

# Genetika i epigenetika endometrijoza

---

Šimović, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:822804>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dora Šimović**

# **Genetika i epigenetika endometrioza**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2017.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dora Šimović**

# **Genetika i epigenetika endometrioza**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2017.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ljiljane Šerman, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

## POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA

<b>5mC</b>	5-metilcitozin
<b>C</b>	citozin
<b>CA-125</b>	tumorski marker specifičan za jajnik (engl. <i>cancer antigen 125</i> )
<b>COL7A1</b>	kolagen tip 7, alfa 1 (engl. <i>collagen type VII alpha 1 chain</i> )
<b>COX-2</b>	ciklooksigenaza-2 (engl. <i>cyclooxygenase-2</i> )
<b>CXCR4</b>	CXC receptor kemokina 4 (engl. <i>CXC chemokine receptor type 4</i> )
<b>CYP19</b>	aromataza citokrom P450 (engl. <i>aromatase cytochrome P450</i> )
<b>DMA</b>	tvar koja inhibira metilaciju ili demetilirajući agens (engl. <i>demethylating agent</i> )
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferaza
<b>ECM</b>	izvanstanični matriks (engl. <i>extracellular matrix</i> )
<b>EGFR2</b>	receptor za epidermalni faktor rasta 2 (engl. <i>epidermal growth factor receptor 2</i> )
<b>ER</b>	estrogenski receptor
<b>G</b>	gvanin
<b>GnRH</b>	gonadotropin otpuštajući hormon (engl. <i>gonadotropin-releasing hormone</i> )
<b>GPER</b>	estrogenski receptor vezan uz G-protein (engl. <i>G-protein-coupled estrogen receptor</i> )
<b>HAT</b>	acetiltransferaza histona (engl. <i>histone acetyltransferase</i> )
<b>HDAC</b>	histonska deacetilaza (engl. <i>histone deacetylase</i> )
<b>HDACI</b>	inhibitor histonske deacetilaze (engl. <i>histone deacetylase inhibitor</i> )

<b>HOXA10</b>	homeobox A10
<b>MeCP</b>	metilcitozin vezujući protein (engl. <i>methyl cytosine binding protein</i> )
<b>miRNA</b>	mikroRNA
<b>mRNA</b>	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i> )
<b>NR5A1</b>	nuklearni receptor 5A1 (engl. <i>nuclear receptor subfamily 5 group A member 1</i> )
<b>PR</b>	progesteronski receptor
<b>PTEN</b>	homolog fosfataze i tenzina (engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i> )
<b>RAR <math>\beta</math></b>	beta receptori retinoične kiseline (engl. <i>retinoic acid receptor-<math>\beta</math></i> )
<b>RASSF1A</b>	tumor supresor gen (engl. <i>Ras-association domain family 1 isoform A</i> )
<b>RNA</b>	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
<b>SAHA</b>	suberoilanilid-hidroksamična kiselina (engl. <i>suberoylanilide hydroxamic acid</i> )
<b>SF-1</b>	steroidogeni faktor 1 (engl. <i>steroidogenic factor 1</i> )
<b>STAT3</b>	signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (engl. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> )
<b>TFAP2C</b>	transkripcijski faktor AP-2 gama (engl. <i>transcription factor AP-2 gamma</i> )
<b>TSA</b>	trihostatin A (engl. <i>trichostatin A</i> )
<b>UPK1B</b>	uroplakin 1B (engl. <i>uroplakin 1B</i> )
<b>UTR</b>	regija koja se ne prevodi (engl. <i>untranslated region</i> )
<b>VEGF-A</b>	vaskularni endotelni faktor rasta A (engl. <i>vascular endothelial growth factor A</i> )
<b>VPA</b>	valproična kiselina (engl. <i>valproic acid</i> )

# SADRŽAJ

SAŽETAK .....	
SUMMARY .....	
1. UVOD.....	1
1.1. ENDOMETRIOZA.....	1
1.2. EPIGENETIKA.....	3
2. EPIGENETSKE PROMJENE U ENDOMETRIOZAMA .....	5
2.1. DNA METILACIJA .....	5
2.2. OSTALE EPIGENETSKE PROMJENE .....	12
3. TERAPIJSKA PRIMJENA .....	18
4. ZAKLJUČAK .....	21
5. ZAHVALE.....	22
6. LITERATURA.....	23
7. ŽIVOTOPIS.....	30

# SAŽETAK

Genetika i epigenetika endometrioza

Dora Šimović

Endometrioza je česta ginekološka bolest koja najčešće zahvaća žene reproduktivne dobi. Definirana je nazočnošću i rastom ektopičnog endometrija koji ima histološke značajke normalnog endometrija. Točna etiologija endometrioze još uvijek nije poznata. Novija istraživanja govore u prilog utjecaju abnormalnih epigenetskih mehanizama na patogenezu endometrioze, poput DNA metilacije, sinteze malih nekodirajućih molekula RNA i modifikacije histona. DNA metilacija je jedna od najčešćih modifikacija DNA i predstavlja kovalentno vezanje metilne skupine na peti ugljikov atom citozinskog prstena na CpG dinukleotidima. Metilacija promotorske regije gena dovodi do utišavanja tog gena. MikroRNA reguliraju posttranskripcijsku gensku ekspresiju vežući se na 3' kraj mRNA regije koja se ne prevodi i dovode do smanjenja sinteze određenog proteina. Postoji barem 8 načina modifikacije histona, ali acetilacija je najviše istraživana. Na "globalnoj" razini, acetilacija histona je povezana s aktivacijom transkripcije. Uočene su varijacije u epigenetskim uzorcima gena za koje je poznato da sudjeluju u promjenama hormonskog, imunološkog i upalnog stanja endometrioze. Tako je za endometriozu tipična hipometilacija *ERβ*, gena za aromatazu i *SF-1*, te hipermetilacija promotorskih regija *PR-B*, gena koji kodiraju za inhibitore histonskih deacetilaza i *DNMT*. Usprkos tome, i dalje nije razjašnjeno predstavljaju li te molekularne promjene uzrok ili posljedicu bolesti. Cilj ovog preglednog rada je sustavno predstaviti i analizirati do sada otkivene epigenetske promjene u endometriozi jer u budućnosti ove promjene mogu predstavljati terapijske ciljeve u obliku farmakoloških lijekova koji mogu modificirati epigenetski kod.

**Ključne riječi:** epigenetika, endometrioza, DNA metilacija



## SUMMARY

Genetics and epigenetics of endometriosis

Dora Šimović

Endometriosis is a common gynecological disease which mainly affects women of reproductive age. It is defined by the presence and growth of ectopic endometrial tissue which has the histological characteristics of the normal endometrium. The precise aetiology of endometriosis remains unclear. Accumulating evidence suggests that various epigenetic aberrations may play an essential role in the pathogenesis of endometriosis, such as DNA methylation, synthesis of small non-coding RNA, and histone modification. DNA methylation is one of the most common DNA modification and it represents the covalent bonding of the methyl group to the fifth carbon atom of the cytosine in the CpG dinucleotides. Methylation of the gene promoter region leads to its suppression. MicroRNAs regulate gene expression at the posttranscriptional level by specifically binding to the 3'-untranslational region of targeted mRNA and downregulate the expression of specific proteins. At least eight patterns of histone modification have been identified, with acetylation being the most intensively studied. „Global“ histone acetylation is related to transcriptional activity. Variations in the epigenetic patterns of genes known to be involved in the aberrant hormonal, immunologic, and inflammatory status of endometriosis have been observed. Thus, hypomethylation of *ERβ*, aromatase gene and *SF-1*, and hypermethylation of *PR-B* promoter regions, coding genes for histone deacetylase inhibitors and *DNMTs* are typical for endometriosis. Nonetheless, it is still unclear whether these molecular changes are the cause or consequence of the disease. The aim of this review is to present an overview and analyze so far known epigenetic alterations in endometriosis because, in the future, these alterations may constitute therapeutic targets for pharmacological compounds able to modify the epigenetic code.

**Keywords:** epigenetics, endometriosis, DNA methylation

# 1. UVOD

## 1.1. ENDOMETRIOZA

Endometrioza je bolest opisana već 1860. godine, ali i dalje predstavlja izazov za suvremenu medicinu. Definirana je nazočnošću i rastom ektopičnog endometrija koji ima histološke značajke normalnog endometrija. Prevalencija u ženskoj populaciji reproduktivne dobi iznosi oko 5%, dok je u neplodnih žena sedam puta češća, iznosi oko 35%. Često se nalazi pri laparoskopskom pregledu zbog sindroma zdjelične boli, čak do 50%. (1) Najčešće se javlja u žena reproduktivne dobi, s vršnom incidencijom u četrdesetim godinama. Pojavnost nije vezana uz pojedine etičke ili socijalne skupine. (2)

Endometrioza je najčešći uzročnik sekundarne dismenoreje. Većinom se prezentira kao kontinuirana, nespastična bol koja se pojačava neposredno prije i tijekom menstrualnog krvarenja. Također se može javiti i dispareunija zbog prisutnosti endometrijskih lezija u Douglasovom prostoru ili jajnicima. Tipično se bol smanjuje i smiruje nakon završetka menstrualnog krvarenja, ali neke bolesnice opisuju kontinuiranu bol u donjem abdomenu koja nije povezana s menstrualnim ciklusom ili seksualnom aktivnošću. Česti simptomi endometrioze su još i: kronična zdjelična bol, bol tijekom ovulacije, ciklički ili perimenstrualni simptomi, kronični umor, bol prilikom defekacije i neplodnost. Endometrioza može biti asimptomatska. Ovisno o rjeđim lokacijama, mogu se javiti i drugi simptomi poput cikličke epistakse zbog nazalnih lezija ili glavobolje zbog endometrioze u mozgu. (3)

U dijagnostičkom postupku endometrioze nezaobilazan dio su ciljana anamneza i pregled spolnih organa. Za potvrdu dijagnoze, potrebna nam je neposredna vizualizacija endometrijskih lezija. U slučaju velikih endometrioza jajnika ili rektuma to je moguće vaginalnim ili rektalnim pregledom ultrazvukom. U drugim slučajevima temeljni dijagnostički postupak je eksplorativna laparoskopija. Ako tako nije moguće zaključiti radi li se o endometriozi, potrebno je učiniti biopsiju sumnjivih lezija i patohistološki dokazati. Pri razjašnjavanju dijagnoze od pomoći može biti serumski biljeg CA-125. U dokazanoj bolesti razine CA-125 mogu dati posrednu sliku o tijeku bolesti i rezultatima liječenja. (1)

Endometrijoza je često dijagnosticirana u žena podvrgnutim laparoskopiji zbog neplodnosti. Točna povezanost endometrijoze i neplodnosti nije poznata. Mogući mehanizmi kojima endometrijoza smanjuje plodnost su: formiranje periovarijskih i peritubularnih adhezija i destrukcija tkiva jajnika, inaktivacija spermija antitijelima ili fagocitoza spermija makrofagima, smanjena pokretljivost jajovoda zbog utjecaja prostaglandina te anovulacija. (3) Endometrijoza se klasificira klasifikacijom Američkog udruženja za plodnost koja vodi računa o zahvaćenosti peritoneuma, jajnika i jajovoda endometriozom, gustoći priraslica, dubini prodora endometrijske lezije i obliteraciji Douglasova prostora. Slučajevi s 1-5 bodova se smatraju minimalnom endometriozom, blagom 6-15, umjerenom 16-40, a jakom s više od 40 bodova. Klasifikacija je temeljena isključivo na prognozi bolesti. (1) U medikamentoznom liječenju endometrijoze koristimo gestagene, danazol, analoge GnRH te serum, antiangiogenike i modulatore ekstracelularnog matriksa. Također je moguće kirurško liječenje laparoskopski ili laparotomijom, te kombinirano liječenje (preoperativno ili postoperativno medikamentno). (1)

Točna etiologija endometrijoze je i dalje nepoznata. Postoji nekoliko teorija, a najbolje je prihvaćena Sampsonova implantacijska teorija koja nastanak endometrijoze tumači retrogradnim refluksom krvi i endometrijskih čestica kroz jajovod tijekom menstruacije. Laparoskopski je otkriveno da u više od 90% žena dolazi do pojave refluksa menstruacijske krvi u trbušnu šupljinu. Kako se endometrijoza javlja i u žena s kongenitalno opstruiranim jajovodima, Sampsonova teorija ne može biti jedino objašnjenje nastanka endometrijoze. Meyer predlaže da je endometrijoza rezultat metaplazije celomnog epitela zdjeličnog peritoneuma. Njegova teorija može objasniti prisutnost endometrijoze u skoro svim udaljenim mjestima od maternice, ali se to također može objasniti i venskom ili limfatičkom mikroembolijom. Zbog pojave endometrijoze u samo nekih žena, moguće je da postoje genetske ili imunološke predispozicije koje uzrokuju te varijacije. Potvrda za to je veća vjerojatnost oboljevanja krvnih srodnica bolesnica od endometrijoze. (3) Dosadašnja istraživanja govore u prilog multifaktorijskom mehanizmu nastanka endometrijoze, odnosno o brojnim genetskim, hormonskim, biokemijskim i imunološkim faktorima koji pridonose njezinu razvoju. (4) Također, abnormalne epigenetske modifikacije u endometriju žena su nedavno uvrštene u patogenezu endometrijoze. (5)

## 1.2. EPIGENETIKA

Genetika i istraživanja stanica su detaljno otkrili od čega su sastavljene stanice naših tijela, ali još uvijek nisu uspjeli objasniti raznosvrtnost u morfologiji i funkciji koja proizlazi iz istog genetskog materijala. Za razliku od genomike koja se temelji na proučavanju građe anatomije gena, epigenomika se temelji na izučavanju nasljednih varijacija u aktivnosti gena, dakle njihovoj fiziologiji. (6)

Riječ epigenetika je nastala kao spoj grčke riječi „epi“, koja znači iznad ili preko, i riječi „genetika“, ili znanost o nasljeđivanju. Epigenetika se može shvatiti kao mehanizmi koji iniciraju i održavaju nasljedne obrasce genske ekspresije i nasljeđene funkcije gena bez mijenjanja genomske sekvence. Također se može shvatiti kao međusobno djelovanje okoliša i genetike. (7)

U kontekstu molekularne biologije, epigenetika je definirana kao proučavanje mitotičkih i/ili mejotičkih nasljednih promjena u funkciji gena koje se ne mogu objasniti promjenama u DNA sekvenci, ali su važne za razumijevanje razvojnog procesa i fenotipskih svojstava organizma. Međutim, pojam epigenetika je nastao u drugačijem kontekstu. Sama riječ znači „izvan konvencionalne genetike“, a njezin tvorac je razvojni biolog Conrad Hal Waddington. (8)

Rođen 1905. godine u Eveshamu, Engleskoj, Waddington je od 1947. godine osnovao i vodio odjel za genetiku u Institutu u Edinburghu. Odjel je postao vrlo uspješan i jedan od najvećih genetskih odjela na svijetu, te se 1965. godine osnovala Epigenetska istraživačka grupa na čelu s Waddingtonom. Za razliku od mnogih drugih embriologa tog vremena, Waddington je uz to što je bio cijenjeni embriolog, bio i jedna od rijetkih osoba koja je bila svjesna značaja genetike u razvoju, odnosno značaja aktivnosti materijala jezgre (gena) za događanja u citoplazmi. Spajanjem riječi epigeneza i genetika dobio je riječ epigenetika, neologizam koji naglašava ovisnost o genetikama. Waddington je smatrao razvoj kao epigenetski proces. U svakom slučaju, prihvaćao je da je fenotip rezultat međusobnih odnosa genetskih procesa, njihovih potencijala i ograničenja, citoplazmatskih diferencijacija i okolišnih utjecaja.

Waddington zatim proširuje klasičnu viziju genetike na fenotip uključivši epigenotip, odnosno genetske i negenetske razvojne interakcije koje organiziraju organske tvari i tkiva. Waddingtonova epigenetika je proizašla iz embriološke ere gdje geni nisu imali

strogu definiciju i mogli su se široko interpretirati. Ali Waddington je definirao gene kao sekvence DNA i time epigenetiku učinio potrebnom jer označava interakciju gena s njihovim okolišem što proizvodi fenotip. Preminuo je 1975. godine, a pojam epigenetika je vremenom postao vrlo popularan. Riječ se počela obilno koristiti od 1990-ih godina nadalje. (9)

I danas je teško pronaći jednu definiciju epigenetike. U prilog tome nam govore mnoge definicije koje možemo uzeti kao primjer. Tako je 2007. godine Adrian Bird iz Sveučilišta u Edinburghu predložio definiciju: strukturna prilagodba kromosomske regije tako da se registriraju, signaliziraju i zabilježe izmjenjena stanja aktivnosti. Često se koristi i „tradicionalna“ definicija: promjena u stanju ekspresije gena koja ne uzrokuje mutaciju, ali je nastala u nedostatku signala ili događaja koji je inicirao promijenu. (10)

Postoje tri najvažnija epigenetska mehanizma: metilacija molekule DNA, uspostavljanje kovalentnih posttranslacijskih promjena histona (metilacija, acetilacija, fosforilacija, sumoilacija) i utišavanje gena ovisno o malim molekulama RNA. Sva tri epigenetska mehanizma su usko povezana u uspostavljanju vlastite epigenomske mreže signala unutar koje se međusobno nadopunjuju i upravljaju važnim procesima u stanici. Vrlo su važni i u odgovoru stanice na djelovanje mutagena iz okoline. (6)

Ovim radom ćemo objasniti važnost epigenetskih mehanizama u razvoju endometrioze.

## 2. EPIGENETSKE PROMJENE U ENDOMETRIOZAMA

### 2.1. DNA METILACIJA

DNA metilacija je jedna od najčešćih modifikacija DNA i jedna od epigenetskih mehanizama. U eukariota predstavlja kovalentno vezanje metilne skupine na peti ugljikov atom citozinskog prstena, odnosno nastajanje nove baze 5-metilcitozina (5mC). Reakcija je katalizirana enzimom DNA metiltransferaza (DNMT) na 5'-CG-3' sekvencama koje se još nazivaju i CpG dinukletidi, odnosno CpG mjesto (gdje p označava fosfatnu skupinu). To znači da se 5mC nalazi samo u sekvenci DNA gdje iza C slijedi G. (11)

Metilaciju novih područja, odnosno *de novo* DNA metilaciju omogućuju dva enzima: DNMT3A i DNMT3B, a održava se tijekom mitoze pomoću enzima DNMT1. DNMT1 je primarno enzim s visokim afinitetom za hemimetiliranu DNA s glavnom ulogom prijenosa uspostavljenog obrasca metilacije tijekom replikacije. Sljedeći član DNMT3 obitelji, DNMT3L, nema katalitičku aktivnost, ali može aktivirati DNMT3A kako bi uspostavio alel-specifičnu metilaciju u upisanim regijama genoma. (12)

Tijekom evolucije se CpG dinukleotidi gube, a najveću ulogu u tome ima metilacija citozina. Nastaje 5mC koji spontano deaminira i postaje timin. U većini slučajeva se pogreška ne prepoznaje i rezultira gubitkom CpG dinukleotida. Otprilike polovica svih gena čovjeka i miša sadrži CpG otočiće (40 000 - 50 000 gena). (13) To su područja dulja od 500 parova baza koja posjeduju više od 55% nukleotida s CpG dinukleotidima. Ona su uglavnom nemetilirana u normalnoj, zdravo stanici. Iznimke su promotori utisnutih (od engl. *genomic imprinting*) gena, područja X kromosoma vezano uz njegovu nasumičnu inaktivaciju i područja transpozona. (14)

Općenito, kada su određeni citozini u CpG otočićima lokalizirani u promotorskoj regiji gena metilirani, metilacija će dovesti do utišavanja tog gena; takav CpG otočić se naziva hipermetiliranim. Suprotno tome, kada su određeni citozini u CpG otočićima lokalizirani u promotorskoj regiji gena nemetilirani, taj gen neće biti utišan; u tom slučaju se takav CpG otočić naziva hipometiliranim. (15) Metilacija promotorske regije sprječava vezivanje transkripcijskih faktora i RNA polimeraze jer se metilirani citozini vežu za protein poznat kao metilcitozin vezujući protein (MeCP, od engl. *methyl*

*cytosine binding protein*). Aktivirajući transkripcijski faktori normalno prepoznaju promotorsku regiju, ali njenom metilacijom dolazi do inhibicije transkripcije. (16)

Genetske analize različitih DNMT-a su ustanovile kako je DNA metilacija neophodna za razvoj kralježnjaka. Gubitak metilacije uzrokuje apoptozu embrija i fibroblasta, ali ne i u embrionalnih matičnih stanica ili stanica raka čovjeka. (14) U stanicama raka, metilacija CpG otočića doprinosi utišavanju gena. Tako su istraživanja nasumičnih *de novo* metilacija CpG otočića beta receptora retinoične kiseline (RAR  $\beta$ ) doveli do proteinske fuzije koja je povezana s razvojem leukemije u ljudi. (17)

U zadnjih deset godina, nekoliko istraživanja na endometrijskim lezijama i endometriju žena koje boluju od endometrioze pokazala su abnormalnu metilaciju u odabranim genima, poput steroidogenog faktora 1 (*SF-1*), progesteronskog receptora B (*PR-B*), estrogenskog receptora  $\beta$  (*ER $\beta$* ), *HOXA10*, *HOXA11*, *COX-2*, aromataze i drugih. (18) Tipično za endometrioze je hipometilacija *ER $\beta$* , aromataze i *SF-1*, te hipermetilacija promotorskih regija *PR-B*, inhibitora deacetilaze histona i *DNMT*. (19)

Metilacija DNA se primarno proučava na razini transkripcije gena i iznimno je važna u razvojnoj biologiji, ali i za patofiziologiju bolesti, poput endometrioze. Vjerojatno najvažniji dokaz koji pokazuje da je endometrioza bolest u kojoj epigenetika ima važnu ulogu u patogenezi dolazi iz istraživanja koja pokazuju da geni *DNMT1*, *DNMT3A* i *DNMT3B*, koji kodiraju za DNA metiltransferaze, imaju izraženiju ekspresiju u epitelnoj komponenti endometrijskih lezija u usporedbi s normalnom kontrolom ili eutopičnim endometrijem u žena s endometriozom. Također, ekspresijske razine proteina *DNMT1*, *DNMT3A* i *DNMT3B* su pokazale međusobnu pozitivnu koleraciju. (20) Ekspresija DNMT-a u endometrijskom tkivu je potvrđena u žena s endometriozom samo za *DNMT3A*, ali ne i za *DNMT1* i *DNMT3B* enzim. (21) Međutim, druga istraživanja pokazuju značajno niže ekspresijske razine *DNMT1* i *DNMT3B* u ektopičnom endometriju nego u kontrolnom endometriju. (22) Mogući razlozi nepodudaranosti rezultata je korištenje različitih populacija ili korištenje izoliranih endometrijskih epitelnih stanica u jednom istraživanju (20), a tkivnih kultura u drugom. (22)

Bez obzira na rezultate, sva istraživanja ukazuju na abnormalnu ekspresiju DNMT-a u endometrijskom tkivu. Tako je, na primjer, inducirana hipoksija izazvala globalnu hipometilaciju u ektopičnim stromalnim stanicama kroz destabilizaciju mRNA za

DNMT1 ukazujući na interakciju gena i okoliša koja se ostvaruje putem DNA metilacije. (23) Uočeno je da u zdravim stromalnim stanicama endometrija kao odgovor na *in vitro* decidualizaciju dolazi do smanjenja ekspresije DNMT3B, dok je ekspresija u endometrijskim stanicama nepromijenjena. Ta pojava se može objasniti promijenjenim epigenetskim statusom. Naime, smanjena ekspresija je povezana sa smanjenim zauzimanjem okolnih regija DNMT3B-om, koje su različito metilirane u endometrijskim stanicama. (24)

Jedan od prvih dokaza da bi endometrioza mogla biti bolest povezana s epigenetikom dolazi iz istraživanja koje je uočilo hipermetilaciju promotora *HOXA10* u endometriju žena s endometriozom u usporedbi s vrijednostima u žena bez endometrioze. (25) *HOXA10* je član skupine homeobox gena koji djeluju kao transkripcijski faktori izraženi u endometriju. Tamo su nužni za rast endometrija, diferencijaciju i implantaciju. Njihova ekspresija je regulirana estrogenom i progesteronom te se znatno povećava tijekom sredine sekretorne faze koja odgovara prozoru implantacije. (26) Zbog toga se smatra kako bi transkripcijski faktor *HOXA10* mogao imati esencijalnu ulogu kako u regulaciji razvoja endometrija tijekom menstrualnog ciklusa tako i u uspostavi uvjeta potrebnih za implantaciju. U slučaju uspješne implantacije, povećanje razine *HOXA10* nastavlja se zahvaljujući povećanoj transkripciji u nastalim decidua stanicama tijekom rane trudnoće. I estrogen i progesteron individualno stimuliraju ekspresiju gena *HOXA10*, a progesteron ima još i dodatne stimulacijske učinke. (27)

Ekspresija gena *HOXA10* je u endometriju žena s endometriozom značajno smanjena. (28) Kako je općenito hipermetilacija promotora povezana s utišavanjem gena, uočena hipermetilacija pruža moguće objašnjenje toj smanjenoj ekspresiji gena *HOXA10*. (25) Potvrđeno je kako DNA hipermetilacija i utišavanje ekspresije *HOXA10* u endometriju tijekom sredine sekretorne faze mogu biti jedan od potencijalnih mehanizama povezanih s neplodnošću žena s endometriozom. (29)

Istovremena pojava hipermetilacije promotora gena *HOXA10* te posljedično njegova smanjena ekspresija dokazana je i u induciranoj endometriozici pavijana i miševa. (30,31) Također, u istraživanju na ženskim miševima prenatalno izloženim dietilstilbestrolu uočena je hipermetilacija *HOXA10* zajedno s pretjeranom ekspresijom *DNMT1* i *DNMT3B*. (32)



Iako različita istraživanja pronalaze hipermetilaciju promotora gena *HOXA10* u endometriozu, u analizi metilacije genoma su epigenetske alteracije *HOXA10* gena stavljene ispod proizvoljnog praga autora, odnosno epigenetske promjene ostalih gena smatraju važnijima u patofiziologiji endometrioze. (33)

Ljudski endometrij je unutarnji sloj maternice građen od epitelnih stanica, stromalnih stanica, stanica imunskog sustava i krvožilnih stanica koje su pod utjecajem steroidnih hormona jajnika: estrogena (uglavnom  $17\beta$ -estradiol) i progesterona. Oba hormona ostvaruju svoju funkciju vežući se za svoje intracelularne receptore, estrogenski receptor (ER) i progesteronski receptor (PR), koji pripadaju skupini steroidnih (nuklearnih) receptora. Svaki hormon regulira ekspresiju stotina gena tijekom različitih faza menstrualnog ciklusa. Ektopični endometrij je karakteriziran neravnotežom u funkciji tih hormona, odnosno dominacijom estrogena i rezistentnošću na progesteron. (34)

Odgovor tkiva maternice na progesteron ovisi o PR-u. Dvije dominantne izoforme PR-a, PR-A i PR-B, su kodirane istim *PR* genom, ali koriste različite promotore i mjesta početka translacije. (35) Postoje i dva subtipa ER-a, ER $\alpha$  i ER $\beta$ , čija se ekspresija preklapa kako u vrsti tkiva tako i u tkivnoj lokalizaciji. Estradiol ulazi u stanicu i veže se za ER i u ektopičnim i u ektopičnim endometrijskim stanicama. (36) ER $\beta$  posjeduje sposobnost reguliranja ER $\alpha$ . Iako se čini kako je ER $\alpha$  primarni posrednik estrogenskog djelovanja, povišene razine ER $\beta$  i povećani omjer ER $\beta$ /ER $\alpha$  u endometriozu je povezan sa smanjenim razinama PR, što doprinosi progesteronskoj rezistentnosti uočenoj u endometriozu. (34)

Mogući razlog progesteronske rezistentnosti je smanjena ekspresija PR-B u endometriozu. (37) Do smanjene ekspresije najvjerojatnije dolazi zbog hipermetilacije promotora gena za PR-B što nalazimo u endometriozu. (38) Također, uočeno je da je promotor za ER $\beta$  hipometiliran u endometrijskim stanicama, što dovodi do njegove pojačane ekspresije. (39)

Još jedan član skupine nuklearnih receptora, protein SF-1, pokazuje različit stupanj metilacije u endometriozu. SF-1 je transkripcijski faktor nužan za biosintezu steroida. Kodiran je genom *NR5A1* (od engl. *nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*). U normalnim stromalnim stanicama endometrija ne nalazimo njegovu ekspresiju dok je pojačano izražen u stanicama strome endometrija.

2007. godine je u stanicama endometrija, gdje je transkripcijska aktivnost SF-1 potpuno potisnuta, uočena hipermetilacija promotora i egzona 1 gena *NR5A1*. S druge strane, endometriotske stanice su pokazale povišenu razinu mRNA za SF-1 te posljedično SF-1 proteina što je bilo povezano sa smanjenom DNA metilacijom njegovog promotora. (40) Time je pokazano da metilacija proksimalnog promotora gena *NR5A1* regulira ekspresiju transkripcijskog faktora SF-1 kako u tkivu endometrioza tako i u normalnom endometriju. Nekoliko godina kasnije, uočeno je da hipermetilacija CpG otočića koji se nalaze između egzona 2 i introna 3 gena *SF-1* aktivira pojačanu transkripciju te povećanu količinu mRNA u endometriotskim stanicama. (41) U sličnom istraživanju je pokazano kako je hipermetilacija CpG otočića koji se nalaze nizvodno od introna 1 gena *SF-1* povezana s većom ekspresijom tog gena. (42)

Iako se ti rezultati ne poklapaju s klasičnom teorijom utjecaja metilacije na ekspresiju gena, poklapa se s indikacijama da metilacija izvan promotora gena dovodi do povećane ekspresije gena. (43)

U sintezi biološki aktivnog estrogena, estradiola, zadnji i ključni korak katalizira enzim aromataza. U ljudi samo jedan gen, *CYP19* (od engl. *aromatase cytochrome P450*), kodira aromatazu. Taj gen je karakterističan po tome što se sastoji od 9 egzona koji su okruženi s jedinstvenim promotorima. (44) Tkivno specifična ekspresija aromataze je regulirana alternativnom uporabom tih egzona. Pokazalo se da endometriotske stanice upotrebljavaju iste promotore aromataze kao i stanice endometrija; promotore II, I.3 i I.6. U istom istraživanju, endometrijske stanice, koje normalno ne pokazuju ekspresiju aromataze, su tretirane s demetilacijskim agentom 5-aza-deoksicitidinom, što je dramatično povećalo ekspresiju mRNA za aromatazu. Time se potvrdila uloga epigenetskih mehanizama na ekspresiju aromataza gena u endometriotskim stanicama. (45) Daljnjim istraživanjima otkrivena je CpG demetilacija unutar ne-promotorskih-CpG otočića gena za aromatazu endometriotskih stanica, dok je ista regija jako metilirana i povezana s MeCP u endometrijskim stanicama. Tako je povećana ekspresija gena za aromatazu u endometriozi objašnjena epigenetskim poremećajem, odnosno DNA hipometilacijom na području ne-promotora-CpG otočića. (46)

U endometrijskim stanicama uznapredovalog stadija bolesti je smanjena prisutnost intracelularnog adhezijskog proteina E-katherina. To je antiproliferacijski protein koji se nalazi u epitelnim stanicama tumora, a njegova poremećena regulacija je povezana s invazivnošću endometrijskih stanica. (47) U dvije besmrtno endometrijske stanične linije pronađena je hipermetilacija promotora gena za E-katherin, a tretman s trihostatinom A (TSA, od engl. *trichostatin A*), inhibitorom histonske deacetilaze, inducirao je njegovu ekspresiju te istodobno smanjio invaziju stanica. (48) Ta pojava ukazuje na to da je ekspresija gena za E-katherin utišana metilacijom DNA što se povezuje s pojačanom invazivnošću.

Pokazano je da ulogu u razvijanju endometrioze ima i abnormalna ekspresija gena COX-2 (od engl. *cyclooxygenase-2*). COX-2 je enzim koji katalizira sintezu prostaglandina iz arahidonske kiseline. Njegova povećana ekspresija je pronađena u stromalnim stanicama eutopičnog endometrija pacijentica s dubokom endometriozom, te se povezuje s nastankom dismenoreje u endometriozu. (49) Također je pronađena i povezanost ekspresije COX-2 i jačine nemenstrualne kronične zdjelice boli. (50) DNA hipometilacija NF-IL6 dijela unutar promotora gena COX-2 bi mogla biti jedan od uzroka njegove povećane ekspresije u eutopičnom endometriju kod endometrioze. (51).

Novija istraživanja pokazuju kako je ekspresija proteina RASSF1A (od engl. *Ras-association domain family 1 isoform A*) u ektopičnom i eutopičnom endometrijskom tkivu značajno smanjena nego u normalnom endometriju. RASSF1A je tumor supresor gen koji se nalazi na kromosomu 3p21.3. Visoka frekvencija hipermetilacije promotora gena RASSF1A doprinosi gubitku ili nedostatku ekspresije proteina u endometriozu. Ti rezultati ukazuju da je hipermetilacija CpG otočića RASSF1A uključena u patogenezu endometrioze. (52)

Iako su nam mnoga istraživanja u kojima su se koristile napredne molekularne tehnike omogućila daljnje razjašnjenje moguće povezanosti DNA metilacije s promijenjenima ekspresijama gena, i dalje ostaje otvoreno pitanje predstavljaju li te molekularne promjene uzrok ili posljedicu bolesti. Sve dok se ne odgovori na to pitanje, endometrioza ostaje idealan model za daljnja istraživanja. (43)

Tablica 1. Geni regulirani DNA metilacijom u endometriozima

<b>Kratice gena</b>	<b>Puno ime gena</b>	<b>Metilacija DNA</b>	<b>(Ref.)</b>
<b>HOXA10</b>	Homeobox A10	Hipermetilacija u stanicama endometrija žena s endometriozi	(25)
<b>PR-B</b>	Progesteronski receptor-B	Hipermetilacija u endometrijskim stanicama	(38)
<b>ER<math>\beta</math></b>	Estrogenski receptor $\beta$	Hipometilacija u endometrijskim stanicama	(39)
<b>SF-1</b>	Steroidogeni faktor 1	Hipometilacija u endometrijskim stanicama Hipermetilacija u endometrijskim stanicama	(40) (41,42)
<b>CYP19</b>	Aromataza citokrom P450	Hipometilacija u endometrijskim stanicama i hipermetilacija u stanicama endometrija žena s endometriozi	(46)
<b>E-katherin</b>	E-katherin	Hipermetilacija u staničnim linijama endometrijskih stanica	(48)
<b>COX-2</b>	Ciklooksigenaza-2	Hipometilacija u stanicama endometrija žena s endometriozi	(51)
<b>RASSF1A</b>	engl. <i>Ras-association domain family 1 isoform A</i>	Hipermetilacija u endometrijskim stanicama	(52)

## 2.2. OSTALE EPIGENETSKE PROMJENE

Pretpostavlja se da i mikroRNA (miRNA) imaju određenu ulogu u patogenezi endometrioze. To su male, nekodirajuće, 16-29 nukleotida duge jednolančane molekule. Reguliraju posttranskripcijsku gensku ekspresiju vežući se na 3' kraj mRNA regije koja se ne prevodi (UTR, od engl. *untranslated region*). Time dolazi do smanjenja produkcije određenog proteina zbog degradacije mRNA ili zbog inhibicije translacije. U nekim slučajevima djeluju oba mehanizma. Također, miRNA može direktno utjecati na DNMT ili potaknuti modifikaciju histona i time djelovati na epigenom. MiRNA sudjeluju u raznim biološkim procesima, poput stanične proliferacije, diferencijacije, razvoja i apoptoze. To nas upućuje na zaključak da su miRNA ključni regulatorni faktori važni kako za zdravlje tako i za razvoj bolesti poput endometrioze. (53)

Proučavanje povezanosti miRNA i endometrioze je započelo prije 10-ak godina. Jedno od prvih istraživanja provelo se 2009. godine, a uspoređivala se ekspresija miRNA između ektopičnog i eutopičkog endometrija. Pronađeno je 14 miRNA s povišenom ekspresijom (miR-145, miR-143, miR-99a, miR-99b, miR-126, miR-100, miR-125b, miR-150, miR-125a, miR-223, miR-194, miR-365, miR-29c and miR-1) i 8 sa smanjenom (miR-200a, miR-141, miR-200b, miR-142-3p, miR-424, miR-34c, miR-20a and miR-196b). Zatim je identificirano 3 851 ciljnih mRNA, od kojih je 673 imalo abnormalnu ekspresiju u ektopičnom endometriju u usporedbi s eutopičnim. Ta abnormalna ekspresija potencijalno utječe na signalizaciju putem c-Jun proteina, CERB-vezujućeg proteina, protein kinaze B i ciklina D1, a svi navedeni signalni putevi su prethodno već bili povezani s patogeneom endometrioze. (54)

Slično istraživanje je provedeno godinu dana kasnije (55), ali se istraživalo tkivo dobiveno tijekom proliferativne faze menstrualnog ciklusa. Pronađeno je 50 miRNA s različitom ekspresijom između ektopičnog i eutopičkog endometrija. Pretpostavlja se da su povezana s promjenama u nekoliko patofizioloških puteva uočenih u endometriozu, poput citokina, enzima, faktora rasta, receptora i regulatora transkripcije. Među miRNA s povišenom ekspresijom, 6 ih je zajedničko s prethodnim istraživanjem (54): miR-145, miR-143, miR-99a, miR-126, miR-100 i miR-29c. Međutim, još uvijek ostaje pitanje utjecaja faze menstrualnog ciklusa na njihovu ekspresiju.

Mnoge iste miRNA su ponovno uočene u istraživanju 2011. godine (56). U istom istraživanju je uočeno kako miR-29c ima najvišu razliku ekspresije između tkiva.

Također, pronađeno je kako u stanicama koje imaju povišenu ekspresiju miR-29c imaju smanjenu ekspresiju gena *COL7A1* (od engl. *collagen type VII alpha 1 chain*), *UPK1B* (od engl. *uropod 1*) i *TFAP2C* (od engl. *transcription factor AP-2 gamma*) koji kodiraju za proteine izvanstaničnog matriksa (ECM, od engl. *extracellular matrix*) te je potvrđeno izravno djelovanje na 3'-UTR gena. Dakle, čini se kako pogrešna ekspresija miR-29c u endometrioma funkcionalno pridonosi abnormalnoj ekspresiji ECM proteina povezanih s tom bolešću.

U jednom od prvih istraživanja u kojem se uspoređivao endometrija žena s endometriozom i endometrija žena bez endometrioze (kontrolni endometrija) pronađena je smanjena ekspresija dvije miRNA obitelji: miR-9 i miR-34. MiR-9 djeluje na gen *BCL2*, koji kodira za istoimeni antiapoptotični protein. Protein BCL2 jače je izražen u endometriju žena s endometriozom. Smanjena ekspresija miR-34 vjerojatno ima ulogu u održavanju proliferacije. (57)

U usporedbi s kontrolnim endometrijom, u stanicama endometrija žena koje boluju od endometrioze pronađena je smanjena ekspresija miR-202-3p, miR-424-5p i miR-556-3p. Smanjena ekspresija tih miRNA je povezana s povišenim razinama vaskularnog endotelnog faktora rasta A (VEGF-A, od engl. *vascular endothelial growth factor*) u istom endometriju. Nasuprot tome, u ovarijskom endometriju je pronađena povišena ekspresija miR-202-3p što se može povezati s niskom angiogenezom i smanjenom invazivnošću toga tkiva. (58)

Primjer miRNA s povišenom ekspresijom u endometrijskim lezijama je miR-210. Aktivacijom signalnog transduktora i aktivatora transkripcije 3 (STAT3, od engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) potiču se važne stanične reakcije u endometrijskim lezijama, uključujući proliferaciju, angiogenezu i otpornost na apoptozu. Osim toga, pokazano je da miR-210 potiče normalne stanice endometrija na diferencijaciju u endometrijske stanice i to najvjerojatnije putem epigenetskih mehanizama. (59)

U jednom od nedavnih istraživanja proučavale su se razlike između endometrijskih lezija i kontrolnog endometrija. U endometrijskim lezijama je pronađena značajno viša ekspresija 7 miRNA i niža ekspresija 10 miRNA. 2 miRNA s višom ekspresijom (miR-106-5p i miR-16-5p) te 6 s nižom (miR-126, miR-146a-5p, miR-15a-5p, miR-19b-1-5p, miR-200b i miR-200c) vjerojatno imaju ulogu u regulaciji

angiogeneze. Ekspresija VEGF-A je povišena, dok su ekspresije receptora za epidermalni faktor rasta 2 (EGFR2, od engl. *epidermal growth factor receptor 2*), homologa fosfataze i tenzina (PTEN, od engl. *phosphatase and tensin homolog*) i CXC receptora kemokina 4 (CXCR4, od engl. *CXC chemokine receptor type 4*) smanjene u lezijama u usporedbi s kontrolnim endometrijem. Zaključeno je kako različita ekspresija miRNA vjerojatno modulira ekspresiju VEGF-A, EGFR2, PTEN i/ili CXCR4 i time doprinosi patogenezi endometrioze. (60)

Pokazano je da miRNA modulira ključne komponente bioloških putova vrlo važnih za patofiziologiju endometrioze, uključujući staničnu proliferaciju, invaziju i angiogenezu. Unatoč podudaranju rezultata istraživanja ekspresije miRNA u većem broju radova, postoje i neslaganja ili odstupanja među nekima. Ta odstupanja se mogu objasniti razlikama u skupinama ispitanika i tipovima uzoraka. (61)

Treći epigenetski mehanizam, koji također ima ulogu u patogenezi endometrioze, je modifikacija histona. Identificirano je barem 8 načina modifikacije histona, ali acetilacija i metilacija su najviše istraživane i opisane. Acetiltransferaza histona (HAT, od engl. *histone acetyltransferase*) i deacetilaza histona (HDAC, od engl. *histone deacetylase*) su enzimi koji acetiliraju ili deacetiliraju lizinske ostatke histonskih proteina. Deacetilacija histona dovodi do „zgušnjavanja“ kompleksa DNA-histon. Dolazi do stvaranja fizičke zapreke zbog koje se čimbenici transkripcije ne mogu vezati za ciljno mjesto na promotoru gena što rezultira utišavanju gena. Deacetilacija histona je praćena aktivacijom DNA-metilaza što dovodi do hipermetilacije promotora gena. Suprotno tome, acetilacija sprječava metilaciju DNA. Znači, na „globalnoj“ razini, acetilacija histona je povezana s aktivacijom transkripcije. (6)

Još uvijek nije poznata točna modifikacija histona u endometriotskom tkivu. Tako je u jednom istraživanju pronađena globalna hipoacetilacija histona H4 u ektopičnom i eutopičnom endometriju u usporedbi s kontrolnim endometrijem. (62) Samo godinu dana kasnije, u endometriotskim lezijama je pronađena globalna hipoacetilacija H3 histona, ali ne i H4, u usporedbi s kontrolnim endometrijem. (63) Ti rezultati ukazuju na prisutnost abnormalnih modifikacija histona u endometriozu koje dovode do promjena ekspresije gena povezanih s endometriozom.

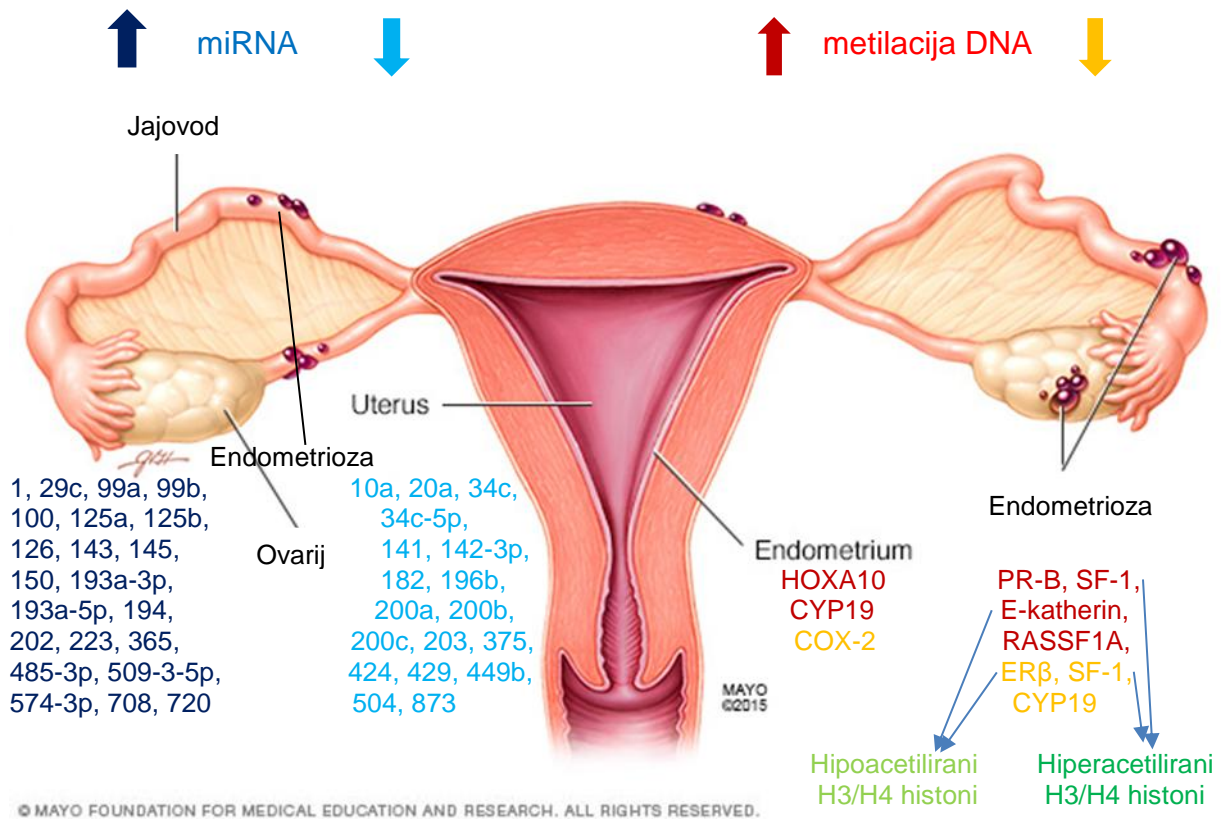
U endometriozu je pronađena povišena ekspresija HDAC-1, dok je ekspresija HDAC-2 i HDAC-3 podjednaka kao u kontrolnom endometriju. Također je uočena značajna koleracija između HDAC-1 i ER $\alpha$ /ER $\beta$  i PR. Time se sugeriralo kako klasa I enzima HDAC, HDAC-1 sudjeluje u epigenetskoj regulaciji endometrioze. (64) Međutim, u drugom istraživanju je pronađena smanjena ekspresija mRNA HDAC-1, a mRNA HDAC-2 povišene u eutopičnom endometriju. (62) Razlike u ovim pronalascima se mogu objasniti korištenjem različitih eksperimentalnih metoda u svakom istraživanju.

U promotorima nekih gena povezanih s endometriozom, poput *HOXA10*, *ER $\alpha$* , *SF-1*, te gena za E-katherin, pronađena je abnormalna acetilacija histona H3 i H4. Uspoređujući s kontrolnim endometrijem, u endometriotskim lezijama je uočena hipoacetilacija histona H3/H4 unutar promotorske regije gena za ER $\alpha$ , *HOXA10*, te E-katherin. Promotorska regija gena *SF-1* ima povišenu razinu acetilacije H3 i H4 u endometriotskim lezijama, što se poklapa s njegovom povišenom ekspresijom u istim lezijama. (63) Svi ti rezultati nam pružaju novi pogled na epigenetsku patogenezu endometrioze i ističu važnost drugih epigenetskih mehanizama, osim DNA metilacije.



Tablica 2. Ekspresija miRNA ovisno o tipu tkiva

<b>TKIVA</b>	<b>POVIŠENA EKSPRESIJA</b>	<b>SMANJENA EKSPRESIJA</b>	<b>(Ref.)</b>
<b>Ektopični i eutopični endometriji</b>	miR-145, miR-143, miR-99a, miR-99b, miR-126, miR-100, miR-125b, miR-150, miR-125a, miR-223, miR-194, miR-365, miR-29c, miR-1	miR-200a, miR-141, miR-200b, miR-142-3p, miR-424, miR-34c, miR-20a, miR-196b	(54)
<b>Ektopični i eutopični endometriji</b>	miR-202	miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-182	(55)
<b>Ektopični i eutopični endometriji</b>	miR-202, miR-193a-3p, miR-29c, miR-708, miR-509-3-5p, miR-574-3p, miR-193a-5p, miR-485-3p, miR-100, miR-720	miR-504, miR-141, miR-429, miR-203, miR-10a, miR-200b, miR-873, miR-200c, miR-200a, miR-449b, miR-375, miR-34c-5p	(56)
<b>Eutopični i kontrolni endometriji</b>		miR-9, miR-9*, miR-34b*, miR-34c-5p, miR-34c-3p	(57)
<b>Eutopični i kontrolni endometriji</b>		miR-202-3p, miR-424-5p, miR-449b-3p, miR-556-3p	(58)
<b>Ektopični i kontrolni endometriji</b>		miR-449b-3p, miR-556-3p	
<b>Ektopični, eutopični i kontrolni endometriji</b>	miR-29c-3p, miR-138-5p, miR-202-3p		
<b>Ektopični i kontrolni endometriji</b>	miR-16-5p, miR-106b-5p, miR-145-5p	miR-200b, miR-15a-5p, miR-19b-1-5p, miR-146a-5p, miR-200c	(60)



Slika 1. Shematski prikaz epigenetskih mehanizama koji sudjeluju u endometrijozi (preuređeno prema: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/endometriosis/home/ovc-20236421>) (65)

### 3. TERAPIJSKA PRIMJENA

Liječenje endometrioze može biti medikamentozno, kirurško ili kombinirano. (1) Ipak, kako bi se znatnije poboljšala klinička slika i ishod bolesti, potrebni su novi terapijski pristupi.

Epigenetski mehanizmi su nasljedni, dinamični i reverzibilni načini modulacije genske ekspresije. Reverzibilnost je važna karakteristika epigenetskih promjena jer nam otvara mogućnost potrage za odgovarajućim farmakološkim terapijama, odnosno epigenetskim lijekovima, kojima bi se potencijalno mogao promijeniti epigenetski status zahvaćenog tkiva. Trenutačno je u proizvodnji mnoštvo epigenetskih lijekova čiji je cilj regulacija DNA metilacije i modifikacije histona u ciljnim stanicama. Njihovo djelovanje temelji se na specifičnim svojstvima različitih kemijskih sredstava koja utječu na aktivnost enzima uključenih u uspostavljanje i održavanje epigenetskih obilježja. Ciljani enzimi epigenetskih lijekova su DNMT, HDAC, HAT, metiltransferaza histona i demetilaza histona. (66)

Među njima, najviše su istraživani inhibitori DNMT. Postoje dvije klase DNA demetilirajućih agenata (DMA, od engl. *demethylating agent*): nukleozidni i ne-nukleozidni inhibitori DNMT. Oboje inhibiraju DNMT u S fazi staničnog ciklusa i time smanjuju ukupnu razinu metilacije DNA u određenim stanicama. Pokazano je kako tretiranje stromalnih stanica endometrija, koje normalno nemaju ekspresiju aromataze, s DMA povećava ekspresiju mRNA za aromatazu. (46) Još 1992. godine se uočilo kako DMA značajno povisuje razinu mRNA za ER $\beta$  u stanicama endometrija i time se pronašao mogući cilj epigenetskih lijekova. (67) Selektivna inhibicija receptora prostaglandina E2, EP2 i EP4, modulira DNA metilaciju, ali i metilaciju i acetilaciju histona H3 u ljudskim endometrijskim epitelnim i stromalnim stanicama. Smanjuje ekspresiju gena *DNMT3a* i *DNMT3b*, ali ne djeluje na *DNMT1*. Autori tog istraživanja su pretpostavili kako bi se djelovanje na EP2 i EP4 receptore moglo iskoristiti kao dugodjelujuća nesteroidna terapija za liječenje endometrijskih lezija u žena. (68)

Iako uporaba DMA djeluje obećavajuće, još uvijek se razmatra njihovo korištenje kao aktualna terapija u endometriozu. Uporabom tih lijekova dolazi do dugotrajne demetilacije, čak i nakon kratkog perioda liječenja. Budući da je endometrioza benigna bolest, produljena citopenija i gastrointestinalna toksičnost smatraju se ozbiljnim nuspojavama u inače zdravih pacijenata. Također, mnoge žene s endometriozom

vjerojatno trebaju ponovljene tretmane tijekom reproduktivne dobi, pa bi sigurnosni problemi trebali biti primarna briga budućih istraživanja. (43)

Obećavajući epigenetski lijek je inhibitor HDAC (HDACI, od engl. *histone deacetylase inhibitors*). Molekularna događanja koja posreduju u biološkim učincima HDACI-a nisu u potpunosti shvaćena. Inhibicija HDAC povećava acetilaciju histona te posljedično reorganizaciju heterokromatina u eukromatin što reaktivira transkripciju prije utišanih gena. (69)

Pokazano je kako HDACI, poput valproične kiseline (VPA, od engl. *valproic acid*) i TSA, mogu suprimirati proliferaciju, ekspresiju COX-2 induciranu interleukinom 1b i aktivaciju nuklearnog faktora  $\kappa$ B što smo u prethodnom povezali s razvojem endometrijoza. Također mogu ublažiti invazivnost stanica i reaktivirati ekspresiju utišanog gena za E-katherin u endometrijskim stanicama. (48) To otkriće nam sugerira kako su neke karakteristike endometrijskih stanica, poput invazivnosti, epigenetski posredovane i kao takve mogu biti promijenjene epigenetskim modulacijama pomoću farmakoloških sredstava. (70)

Istraživanja na životinjama su također pokazala potencijal uporabe HDACI u liječenju endometrijoze. Primjena TSA u miševa s kirurški induciranom endometrijozom je značajno smanjila prosječnu veličinu ektopičnih lezija u usporedbi s kontrolom. Također, uočeno je kako je inducirana endometrijoza izazvala hiperalgeziju, dok je primjena TSA smanjila percepciju boli. Autori su zaključili kako bi u žena s endometrijozom TSA mogao smanjiti rast endometrijskih lezija i ublažiti bolove. (71)

Osim VPA i TSA, kao HDACI koriste se i suberoilanilid-hidroksamična kiselina ili vorinostat (SAHA, od engl. *suberoylanilide hydroxamic acid*) i romidepsin. Njihovom primjenom došlo je do smanjenja ekspresije estrogenskih receptora vezanih uz G-protein (GPER, od engl. *G-protein-coupled estrogen receptor*) i samim time do inhibicije proliferacije endometrijskih stanica. (72)

HDACI reaktiviraju epigenetski utišane gene, što dovodi do supresije stanične proliferacije, zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze stromalnih stanica endometrijske ciste. Uočeno je, gledajući inhibiciju proliferacije, da su endometrijske stanice osjetljivije na tretman HDACI od normalnih endometrijskih stromalnih stanica. (73)

Treba napomenuti da djelovanje enzima HDACI nije specifično, pa mogu spriječiti deacetilaciju histona širom genoma i posljedično povećati ekspresiju nasumičnih gena. Budući da su zabilježene kompleksne stanične reakcije na različite HDACI, treba istražiti njihov široki potencijal. Trenutno su dugoročna sigurnost i nuspojave epigenetskih lijekova za liječenje endometrioze uglavnom nepoznati. (74)

U novijim istraživanjima se često zaključuje kako bi u budućnosti i modulacija miRNA uključenih u patogenezu endometrioze mogla imati potencijalni terapijski učinak. Primjer je uporaba inhibitora STAT3, koji je aktiviran povišenom ekspresijom miR-210 u endometriotskim lezijama. Time bi se mogla smanjiti proliferacija, angiogeneza i otpornost na apoptozu stanica endometriotskih lezija. (59)

## 4. ZAKLJUČAK

Endometrioza predstavlja dijagnostički i terapijski izazov za kliničare, ali i novo polje istraživanja o tome kako se epigenetika upliće u patofiziologiju i progresiju bolesti. Do njenog razvoja dolazi, barem dijelom, abnormalnom DNA metilacijom, disreguliranim mikroRNA i modifikacijom histona.

Bez obzira na mehanizme, epigenetika je zajednički nazivnik hormonskim i imunološkim aberacijama promatranim u endometriozi, a mnogi aspekti endometrioze mogu se objasniti iz perspektive epigenetike. Trenutno poznavanje patofiziologije endometrioze podupire uključivanje i genetskih i epigenetskih pojava u induciranju promjena u ekspresiji gena koji dovode do bolesti. Brojni dokazi pokazuju kako je endometrioza epigenetski poremećaj. Usprkos tim dokazima, znanje o epigenetici endometrioze i njegovom patofiziološkom značaju je tek površno. Još uvijek nije razjašnjeno predstavljaju li epigenetske promjene uzrok ili posljedicu te bolesti. Da bi se na to pitanje odgovorilo, potrebna su daljnja istraživanja.

Epigenetika endometrioze je brzorastuće područje i moglo bi dovesti do boljeg razumijevanja njene etiopatogeneze. Istraživanja su pokazala obećavajuće rezultate liječenja epigenetskim lijekovima, međutim, još uvijek smo daleko od uporabe tih lijekova u svakodnevnoj medicinskoj praksi. Do tada, endometrioza ostaje idealan model za daljnja istraživanja.

## **5. ZAHVALE**

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ljiljani Šerman, dr. med., na savjetima, korekcijama, podršci i pristupačnosti tijekom odabira teme i pisanja ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem svojoj obitelji i najbližim prijateljima na strpljenju, pomoći i podršci tijekom cijelog studija i za vrijeme izrade rada.

## 6. LITERATURA

1. Šimunić V, suradnici. Endometrioza. In: Ginekologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2001. p. 241–6.
2. Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Painter R. Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. *BMJ*. 1993;306(6871):182–4.
3. Magowan BA, Owen P, Thomson A. Endometriosis. In: *Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Third. Saunders Elsevier; 2014. p. 105–9.
4. Markanović Mišan M, Smiljan Severinski N. Endometrioza i neplodnost Endometriosis and infertility. *Med Flum*. 2013;49(2):157–66.
5. Oliva R. Reproductive Disease Epigenetics. In: Tollefsbol TO, editor. *Medical epigenetics*. Elsevier Inc.; 2016. p. 375–91.
6. Tro KG, Kujund RN, Grbe I. Epigenetika i fiziologija gena Epigenetics and gene physiology. *Med Flum*. 2009;45(2):127–35.
7. Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*. 2006;27(6):1121–5.
8. Choudhuri S. From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicol Mech Methods*. 2011;21(4):252–74.
9. Speybroeck L. From Epigenesis to Epigenetics. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;981(1):61–81.
10. Brumfiel G. Disputed definitions. *Nature*. 2008;455(23):1023–8.
11. Singal R, Ginder GD. DNA Methylation. *Blood*. 1999;93:4059–70.
12. Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. *Fertil Steril*. 2013;99(3):607–15.
13. Antequera F, Bird AP. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(24):11995–9.



14. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33:245–54.
15. Koukoura O, Sifakis S, Spandidos DA. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (review). *Mol Med Rep.* 2012;5(4):883–9.
16. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet.* 2001;38(5):285–303.
17. Di Croce L. Methyltransferase Recruitment and DNA Hypermethylation of Target Promoters by an Oncogenic Transcription Factor. *Science* (80- ). 2002;295(1079):1079–82.
18. Saare M, Modhukur V, Suhorutshenko M, Rajashekar B, Rekker K, Sõritsa D, et al. The influence of menstrual cycle and endometriosis on endometrial methylome. *Clin Epigenetics.* 2016;8(2).
19. Baranov VS, Ivaschenko TE, Yarmolinskaya MI. Comparative systems genetics view of endometriosis and uterine leiomyoma: Two sides of the same coin? *Syst Biol Reprod Med.* 2016;62(2):93–105.
20. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2007;87(1):24–32.
21. Szczepanska M, Wirstlein P, Skrzypczak J, Jagodzinski PP. Expression of HOXA11 in the mid-luteal endometrium from women with endometriosis-associated infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10(1).
22. Van Kaam KJAF, Delvoux B, Romano A, D’Hooghe T, Dunselman GAJ, Groothuis PG. Deoxyribonucleic acid methyltransferases and methyl-CpG-binding domain proteins in human endometrium and endometriosis. *Fertil Steril.* 2011;95(4):1421–7.
23. Hsiao K, Wu M, Chang N, Yang S, Wu C. Coordination of AUF1 and miR-148a to destabilize DNA methyltransferase 1 mRNA under hypoxia in endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2015;1–34.
24. Dyson MT, Kakinuma T, Pavone ME, Monsivais D, Navarro A, Malpani S, et al. The aberrant expression and localization of DNA methyltransferase 3B in

- endometriotic stromal cells. *Fertil Steril*. 2015;104(4):953–63.
25. Wu Y, Halverson G, Basir Z, Strawn E, Yan P, Guo SW. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(2):371–80.
  26. Zanatta A, Rocha AM, Carvalho FM, Pereira RMA, Taylor HS, Motta ELA, et al. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: A review. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(12):701–10.
  27. Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest*. 1998;101(7):1379–84.
  28. Gui Y, Zhang J, Yuan L, Lessey BA. Regulation of HOXA-10 and its expression in normal and abnormal endometrium. *Mol Hum Reprod*. 1999;5(9):866–73.
  29. Szczepańska M, Wirstlein P, Łuczak M, Jagodziński PP, Skrzypczak J. Reduced expression of HOXA10 in the midluteal endometrium from infertile women with minimal endometriosis. *Biomed Pharmacother*. 2010;64(10):697–705.
  30. Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, et al. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: Potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(5):323–32.
  31. Lee B, Du H, Taylor HS. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol Reprod*. 2009;80(1):79–85.
  32. Bromer JG, Wu J, Zhou Y, Taylor HS. Hypermethylation of homeobox A10 by in utero diethylstilbestrol exposure: An epigenetic mechanism for altered developmental programming. *Endocrinology*. 2009;150(7):3376–82.
  33. Naqvi H, Ilagan Y, Krikun G, Taylor HS. Altered genome-wide methylation in endometriosis. *Reprod Sci*. 2014;21(10):1237–43.
  34. Shao R, Cao S, Wang X, Feng Y, Billig H. The elusive and controversial roles of estrogen and progesterone receptors in human endometriosis. *Am J Transl Res*. 2014;6(2):104–13.

35. Dinny Graham J, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* 1997;18(4):502–19.
36. Leung Y, Mak P, Hassan S, Ho S. Estrogen receptor (ER)- $\beta$  isoforms: A key to understanding ER- $\beta$  signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(35):13162–7.
37. Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone Receptor Isoform A But Not B Is Expressed in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;85(8):2897–902.
38. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis. *Epigenetics.* 2006;1(2):106–11.
39. Xue Q, Lin Z, Cheng Y-H, Huang C-C, Marsh E, Yin P, et al. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod.* 2007;77(4):681–7.
40. Xue Q, Lin Z, Yin P, Milad MP, Cheng YH, Confino E, et al. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(8):3261–7.
41. Xue Q, Zhou YF, Zhu SN, Bulun SE. Hypermethylation of the CpG island spanning from exon II to intron III is associated with steroidogenic factor 1 expression in stromal cells of endometriosis. *Reprod Sci.* 2011;18(11):1080–4.
42. Xue Q, Xu Y, Yang H, Zhang L, Shang J, Zeng C, et al. Methylation of a novel CpG island of intron 1 is associated with steroidogenic factor 1 expression in endometriotic stromal cells. *Reprod Sci.* 2014;21(3):395–400.
43. Koukoura O, Sifakis S, Spandidos DA. DNA methylation in endometriosis (Review). *Mol Med Rep.* 2016;13(4):2939–48.
44. Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: Translational aspects. *Hum Reprod Update.* 2006;12(1):49–56.
45. Izawa M, Harada T, Taniguchi F, Ohama Y, Takenaka Y, Terakawa N. An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in

- endometriotic stromal cells. *Fertil Steril*. 2008;89(3):1390–6.
46. Izawa M, Taniguchi F, Uegaki T, Takai E, Iwabe T, Terakawa N, et al. Demethylation of a nonpromoter cytosine-phosphate-guanine island in the aromatase gene may cause the aberrant up-regulation in endometriotic tissues. *Fertil Steril*. 2011;95(1):33–9.
  47. Starzinski-Powitz A, Gaetje R, Zeitvogel A, Kotzian S, Handrow-Metzmacher H, Herrmann G, et al. Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis. *Hum Reprod Update*. 1998;4(5):724–9.
  48. Wu Y, Starzinski-Powitz A, Guo S-W. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, attenuates invasiveness and reactivates E-cadherin expression in immortalized endometriotic cells. *Reprod Sci*. 2007;14(4):374–82.
  49. Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Wattiez A, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertil Steril*. 2004;82(5):1309–15.
  50. Buchweitz O, Staebler A, Wülfing P, Hauzman E, Greb R, Kiesel L. COX-2 overexpression in peritoneal lesions is correlated with nonmenstrual chronic pelvic pain. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006;124(2):216–21.
  51. Wang D, Chen Q, Zhang C, Ren F, Li T. DNA hypomethylation of the COX-2 gene promoter is associated with up-regulation of its mRNA expression in eutopic endometrium of endometriosis. *Eur J Med Res*. 2012;17(12).
  52. Wu Y, Zhang M, Zhang X, Xu Z, Jin W. Methylation status and protein expression of RASSF1A in endometriosis. *Oncol Lett*. 2016;11(6):4107–12.
  53. Erson AE, Petty EM. MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet*. 2008;74(4):296–306.
  54. Ohlsson Teague EMC, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-Regulated Pathways Associated with Endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2009;23(2):265–75.
  55. Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, et al. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium

- in ovarian endometriosis. *J Biomed Biotechnol*. 2010;
56. Hawkins SM, Creighton CJ, Han DY, Zariff A, Anderson ML, Gunaratne PH, et al. Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2011;25(5):821–32.
  57. Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2009;15(10):625–31.
  58. Braza-Boïls A, Marí-Alexandre J, Gilabert J, Sánchez-Izquierdo D, España F, Estellés A, et al. MicroRNA expression profile in endometriosis: Its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Hum Reprod*. 2014;29(5):978–88.
  59. Okamoto M, Nasu K, Abe W, Aoyagi Y, Kawano Y, Kai K, et al. Enhanced miR-210 expression promotes the pathogenesis of endometriosis through activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Hum Reprod*. 2015;30(3):632–41.
  60. Yang RQ, Teng H, Xu XH, Liu SY, Wang YH, Guo FJ, et al. Microarray analysis of microRNA deregulation and angiogenesis-related proteins in endometriosis. *Genet Mol Res*. 2016;15(2):1–8.
  61. Nothnick W. MicroRNAs and Endometriosis: Distinguishing Drivers from Passengers in Disease Pathogenesis. *Semin Reprod Med*. 2017;
  62. Xiaomeng X, Ming Z, Jiezhi M, Xiaoling F. Aberrant histone acetylation and methylation levels in woman with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;287(3):487–94.
  63. Monteiro JB, Colón-Díaz M, García M, Gutierrez S, Colón M, Seto E, et al. Endometriosis is characterized by a distinct pattern of histone 3 and histone 4 lysine modifications. *Reprod Sci*. 2014;21(3):305–18.
  64. Samartzis EP, Noske A, Samartzis N, Fink D, Imesch P. The Expression of Histone Deacetylase 1, But Not Other Class I Histone Deacetylases, Is Significantly Increased in Endometriosis. *Reprod Sci*. 2013;20(12):1416–22.
  65. Mayo Clinic [Internet]. Available from: <http://www.mayoclinic.org/diseases->

66. Yoo C, Jones P. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(1):37–50.
67. Bergman MD, Schachter BS, Nelson F. Estrogen Receptor and Its Acid during the Mouse Estrous Cycle : The Role of Estradiol \*. *1992;130(4):1923–30.*
68. Arosh JA, Lee J, Starzinski-Powitz A, Banu SK. Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 modulates DNA methylation and histone modification machinery proteins in human endometriotic cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;409:51–8.
69. Richon VM, O'Brien JP. Histone deacetylase inhibitors: a new class of potential therapeutic agents for cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2002;8(3):662–4.
70. Guo S-W. The Epigenetics of Endometriosis. In: Tollefsbol T, editor. *Epigenetics in Human Disease.* First. Elsevier Inc.; 2012. p. 443–71.
71. Lu Y, Nie J, Liu X, Zheng Y, Guo SW. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, reduces lesion growth and hyperalgesia in experimentally induced endometriosis in mice. *Hum Reprod.* 2010;25(4):1014–25.
72. Imesch P, Samartzis EP, Dedes KJ, Fink D, Fedier A. Histone deacetylase inhibitors down-regulate G-protein-coupled estrogen receptor and the GPER-antagonist G-15 inhibits proliferation in endometriotic cells. *Fertil Steril.* 2013;100(3):770–6.
73. Kawano Y, Nasu K, Li H, Tsuno A, Abe W, Takai N, et al. Application of the histone deacetylase inhibitors for the treatment of endometriosis: histone modifications as pathogenesis and novel therapeutic target. *Hum Reprod.* 2011;26(9):2486–98.
74. Nasu K, Kawano Y, Kai K, Aoyagi Y, Abe W, Okamoto M, et al. Aberrant histone modification in endometriosis. Vol. 19, *Frontiers in bioscience (Landmark edition).* 2014. p. 1202–14.

## **7. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 2.8.1992. godine u Zagrebu. Osnovnu školu sam završila 2007. godine u Sesevskom Kraljevcu. Maturirala sam 2011. godine u Općoj gimnaziji Sesvete, te iste godine upisala Medicinski fakultet u Zagrebu. Radila sam kao demonstratorica na Katedri za fiziku i biofiziku.