

Prof. dr hab. Janusz A. Siedlecki
Kierownik Zakładu Onkologii
Molekularnej i Translacyjnej
Narodowego Instytutu Onkologii
w Warszawie

Warszawa 21.09.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.
**„Znaczenie zjawiska metaplasji nabłonkowo-mezenchymalnej
w patogenezie endometriozy**

Autor: *lek. Marta Żeberkiewicz*

Chociaż endometrioza została po raz pierwszy opisana pod koniec XVII wieku, do dziś brak jest zgody co do jednoznacznej przyczyny występowania tej choroby. Najpowszechniej akceptowaną jest hipoteza refluksu krwi miesięczkowej, który występuje u prawie 90% kobiet. W jego wyniku następuje implantacja ektopowego endometrium. Zwiększona proliferacja ektopowej tkanki endometrium prowadzi do powstania i rozwoju ognisk endometriozy poza jamą macicy. Nowsze hipotezy sugerują niesprawne działanie układu immunologicznego, który nie jest wystarczająco sprawny, aby usunąć migrujące poza jamę macicy z krwią miesięczkową komórki endometrium i/lub ektopowego endometrium. Rozwinięciem tej hipotezy jest wykazanie istnienia niskozróżnicowanych komórek w jamie otrzewnej, które pod wpływem różnych czynników wewnętrznych i zewnętrznych biochemicznych i immunologicznych przekształcają się w komórki endometrium. W procesie tym istotna rola może przypadać transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT). Brak jednoznacznego określenia patogenezy endometriozy jest czynnikiem, dla którego podjęcie tematyki endometriozy należy uznać za celowe.

Celem tej pracy było stwierdzenie czy zjawisko zmiany fenotypu komórek epitelialnych w mezenchymalne może brać udział w powstawaniu endometriozy. Doktorantka prowadziła badania wykorzystując materiał pobrany od pacjentek zarówno na poziomie mRNA, miRNA i bia-

łek porównując ze sobą poziomy ekspresji genów, o których wiadomo, że uczestniczą w regulacji procesu EMT w prawidłowym endometrium, endometrium ektopowym i endometriozie z uwzględnieniem faz cyklu miesięczkowego.

Do badania zakwalifikowano 100 pacjentek hospitalizowanych w Oddziale Ginekologii i Ambulatorium I i II Kliniki Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) oraz Kliniki Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej Wojskowego Instytutu Medycznego (WIM), w tym 62 przypadki to chore z endometriozą lub torbielami endometroidalnymi. Grupę kontrolną stanowiło 38 kobiet bez endometriozy potwierdzonej laparoskopowo. Materiał do oznaczeń stanowiło eutopowe i ektopowe endometrium. Po pobraniu materiał był albo wykorzystany bezpośrednio lub zamrażany w temperaturze -80°C . Izolację RNA i miRNA wykonano z użyciem odpowiednich komercyjnych zestawów zgodnie z instrukcjami producentów. Badania immunohistochemiczne wykonano na skrawkach parafinowych z pobranego od pacjentek materiału zatopionego w blokach parafinowych. W tych badaniach użyto komercyjnych przeciwciał.

Poziom ekspresji badanych genów (*ZEB1* i 2, *SNAIL* i 2, *TGF β 1* i 2, *E-kadheryny* (*CDH1*) i *N-kadheryny* (*CDH2*) oraz genu kontrolnego *GAPDH*) oceniano przy pomocy Real-Time PCR (ilościowy PCR). Dodatkowo autorka oceniała poziom ekspresji wybranych miRNA. Ocenę immunohistochemiczną poziomu ekspresji oraz lokalizację badanych genów oceniano w skali od + do +++.

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 10.0. Korelację między poziomami ekspresji badanych genów oceniano wyliczając współczynnik Spearmana. Za istotną statystycznie uznano wartość $P < 0,05$.

Analiza poziomu ekspresji badanych genów w prawidłowym endometrium wykazywała zwiększenie poziomu ekspresji *SNAIL2* w fazie sekrecyjnej w stosunku do fazy proliferacyjnej. Obserwowana niewielka różnica w poziomie ekspresji *ZEB1* między fazami sekrecyjną i proliferacyjną nie była istotna statystycznie. Poziom ekspresji pozostałych badanych genów w obu fazach był porównywalny. W grupie kontrolnej wykazano statystycznie istotny spadek poziomu ekspresji N-kadheryny w fazie sekrecyjnej względem fazy proliferacyjnej. Poziom ekspresji w fazie proliferacyjnej na ogół był nieco wyższy. I tak obserwowano statystycznie istotny wyższy poziom ekspresji *TGF β 1* w stosunku do *TGF β 2*, wyższy poziom ekspresji *SNAIL2* w stosunku do *SNAIL* oraz wyższy poziom ekspresji E-kadheryny w porównaniu do N-kadheryny w fazie proliferacyjnej.

W prawidłowym endometrium u kobiet z endometriozą zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji *ZEB1* i *SNAI2* w fazie sekrecyjnej w porównaniu do fazy proliferacyjnej. Większy też był poziom ekspresji *TGFβ1* w stosunku do *TGFβ2* w obu fazach cyklu menstruacyjnego podobnie wyższy poziom ekspresji genu *SNAI2* w stosunku do *SNAI1* w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej oraz wyższy poziom ekspresji *CDH1* w porównaniu do *CDH2* w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej. Podobne porównanie poziomu ekspresji badanych genów przeprowadzone w prawidłowym endometrium versus endometrioza wykazało zwiększony poziom ekspresji *TGFβ1* w stosunku do *TGFβ2* w fazie proliferacyjnej, wyższy poziom ekspresji *ZEB2* w stosunku do *ZEB1* w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej oraz wyższy poziom ekspresji *SNAI2* w porównaniu z *SNAI1* w obu fazach cyklu

W ektopowym endometrium poziom ekspresji *TGFβ1* w obu fazach cyklu menstruacyjnego jest wyższy niż *TGFβ2*. Podobnie w fazie proliferacyjnej w stosunku do sekrecyjnej obserwuje się wyższy poziom ekspresji *ZEB2* w niż *ZEB1* oraz *SNAI2* niż *SNAI1*.

Porównując poziom ekspresji wymienionych powyżej genów, których produkty w sposób bezpośredni lub pośredni są zaangażowane w proces transformacji epitelialno-mezenchymalnej (EMT) można zauważyć, że w prawidłowym endometrium poziom ekspresji E-kadheryny jest wyższy niż poziom N-kadheryny oraz, że poziom ekspresji N-kadheryny spada w fazie sekrecyjnej. Podobnie poziom ekspresji genu *SNAI1* jest niższy niż poziom ekspresji *SNAI2* oraz, że poziom ekspresji *SNAI2* rośnie w fazie sekrecyjnej. Doktorantka nie odnotowała zmian w poziomie ekspresji badanych miRNA serii 200 w zależności od fazy cyklu menstruacyjnego. Podobnie nie zaobserwowała zmian w poziomie ekspresji genów *ZEB1* i *ZEB2*, choć w fazie sekrecyjnej poziom mRNA *ZEB1* nieznacznie rośnie.

Wzrost poziomu mRNA N-kadheryny w fazie sekrecyjnej przy równoczesnym spadku poziomu mRNA E-kadheryny to typowe zjawisko towarzyszące przemianie epitelialno-mezenchymalnej. Może to sprzyjać łatwiejszemu przenikaniu komórek endometrium do krwi menstruacyjnej. N-kadheryna jest też markerem komórek o dużym potencjale proliferacyjnym, a zatem może też wpływać na rozrost frakcji komórek mezenchymalnych zdolnych do przemieszczania się.

Aby odpowiedzieć na pytanie o rolę transformacji epitelialno-mezenchymalnej w procesie tworzenia endometriozy porównano zmiany w poziomie ekspresji wybranych genów o których wiadomo, że ich produkty są zaangażowane w proces transformacji epitelialno-mezenchymalnej (*ZEB*, *SNAI* kadheryny i *TGF*) oraz poziomy niektórych miRNA z rodziny 200 (*miR200c* i *miR200b*). Porównanie obejmowało różnice w poziomach ekspresji badanych genów

między prawidłowym endometrium a prawidłowym endometrium u pacjentek z endometriozą lub endometrium ektopowym oraz torbielami endometroidalnymi. Badania wykonano dla fazy proliferacyjnej i sekrecyjnej.

Najważniejszym wnioskiem płynącym z tej pracy jest stwierdzenie braku prostej zależności między endometriozą a EMT. W endometrium eutopowym pacjentek z endometriozą poziom ekspresji badanych genów jest taki sam jak w prawidłowym endometrium. W przypadku torbieli endometroidalnych poziom ekspresji genów, których produkty są regulatorami EMT ulega wzrostowi, co może sugerować rolę EMT w patogenezie endometriozy. Analizy korelacji pozwoliły na stwierdzenie, że w prawidłowym endometrium zmianom poziomowi ekspresji ulegają te geny, których produkty są odpowiedzialne za regulację procesu EMT. Nie jest więc zaskoczeniem, że w prawidłowym endometrium w fazie sekrecyjnej cyklu menstruacyjnego wzrasta poziom ekspresji genów ZEB1 i SNAI2.

Obecność wysokiej ekspresji N-kadheryny w fazie sekrecyjnej sprzyja złuszczeniu się nabłonka endometriodnego. N kadheryna ma znacznie mniejsze zdolności adhezyjne niż E-kadheryna, która odgrywa istotną rolę w tworzeniu ściśle przylegających do siebie komórek epitelialnych. Wzrost poziomu mRNA N-kadheryny w fazie proliferacyjnej może w zdecydowany sposób przyczyniać się do łatwej migracji komórek endometriozy wraz z krwią menstruacyjną w pozamaciczne regiony organizmu.

W regulacji EMT istotne są czynniki transkrypcyjne z rodziny białek z motywem palca cynkowego SNAI takie jak SNAI1 (SNAIL), SNAI2 (SLUG) oraz ZEB1 i ZEB2 i TWIST (bHLH). Czynniki te pośrednio wpływają na proces EMT obniżając poziom ekspresji E-kadheryny oraz aktywują wzrost poziomu ekspresji N-kadheryny.

W endometrium zdrowych kobiet zmianom podlega poziom ekspresji N-kadheryny. Poziom mRNA CDH2 w fazie proliferacyjnej był wysoki i obniżał się w fazie sekrecyjnej. Brak spadku ekspresji N-kadheryny w drugiej fazie cyklu w endometrium kobiet z endometriozą może być wynikiem zaburzenia ekspresji N-kadheryny lub zaburzenia prawidłowej liczby gruczołowych komórek progenitorowych. Może to wskazywać, że endometrioza może być wynikiem nieprawidłowej funkcji zarówno mezenchymalnych, jak i epitelialnych komórek macierzystych.

Wzrost poziomu ekspresji N-kadheryny i spadek poziomu ekspresji E-kadheryny sprzyja rozluźnieniu struktury endometrium. Równolegle ze spadkiem adhezyności w procesie EMT następuje zwiększenie zdolności komórek do przemieszczania się. W konsekwencji możliwe

staje się przedostanie komórek o fenotypie podobnym do mezenchymalnego wraz z krwią menstruacyjną poza jamę macicy.

Kolejnymi czynnikami regulującymi przebieg procesu transformacji epitelialno-mezenchymalnej są miRNA z rodziny 200. Hamują one ekspresję ZEB1 i 2 poprzez komplementację z 3'UTR, co prowadzi do degradacji mRNA ZEB. Z drugiej strony czynniki transkrypcyjne ZEB działają hamująco na poziom transkrypcji miRNA z rodziny 200.

Podsumowując, wyniki tej pracy wskazują, że zjawisko endometriozy nie jest bezpośrednio związane z procesem EMT. W torbielach endometrioidalnych można co prawda zaobserwować zmiany sugerujące wpływ procesu EMT, jednak w pozostałych przypadkach rola EMT ma raczej charakter marginalny. Ale nie może być całkowicie wykluczona.

Przedstawiona praca wykorzystuje bardzo proste narzędzia do próby zdefiniowania roli EMT w procesie tworzenia ektopowego endometrium i endometriozy. Uzyskane rezultaty nie potwierdzają ani nie wykluczają wpływu tego procesu. Fakt spadku ekspresji E-kadheryny i wzrost stężenia N-kadheryny to znacząca zmiana, ale też zmiany w poziomach tych adhezyjnych białek mogą równie dobrze być związane z fazą cyklu menstruacyjnego. Nie może więc ich poziom być definitywnym czynnikiem określającym rolę EMT w powstawaniu endometriozy. Wszystkie pozostałe zmiany w poziomie ekspresji badanych genów i miRNA nie mają charakteru jednoznacznego. Mimo braku definitywnej odpowiedzi uważam tę pracę za zrealizowaną. Doktorantka wykazała się opanowaniem technik pracy z RNA - co trzeba to wyraźnie podkreślić - nie jest łatwe. Dobrze poprowadziła dyskusję wskazując podobieństwa i różnice w otrzymanych w jej badaniach danych. Nie zawarła też w podsumowaniu jednoznacznych wniosków. 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 z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Pomijając drobne błędy muszę uznać tę pracę za zrealizowaną i na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Marty Żeberkiewicz do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Kierownik
Zakładu Onkologii
Molekularnej i Translacyjnej
Prof. dr hab. n. med. Janusz Siedlecki