 w porównaniu do endometrium kontrolnego i niezależnie od fazy cyklu menstruacyjnego. Na tej podstawie można przypuszczać, że w endometrium eutopowym u chorych z endometriozą nie występuje zjawisko EMT i tym samym nie jest ono pierwotną przyczyną endometriozy.

Wykazałam natomiast statystycznie istotny wzrost poziomu mRNA dla TGF β 1, ZEB1, ZEB2 i N-kadheryny oraz spadek ekspresji mRNA dla E-kadheryny oraz zahamowanie miR-200b i miR-200c w torbielach endometrioidalnych, w stosunku do endometrium eutopowego chorych z endometriozą i kobiet z grupy kontrolnej, niezależnie od fazy cyklu menstruacyjnego. Co więcej, w fazie proliferacyjnej zaobserwowałam wzrost ekspresji genu dla TGF β 2. Sugeruje to, że EMT odgrywa rolę w patogenezie torbieli endometrioidalnych. Analiza korelacji wykazała silną dodatnią

korelację między poziomem mRNA TGF β 1 i ZEB2 oraz między poziomem mRNA N-kadheryny i ZEB2. Nieco słabsza dodatnia korelacja występowała w przypadku TGF β 1 i N-kadheryny oraz TGF β 1 i ZEB1, a ZEB2 był ujemnie skorelowany z E-kadheryną. Natomiast ekspresja obu badanych miR-200 była ujemnie skorelowana z poziomem mRNA ZEB2.

Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że czynnikiem inicjującym EMT w torbielach endometrioidalnych jest prawdopodobnie TGF β 1 i w mniejszym stopniu TGF β 2, które przede wszystkim pobudzają ekspresję ZEB2. ZEB1 wydaje się mieć mniejszy udział w zjawisku EMT w torbielach endometrioidalnych. Prawdopodobnie istotną rolę odgrywają również miR-200b i miR-200c, które regulują ekspresję genów kodujących ZEB.

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że choć EMT w endometrium eutopowym nie odgrywa roli w rozwoju endometriozy, to ma znaczenie w patogenezie torbieli endometrioidalnych.