

mgr inż. Anna Wójtowicz

Rozprawa doktorska:

***Wpływ subpopulacji limfocytów pomocniczych Th1 i Th2 oraz ich mediatorów
na procesy związane z rozwojem włóknienia
w przebiegu endometrosis u klaczy***

PROMOTOR

dr hab. Anna Szóstek-Mioduchowska
*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie*

RECENZENCI

dr hab. Paweł Kołodziejwski
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

dr hab. Małgorzata Domino, prof. SGGW
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

dr hab. Paweł Brym, prof. UWM
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Rozprawa doktorska wykonana w Zespole Immunologii i Patologii Rozrodu
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Olsztyn, 2025

WSTĘP

Endometrosis to chroniczne, degenerujące zapalenie błony śluzowej macicy u klaczy, którego główną cechą jest włóknienie zrębu endometrium, z towarzyszącymi zmianami w obrębie nabłonka gruczołowego. Zmiany te zaburzają prawidłowe funkcjonowanie błony śluzowej macicy, co w konsekwencji przyczynia się do niepłodności u klaczy.

Włóknienie jest wynikiem nadmiernego gromadzenia się składników ECM oraz nadmiernej aktywacji miofibroblastów, które odgrywają kluczową rolę w przebudowie tkanki. Ich aktywacja może być wywołana przez różne czynniki, w tym przewlekłe procesy zapalne, które towarzyszą endometrosis. Wyniki badań wskazują na potencjalny udział limfocytów pomocniczych T (Th) w przebiegu endometrosis u klaczy. Wśród limfocytów pomocniczych szczególną rolę mogą odgrywać subpopulacje Th1 i Th2, które regulują odpowiedź immunologiczną i procesy związane z włóknieniem. Limfocyty Th1, poprzez wydzielanie interferonu- γ (IFN- γ) oraz innych cytokin prozapalnych, mogą nasilać stan zapalny, podczas gdy limfocyty Th2, poprzez produkcję interleukin (IL), w tym IL-4 i IL-13, mogą sprzyjać procesom naprawczym, ale jednocześnie stymulować włóknienie. Dotychczas jednak nie przeprowadzono badań dotyczących wpływu limfocytów pomocniczych T na procesy związane z włóknieniem błony śluzowej macicy w przebiegu endometrosis u klaczy.

CEL BADAWCZY

Celem rozprawy doktorskiej było opisanie wpływu dwóch subpopulacji limfocytów Th: Th1 i Th2 oraz wydzielanych przez nie mediatorów: IFN- γ , IL-4 oraz IL-13 na procesy związane z rozwojem włóknienia w przebiegu endometrosis u klaczy

HIPOTEZA BADAWCZA

Główna hipoteza badawcza zakładała, iż limfocyty Th1 i IFN- γ wywierają działanie hamujące, natomiast limfocyty Th2 oraz IL-4 i IL-13 wywierają działanie stymulujące na procesy komórkowe i molekularne związane z rozwojem włóknienia endometrium w postępie endometrosis u klaczy.

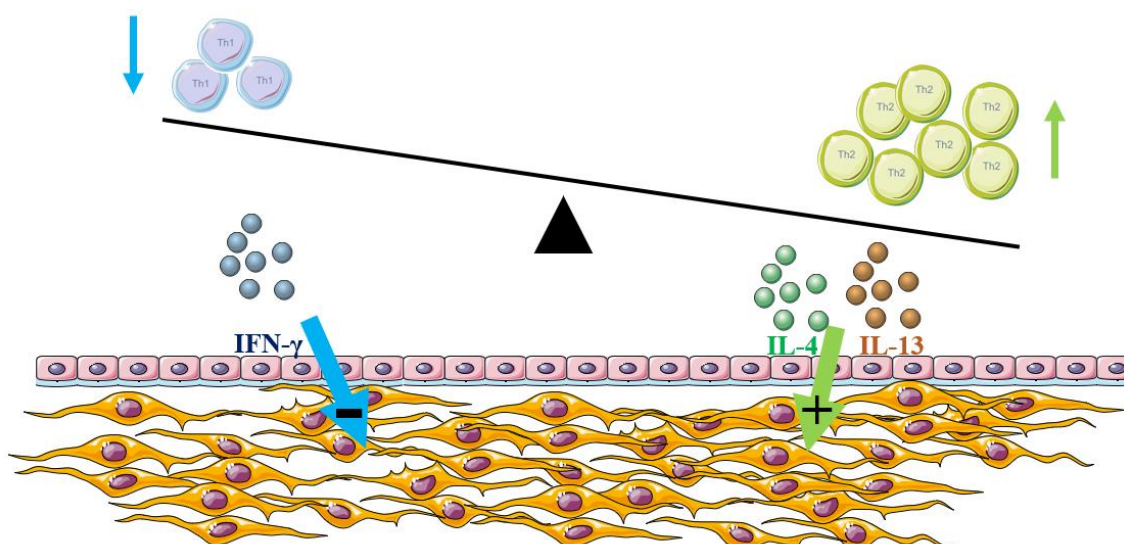


Figura 1. Hipoteza główna.

W oparciu o hipotezę główną sformułowano trzy hipotezy szczegółowe:

Hipoteza I: Liczba limfocytów Th2, stosunek limfocytów Th2 do Th1, a także ekspresja IL-4 i IL-13 oraz ich receptorów wzrasta w endometrium klaczy w miarę rozwoju endometrosis.

Hipoteza II: Limfocyty Th1 i Th2, poprzez swój sekretom, wywierają wpływ na procesy zaangażowane w rozwój włóknienia endometrium poprzez wpływ na profil ekspresji genów i właściwości fibroblastów.

Hipoteza III: Interferon γ wywiera działanie przeciwwłóknieniowe a IL-4 i IL-13 wywierają działanie stymulujące procesy związane z rozwojem włóknienia wpływając na cechy funkcjonalne fibroblastów endometrium klaczy i ekspresję genów zaangażowanych w procesy związane z rozwojem włóknienia endometrium.

MATERIAŁ BADAWCZY

Materiał badawczy stanowiły macice pozyskane od klaczy w fazie środkowo-lutealnej i pęcherzykowej cyklu rujowego. W badaniach wykorzystano tkankę endometrium (kategoria I, IIA, IIB i III; wg klasyfikacji Kenney'a i Doiga, 1986; $n=6$ /faza cyklu rujowego/kategoria endometrium, $\sum n=48$), a także wyizolowane z endometrium fibroblasty (kategoria I [$n=5$] i IIB [$n=5$]) oraz limfocyty (kategoria I, IIA, IIB i III, $n=6$ /faza cyklu rujowego/kategoria endometrium, $\sum n=48$). Ponadto, w badaniach wykorzystano zróżnicowane z naiwnych limfocytów pomocniczych (Th0) limfocyty Th1 i Th2 w celu uzyskania medium pochodowlanego zawierające ich sekretom.

ZADANIA BADAWCZE

W celu weryfikacji hipotez sformułowano następujące zadania badawcze:

Zadanie badawcze 1: Określenie udziału subpopulacji komórek Th1 i Th2 oraz ekspresji IFN- γ , IL-4 i IL-13 oraz ich odpowiednich receptorów (IFN γ R1, IL-4RA i IL-13RA) w endometrium klaczy w przebiegu endometrosis.

Doświadczenie 1. Określenie udziału subpopulacji limfocytów Th1 i Th2 w endometrium klaczy w przebiegu endometrosis.

Doświadczenie 2. Określenie ekspresji IFN- γ , IL-4 i IL-13 oraz ich odpowiednich receptorów (IFN γ R1, IL-4RA i IL-13RA) w endometrium klaczy w przebiegu endometrosis.

Zadanie badawcze 2: Określenie wpływu sekretomu komórek Th1 i Th2 na cechy funkcjonalne, ekspresję genów markerów włóknienia oraz zmiany w transkryptomie w hodowanych *in vitro* fibroblastach endometrium klaczy pochodzących z endometrium kategorii I.

Doświadczenie 1. Określenie wpływu sekretomu limfocytów Th1 i Th2 na cechy funkcjonalne i ekspresję genów markerów włóknienia w hodowanych *in vitro* fibroblastach pochodzących z endometrium klaczy kategorii I.

Doświadczenie 2. Określenie wpływu sekretomu limfocytów Th1 i Th2 na potencjalne ścieżki sygnałowe oraz procesy biologiczne i molekularne w hodowanych *in vitro* fibroblastach pochodzących z endometrium klaczy kategorii I.

Zadanie badawcze 3: Określenie wpływu IFN- γ , IL-4 i IL-13 na cechy funkcjonalne, ekspresję markerów włóknienia oraz zmiany transkryptomiczne w hodowanych *in vitro* fibroblastach klaczy pochodzących z endometrium kategorii I i IIB.

Doświadczenie 1. Określenie wpływu IFN- γ , IL-4 i IL-13 na cechy funkcjonalne: proliferację, żywotność, migrację i kurczliwość dysku kolagenowego w hodowanych *in vitro* fibroblastach pochodzących z endometrium klaczy kategorii I i IIB.

Doświadczenie 2. Określenie wpływu IFN- γ , IL-4 i IL-13 na potencjalne ścieżki sygnałowe oraz procesy biologiczne i molekularne w hodowanych *in vitro* fibroblastach pochodzących z endometrium klaczy kategorii I i IIB.

Doświadczenie 3. Porównanie odpowiedzi fibroblastów na stymulację IFN- γ , IL-4 i IL-13 w zależności od kategorii endometrium (I i IIB), z jakiej zostały wyizolowane.

NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI

Analiza mająca na celu określenie udziału subpopulacji limfocytów Th1 (CD3+ CD4+ IFN- γ +) i Th2 (CD3+ CD4+ IL-4+) w endometrium w przebiegu endometrosis (kategoria I, IIA, IIB, III) podczas środkowo-lutealnej i pęcherzykowej fazy cyklu rujowego nie wykazała istotnych różnic między badanymi kategoriami. Nie zaobserwowano również różnic w ekspresji IFN- γ , IL-4 i IL-13 oraz ich odpowiednich receptorów (IFN γ R1, IL-4RA i IL-13RA) na poziomie zarówno genu, jak i białka pomiędzy kategoriami endometrium.

Sekretom limfocytów Th1 zwiększył proliferację i żywotność fibroblastów pochodzących z endometrium kategorii I, wpłynął na ekspresję wybranych markerów związanych z ECM (*fibronektyny 1 - FN1*, *α -aktyny mięśni gładkich - ACTA2*, *2 metaolproteiny macierzy - MMP2*, *1 i 2 tkankowego inhibitora metaloproteinaz - TIMP1 i TIMP2*) na poziomie genu, a także wpłynął na profil transkryptomiczny fibroblastów. W wyniku działania sekretomu limfocytów Th1 na fibroblasty, zidentyfikowano 2140 geny o zróżnicowanej ekspresji, spośród których 1057 wykazało obniżenie a 1083 zwiększenie ekspresji. Funkcjonalna analiza tych genów wskazała na ich udział w 902 procesach biologicznych, 70 komponentach komórkowych i 93 funkcjach molekularnych, a także w 19 ścieżkach sygnałowych. Wśród zidentyfikowanych procesów znalazły się te związane z przebudową ECM: organizacja ECM, adhezja komórek do macierzy i absorpcja białek. Ponadto, zidentyfikowano procesy związane z cyklem komórkowym i metabolizmem, takie jak: proliferacja i wzrost komórek, replikacja DNA, czy biosynteza nienasyconych kwasów tłuszczowych. Co więcej, zidentyfikowane geny o zróżnicowanej ekspresji zostały przypisane do takich szlaków sygnałowych jak kanoniczna ścieżka NF- κ B, czy JAK-STAT.

Sekretom limfocytów Th2 zwiększył proliferację i żywotność fibroblastów endometrium kategorii I, wpłynął na ekspresję wybranych markerów związanych z ECM na poziomie genu, a także zmienił profil transkryptomiczny fibroblastów. W wyniku działania sekretomu limfocytów Th2 na fibroblasty, zidentyfikowano 1033 geny o zróżnicowanej ekspresji, spośród których 411 wykazało obniżenie, a 622 zwiększenie ekspresji. Analiza funkcjonalna tych genów wykazała ich zaangażowanie w 919 procesów biologicznych, 59 komponentów komórkowych, 83 funkcje molekularnych oraz 21 ścieżek sygnałowych. Zidentyfikowane geny o zróżnicowanej ekspresji zostały przypisane do, m.in. procesów związanych z przebudową ECM, takich jak: przebudowa tkanek, organizacja ECM, interakcje receptor-macierz i rozwój tkanki łącznej. Zidentyfikowano także procesy związane z cyklem komórkowym, takie jak: proliferacja i wzrost komórek oraz replikacja DNA. Co więcej, zidentyfikowane geny o zróżnicowanej ekspresji zostały przypisane do takich szlaków sygnałowych jak ścieżka BMP, p53, TGF- β , NF- κ B, czy JAK-STAT.

Dalsze badania nad wpływem poszczególnych cytokin wydzielanych przez limfocyty Th1 i Th2 na fibroblasty endometrium kategorii I i IIB po 48 godz. wykazały, że IFN- γ obniżył proliferację fibroblastów pochodzących z endometrium kategorii I po 48 godz. oraz zwiększył proliferację fibroblastów pochodzących z endometrium kategorii IIB po 96 godz. Nie wykazano wpływu IFN- γ na ekspresję wybranych markerów włóknienia na poziomie genu oraz na profil transkryptomyczny fibroblastów pochodzących z endometrium klaczy. Stwierdzono natomiast wpływ IL-4 i IL-13 na właściwości fibroblastów, ekspresję wybranych genów związanych z przebudową ECM, a także na ich profil transkryptomyczny.

Interleukina 4 wykazała zróżnicowany, zależny od stopnia zaawansowania włóknienia wpływ na fibroblasty pochodzące z endometrium klaczy. Wyniki wskazują, że stymulacja IL-4 zwiększała proliferację i żywotność fibroblastów pochodzących z endometrium zarówno z kategorii I, jak i IIB, po 48 i 96 godz. od rozpoczęcia stymulacji, w porównaniu z grupami kontrolnymi. Migracja fibroblastów ulegała obniżeniu po 96 godz. w przypadku fibroblastów pochodzących z endometrium kategorii I, podczas gdy zdolność do kurczenia dysków kolagenowych pozostawała niezmieniona w przypadku fibroblastów pochodzących z endometrium obu kategorii w odpowiedzi na działanie IL-4. Analiza ekspresji genów i białek związanych z ECM ujawniła, że IL-4 wpływała na syntezę kolagenu i innych składników ECM w fibroblastach pochodzących z endometrium klaczy w sposób zależny od stopnia zaawansowania włóknienia. W fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii IIB zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu *Col1a1* po 96 godz., podczas gdy poziom ekspresji COL1 na poziomie białka był obniżony w obu kategoriach po 48 i 96 godz. stymulacji IL-4. Ekspresja COL3 na poziomie genu i białka była obniżona w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii I, natomiast w komórkach pochodzących z endometrium kategorii IIB obserwowano ich wzrost. Ponadto IL-4 modulowała ekspresję fibronektyny (FN1) oraz ACTA2, wpływając na procesy związane z różnicowaniem miofibroblastów i przebudową ECM. Stymulacja IL-4 prowadziła również do obniżenia ekspresji metaloproteinaz macierzy (MMP-2, MMP-3 i MMP-9) na poziomie genu i białka w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii I po 48 i 96 godz., podczas gdy poziom inhibitorów tych enzymów (TIMP-1 i TIMP-2) był zwiększony, co sugeruje złożony wpływ IL-4 na równowagę między degradacją a syntezą ECM. Po 48-godz. stymulacji IL-4 zidentyfikowano 1288 genów o zróżnicowanej ekspresji w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii I oraz 1187 genów o zróżnicowanej ekspresji w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii IIB. Analiza funkcjonalna tych genów wskazała na ich udział w procesach takich jak glikoliza, adhezja komórkowa, sygnalizacja receptora insulino podobnego czynnika wzrostu oraz interakcje ECM-receptor.

Stymulacja IL-13 zwiększała proliferację fibroblastów pochodzących z endometrium kategorii I i IIB po 48 i 96 godz., przy czym żywotność komórek pochodzących z endometrium z kategorii I wzrastała w obu punktach czasowych, a z kategorii IIB tylko po 48 godz. Interleukina 13 nie wpływała na migrację fibroblastów oraz na ich zdolność do kurczenia dysków kolagenowych. Wpływ IL-13 na ekspresję genów związanych z ECM różnił się w zależności od kategorii endometrium, z którego pochodziły fibroblasty. W fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii I zaobserwowano spadek ekspresji *Col1a1* na poziomie genu po 48 godz., podczas gdy w komórkach pochodzących z endometrium kategorii IIB ekspresja ta była zwiększona po 48 i 96 godz. Ekspresja COL1 na poziomie białka była obniżona w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii I i IIB odpowiednio po 48 i 96 godz. Ekspresja *Col3a1* na poziomie genu wzrastała w fibroblastach pochodzących z endometrium z kategorii IIB, natomiast w komórkach pochodzących z endometrium kategorii I obserwowano spadek ekspresji COL3 na poziomie białka. Interleukina 13 modulowała również ekspresję FN1 oraz ACTA2, wpływając na procesy włóknienia i przebudowy tkankowej. Podobnie jak IL-4, IL-13 wpływała na

poziom ekspresji MMP i TIMP. Ekspresja *MMP-2*, *MMP-3* i *MMP-9* na poziomie genu była obniżona w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii I po 48 i 96 godz. w odpowiedzi na działanie IL-13. Poziom TIMP-1 oraz TIMP-2 wzrastał w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii I i IIB. Stymulacja IL-13 skutkowała identyfikacją 471 genów o zróżnicowanej ekspresji w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii I oraz 465 w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii IIB. Funkcjonalna analiza tych genów wykazała ich zaangażowanie w organizację macierzy pozakomórkowej, odpowiedź na hipoksję, adhezję komórkową oraz szlaki sygnalizacyjne HIF-1 i PI3K-Akt.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż:

1. Brak jest zmian w poziomie limfocytów Th1 i Th2, a także wydzielanych przez nie cytokin i ich receptorów w przebiegu endometrosis.
2. Sekretom limfocytów Th1 oraz Th2 stymuluje proliferację i żywotność fibroblastów endometrium klaczy, a także reguluje ekspresję genów zaangażowanych w cykl komórkowy, odkładanie ECM oraz szlaki sygnałowe odgrywające rolę w chorobach zwłóknieniowych.
3. Interferon γ w zastosowanej dawce 10 ng/ml nie wpływa na transkryptom fibroblastów endometrium klaczy.
4. W fibroblastach klaczy pochodzących z endometrium kategorii I i IIB, IL-4 zwiększyła proliferację fibroblastów i wpłynęła na ekspresję składników ECM, jednocześnie obniżając ekspresję i aktywność MMP oraz zwiększając poziom TIMP. Ponadto, IL-4 regulowała ekspresję genów zaangażowanych w kanoniczną glikolizę, cykl komórkowy, procesy biosyntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych, adhezję komórek macierzystych i ogniskową, organizację ECM, a także szlaki sygnałowe HIF-1, PI3-K-Akt i IGFR, co sugeruje rolę IL-4 jako mediatora profibrotycznego.
5. W fibroblastach klaczy pochodzących z endometrium kategorii I i IIB, IL-13 zwiększyła proliferację fibroblastów i wpłynęła na ekspresję składników ECM, jednocześnie obniżając ekspresję i aktywność MMP oraz zwiększając poziom TIMP. Ponadto IL-13 regulowała ekspresję genów przypisanych do różnych procesów, w tym metabolizmu węgla, organizacji ECM, interakcji ECM-receptor, a także szlaków sygnałowych Wnt, HIF-1 i FoxO, co sugeruje rolę IL-13 jako mediatora profibrotycznego.
6. Odpowiedź komórek na stymulację IL-4 i IL-13 różni się w zależności od stopnia zaawansowania włóknienia endometrium.

Podsumowując, w pracy wykazano, że limfocyty Th1 i Th2, poprzez wydzielane przez nie mediatory wpływają na fibroblasty endometrium klaczy i mogą w ten sposób modulować procesy związane z rozwojem włóknienia w przebiegu endometrosis.

Wyniki badań pozwalają na lepsze zrozumienie mechanizmów endometrosis w tym, wskazują udział limfocytów Th1 i Th2 oraz ich cytokin nie tylko na regulację procesów immunologicznych, ale także na procesy związane z rozwojem włóknienia endometrium. Wyniki te wskazują potencjalne cele terapeutyczne, poprzez identyfikację docelowych genów i ścieżek sygnałowych związanych z przebudową macierzy i metabolizmem komórkowym, co może przyczynić się do powstawania terapii immunomodulujących np. poprzez modulację działania IL-4 i IL-13, co już stanowi kierunek w terapiach przeciwwłóknieniowych u ludzi. Ponadto, rozwój modeli *in vitro* do badania rozwoju endometrosis może mieć zastosowanie w medycynie rozrodu koni poprzez możliwość testowania nowych strategii terapeutycznych. Co więcej, uzyskane wyniki można wykorzystać we wskazaniu kierunku badań nad włóknieniem w innych gatunkach, w tym u ludzi.