



Turku/Białystok, 2.9.2020

MEDICAL UNIVERSITY
OF BIALYSTOK

Recenzja pracy doktorskiej Pani lek. med. **Marty Żeberkiewicz**

„Znaczenia zjawiska metaplastji nabłonkowo-mezenchymalnej w patogenezie endometriozy”.

Endometrioza jest przewlekłą chorobą zapalną, zależną od estrogenów wywołaną przemieszczeniem komórek endometrium poza środowisko macicy, w Powoduje silne dolegliwości bólowe i może być przyczyną niepłodności u kobiet. Dotyka to około 6-10% kobiet w wieku reprodukcyjnym. Dotychczas nie wyjaśniono jaka jest przyczyna endometriozy, ani nie poznano jej molekularnego patomechanizmu. Niewystarczająca eliminacja ektopowych komórek przez układ odpornościowe (brak tzw. Graft vs host reaction), obniżona apoptoza, czy zaburzenia funkcji komórek macierzystych –rozważane są w etiopatogenezie endometriozy. W ostatnim czasie pojawiły się przypuszczenia że przyczyną może być „metaplastja nabłonkowo-mezenchymalna” (Epithelial Mezenchymal Transition – EMT).

EMT jest to przemiana nabłonkowo-mezenchymalna wykazujące trans-różnicowanie stacjonarnych komórek nabłonka w ruchliwe komórki mezenchymalne. Podczas EMT, komórki nabłonkowe tracą połączenia i polaryzację wierzchołkowo-podstawną, reorganizują swój cytoszkielet. Przy tym komórki nabłonkowe ulegają zmianie w kaskadzie sygnalizacyjnej, która określa kształt komórki i przeprogramowuje ekspresję genów. Zmiany EMT zwiększają ruchliwość poszczególnych komórek i umożliwiają rozwój inwazyjnego fenotypu. Na poziomie sygnalizacji molekularnej EMT jest regulowana na kilku szlakach. Szlaki te są regulowane przez białka TGF-beta (najważniejsze), HGF, EGF, FGF, VEGF, Wnt, SHH, IL6, HIF1 alfa i inne. Na poziomie transkrypcji SNAIL / Snuli, ZEB1 / ZEB2 i podstawowe czynniki transkrypcyjne helix-loop-helix (bHLH) nasilają progresję EMT. Dotychczasowe publikacje wykazały udział EMT w kilku procesach biologicznych, takich jak w rozwoju embrionalnym i postembrionalnym, regeneracji tkanek / gojeniu ran, homeostazie komórek macierzystych oraz w patofizjologii zwłóknienia i nowotworów.

Zmiana morfologii komórek nabłonkowych wynika ze zmniejszenia ekspresji genów epitelialnych głównie dla m.in. E-kadheryny oraz zwiększenia ekspresji genów dla komórek mezenchymalnych, takich jak N-kadheryny. Wśród innych kandydatów epitelialnych markerów bierze się pod uwagę: Collagen IV alpha 1, cytokeratin (pan), desoglein-3, laminin, MUC-1, Syndecan-1, desmoplakiny, mucyny-1, okludyny i kładyny oraz genów dla komórek mezenchymalnych, takich jak, aktyny mięśni gładkich (smooth-muscle actin - SMA), wimentyny i fibronektyny, S100A4, Slug, Snuli.

Wśród innych czynników odgrywających rolę w EMT wymienia się: beta-catenin, cadherin 11, GSK3beta, MMP2, SUMO2, Twist-1 oraz ZEB1-2, ISNAI blokujące transkrypcje microRNA 200 (mir 200 a, b c; jak i miR141 i miR429). Powyższe zmiany powodują nabycie przez komórki zdolności do migracji, cech inwazyjnych i oporności na apoptozę, czyli właściwości, które ułatwiałyby tworzenie ektopowych ognisk endometriozy. Jak dotychczas nie mamy pewnych dowodów jaki jest udział EMT w patogenezie endometriozy.

Przesłana mi do recenzji praca doktorskiej Pani lek. Marty Żeberkiewicz dotyczy zatem niezwykle aktualnego i ekscytującego problemu, mimo że dość trudnego metodycznie i możliwego do realizacji głównie w ośrodkach wysoko wyspecjalizowanych zajmujących się kompleksowym podejściem do problemów endometriozy (współpraca z nauk podstawowych wraz z klinicystami). Lek. Marta Żeberkiewicz miała okazję aby realizować swój projekt badawczy w jednym z wiodących polskich ośrodków specjalizujących się od wielu lat w badaniach podstawowych nad etiopatogenezą czy nowatorskim leczeniem endometriozy (w Katedrze i w Zakładzie Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, we współpracy z Katedrami Ginekologii i Położnictwa WUM oraz Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie).

Uważam, że temat podjęty przez doktorantkę został słusznie podjęty bo dotyczy to jednego z słabo poznanych, ale ważnego problemu molekularnych uwarunkowań wystąpienia endometriozy. Badanie te, jak i uzyskane wyniki dostarczają nowych danych na temat EMT w etiopatogenezie endometriozy.

Praca doktorska Pani lek. Marty Żeberkiewicz ma typowy układ pracy doktorskiej. Praca ta liczy 115 stron, cytuje 181 publikacji, głównie z okresu 2000-2019 oraz z piśmiennictwa angielskiego opublikowanych w peer-reviewed journals o wysokim impact factor. Wybór piśmiennictwa świadczy że doktorantka pogłębiła swoją wiedzę o endometriozie oraz o molekularnych aspektach endometriozy.

Streszczenie: jest ładnie napisane, jedynie mógłbym zwrócić uwagę na to że jest stanowczo za długie (3 i ½ strony), trzeba je skrócić dość mocno, co będzie bardzo przydatne przy opublikowaniu wyników w dobrym czasopiśmie z impact factor (na ogół Abstrakt w tych czasopismach nie może przekraczać 200 -250 słów).

Przegląd piśmiennictwa

Autorka bardzo dobrze opisała definicję i rys historyczny, epidemiologię, symptomatologię, etiologię, teorie powstawania endometriozy – wstecznej menstruacji Johna Samsona, metaplastji Johna Meyera oraz inne teorie (teoria uszkodzenia/regeneracji tkanek czy denerwacji/reinwercji). Następnie doktorantka opisała w tym samym podrozdziale o etiopatogenezie i immunopatogenezie endometriozy, endometrialne komórki macierzyste komórki NK, makrofagi i limfocyty. Bardzo dobrze została EMT: jej cechy morfologiczne, regulacja EMT, apoptoza w EMT i znaczenie EMT w chorobie nowotworowej oraz potencjalny związek pomiędzy EMT a chorobą nowotworową.

Rycina 1-3 są dobrze przygotowane. Pod ryc 1-trzeba koniecznie napisać że rycina ta została

„modyfikowana z pracy Brabetz & Brabetz 2010 (lub trzeba mieć zgody od tych autorów na reprodukcje). W rycinie 2 trzeba dodać że są to wybrane czynniki transkrypcyjne (bo nie wymieniono wszystkich).

W przeglądzie piśmiennictwa, wg mnie zabrakło uwzględnienia kwestii braku objawów endometriozy w czasie ciąży, jak i ewentualnym wpływie hormonu gonadotropiny kosmówkowej (hCG, human chorionic gonadotropin), choćby w paru zdaniach.

Cel Badan/ Materiały i Metodyka

Doktorantka dobrze i prosty sposób opisała cel badań pracy. Celem Jej badań była próba ustalenia jaka jest rola metaplastji nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT) w patogenezie endometriozy torbieli jajnikowych. W tym celu postanowiła zbadać ekspresję „wybranych” genów biorących udział w jej regulacji w endometrium eutopowym zdrowych kobiet, jak i u pacjentek endometriozą, z endometrium eutopowym i ektopowym, uwzględniając fazy cyklu miesięczkowego (proliferacyjna/sekrecyjna). Wśród różnych typów endometriozy rectovaginal deep endometriosis nodules (RVEN), najtrudniej się leczy i powoduje najbardziej dokuczliwe objawy. Zastanawiam się dlaczego doktorantka nie próbowała zbadać również RVEN? Być może przyczyną były trudności z uzyskaniem takiego materiału do badań?

Doktorantka stosując metodę ilościowej reakcji RTPCR zbadała ekspresję mRNA TGFβ1 i TGFβ2, ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2, N-kadheryny i E-kadheryny oraz miR200b i miR-200c. Ponadto sprawdziła lokalizację ekspresji białkowej E-Kadheryny, N-Kadheryny oraz ZEB1 i ZEB2 w endometrium eutopowym i torbielach endometrioidalnych.

Grupa pacjentek z endometriozą liczyła n=62. Kobiet z endometriozą i torbielami endometrioidalnymi jajników było n=32, u których pobrano wycinki z torbieli endometrioidalnych (w tym 32 biopsji sparowanych, 7 biopsji tylko torbieli endometrioidalnych, bez endometrium). Kryteria włączenia do badań było endometriozą potwierdzoną w trakcie laparoskopii (myślę że na pewno również badanie histopatologiczne również, co trzeba było tutaj również uwzględnić). Kryteria wyłączenia – jakkolwiek leczenie hormonalne w ciągu ostatnich 3 miesięcy lub inne choroby przewlekłe. W Tabeli 1 Doktorantka podała charakterystykę pacjentek. Grupą kontrolną były kobiety wiekowo identyczne, „bez” endometriozy potwierdzone laparoskopowo, n=38, gdzie kryteria wyłączenia było identyczne jak wyżej.

Doktorantka przeprowadzała analizę statystyczną przy użyciu programu Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Wyniki zostały przedstawione jako wykresy punktowe z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono w zależności od rodzaju porównań za pomocą testu Kruskala-Wallisa i testu post hoc Dunna lub testu U Manna Whitneya.

Doktorantkę powinna wyjaśnić dlaczego wyniki przedstawiła wykresem punktowe z medianą i zakresem międzykwartylowym. Doktorantka powinna to opisać w analizie statystycznej (w doktoracie, jak i w publikacji w peer-reviewed journals).

Wyniki badan i dyskusja

Doktorantka przedstawiała wyniki badan w 2 tabelach oraz 13 rycinach (bardzo ładnie przygotowane) w sposób klarowny i zrozumiały.

Analizując wyniki np. z TAB 1, widać wyraźnie ze grupy badane i kontrolne były dobrze dobrane. Bardzo żałuje jedynie ze doktorantka nie zbadała żadnych próbek z endometriozy głębokiej /rectovaginal deep endometriosis nodules, RVEN/.

Doktorantka wykazała istotne statystycznie zmniejszenie ekspresji N-kadheryny w endometrium eutropowym pacjentek bez endometriozy w drugiej fazie cyklu, a nie obserwowala tego w endometrium eutropowym i torbielach endometrioidalnych u pacjentek z endometriozą. W endometrium eutropowym u pacjentek z endometriozą nie bylo zmian ekspresji TGFβ1 i TGFβ2, czynników transkrypcyjnych ZEB i SNAI oraz cząsteczek z rodziny miR-200 w porównaniu do endometrium kontrolnego niezależnie od fazy cyklu miesięczkowego. Te wyniki pozwoliły Doktorantce wysunąć ciekawy wniosek, że w endometrium eutropowym u chorych z endometriozą nie występuje EMT i tym samym nie jest ono pierwotną przyczyną endometriozy.

Doktorantka wykazała statystycznie istotny wzrost ekspresji TGFβ1, ZEB1, ZEB2 i N-kadheryny oraz obniżenie ekspresji E-kadheryny oraz zahamowanie miR-200b i miR-200c w torbielach endometrioidalnych, w porównaniu do endometrium eutropowego chorych z endometriozą i kobiet z grupy kontrolnej, niezależnie od fazy cyklu miesięczkowego. W fazie proliferacyjnej obserwowala wzrost ekspresji TGFβ2, co mogło zasugerować ze EMT odgrywa rolę w patogenezie torbieli endometrioidalnych. Analiza korelacji wykazała silną dodatnią korelację między ekspresją mRNA TGFβ1 i ZEB2 oraz między ekspresją mRNA N-kadheryny i ZEB2. Nieco słabsza dodatnia korelacja występowała między ekspresją TGFβ1 i N-kadheryny. Ekspresja TGFβ1 ZEB1, ZEB2 był ujemnie skorelowane z E-kadheryną. Ekspresja obu badanych miR-200 ujemnie korelowala z ekspresją mRNA ZEB2.

Wyniki badan własnych doktorantka przedyskutowala z danymi z piśmiennictwa. Wyniki są bardzo interesujące i potwierdzają wcześniejszych dane literaturowe. Odradzałbym Doktorantce takich zdań przy publikowaniu wyników ze „moja praca jest jednym z niewielu badan obejmujących” tak duży materiał kliniczny”. Niech wyniki mówią za siebie.

Autorka wykazała udział EMT w patogenezie endometriozy jajnikowej co jest zgodne z doniesieniami z 2017r. Nowym Jej osiągnięciem było pokazanie ze endometrioza jajnikowa jest związana z procesem EMT regulowanym przez podwójną pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego ZEB/mir200. Autorce udało się potwierdzić i pokazać lokalizacji badanych podstawowych markerów EMT na poziomie białkowym (IHC). E-kadheryny i N-kadheryny w komórkach gruczołowych pacjentek z grupy kontrolnej i pacjentek z endometriozą. Ekspresja ZEB1 i ZEB2 była w komórkach zrębu, a w torbielach endometrioidalnych ich ekspresja była również w komórkach gruczołowych. Nie wiem co doktorantka uznaje za „subiektywna” ekspresje i lokalizacje białkową w IHC (może weak or trace

expression?), ale bardzo żałuje że nie zrobiła ilościowej analizy białkowej za pomocą Western Blotu, co byłoby świetnym uzupełnieniem badań ilościowych ekspresji mRNA metodą qPCRu.

Pracę doktorską kończy 5 wniosków. Każdy z wniosków jest w pełni uzasadniony.

Uważam że wnioski wynikające z przeprowadzonych badań są mocnymi stronami pracy:

- 1) Czynniki odpowiedzialne za regulację EMT ulegają ekspresji w prawidłowym endometrium.
- 2) W prawidłowym endometrium w przebiegu cyklu menstruacyjnego można zaobserwować wzrost ekspresji ZEB1 i SNAI2 w fazie sekrecyjnej, natomiast ekspresja pozostałych czynników nie ulega zmianie.
- 3) Ekspresja markerów EMT w endometrium eutropowym pacjentek z endometriozą nie różni się od endometrium zdrowych kobiet, co sugeruje, że endometrioza nie jest związana z indukcją EMT w endometrium eutropowym.
- 4) W torbielach endometrioidalnych występują istotne zmiany w ekspresji czynników powiązanych z EMT co dowodzi, że zjawisko to odgrywa rolę w patogenezie endometriozy.
- 5) Główną rolę w przebiegu EMT w endometriozie odgrywają prawdopodobnie TGFβ1, ZEB2 oraz mikroRNA z rodziny miR-200. Sugeruje to, że istotną rolę w patogenezie endometriozy odgrywa układ sprzężenia TGFβ/ZEB/miR-200.

W mojej opinii słaba stroną pracy, są:

1. Nie znalazłem dokładnego uzasadnienia w pracy doktorskiej (we wstępie, czy w dyskusji w postaci własnych argumentów czy wsparciem wcześniejszych badań w dyskusji) – dlaczego akurat doktorantka wybrała te biomarkery „TGFβ1, TGFβ2, ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2, N-cadherin, E-cadherin and miR-200 oraz miR-200b and miR-200c” gdyż są jeszcze inne biomarkery dla komórek epitelialnych tj. Collagen IV alpha 1, cytokeratin (pan), desmoglein-3, laminin, MUC-1, Syndecan-1, desmoplakiny, mucyny-1, okludyny i kładyny oraz genów dla komórek mezenchymalnych, takich jak, aktyny mięśni gładkich (smooth-muscle actin - SMA), wimentyny i fibronektyny, S100A4, Slug”. Wśród innych graczy do EMT wymienia się też: beta-catenin, cadherin 11, GSK3beta, MMP2, SUMO2, Twist-1 oraz ISNAI blokujące transkrypcje microRNA 200 (poza mir 200 a, b c; a także jak miR141 i miR429).
2. za dużo jest powtórzonych własnych wyników ponownie w Dyskusji. Lepiej tego uniknąć w dyskusji.

Trzeba to brać pod uwagę przy opublikowaniu tej pracy:

- Typos i poprawne cytowanie piśmiennictwa, np. Str. 24, Lancet, 1993, brak danych o pracy
- W tekście pracy proponuje aby nie używać określeń na nazwanie EMT „zjawiskiem”, po prostu nazwać jako EMT, bo to nie jest żadne „zjawisko”.
- unikałbym zaczynanie nowych zdań/paragrafu od słowa „Ponieważ” [strona 77, Dyskusja], bo to chyba nie jest prawidłowy styl.

- również zastąpiłbym „oryginalne osiągnięcie” na „osiągnięcie nowe” (novel achievement) (strona 77, Dyskusja, ln 19).

- nazwy genów powinno być „*italic*”, a nazwa białka normalnymi czcionkami w całej pracy.

- Do piśmiennictwa Pani doktoratu dodałbym 1 publikację z Sci Rep . 2020 May 21;10(1):8442. doi: 10.1038/s41598-020-65606-9. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis [Chen M et al](#)

Sugestie do przyszłych badań nad EMT i endometriozą:

- Namawiałbym doktorantkę o sprawdzanie szlaków np. SMAD, interakcje OCT4 z innymi co-activator-ami i co-inhibitor-ami w tych szlakach TGFbeta i SMAD.

- sprawdzanie interakcje SF-1 i GATA-4 z markerami EMT w endometriozie

Podsumowując, wartość naukowa pracy doktorskiej Pani **Marty Żeberkiewicz** wiąże się ze znaczącym poszerzeniem wiedzy również w szerszym kontekście translacyjnym na temat EMT w patogenezie endometriozы jajnikowej.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam że rozprawa doktorska lek. Pani **Marty Żeberkiewicz** „Znaczenia zjawiska metaplastji nabłonkowo-mezenchymalnej w patogenezie endometriozы”, spełnia w sposób zadawalający wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.)” zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie lek med. **Martę Żeberkiewicz** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy ze względu na naukową, nowatorską i interdyscyplinarną wartość pracy.



Prof. dr hab. n. med. Nafis Rahman

Prof. dr hab. n. med. Nafis A. RAHMAN
ginekolog- położnik
ul. Grabowska 6 m. 14
01-236 Warszawa, 960515480
22 403 16 16, 0 662 847 823

Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej w Białymstoku, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, M. Skłodowskiej-Curie 24 A, 15-276 Białystok, Polska. nafis.rahman@umb.edu.pl

oraz

Instytut Biomedycyny, Wydział Lekarski; Uniwersytet w Turku, Finlandia, Kiinamyllynkatu 10, 20540 Turku, Finlandia; nafis.rahman@utu.fi