I KATEDRA GINEKOLOGII I POŁOŻNICTWA
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI
Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologicznej
Kierownik: prof. dr hab. n. med. R. Jacek Wilczyński
ul.Pomorska 251, 92-213 ŁÓDŹ
tel/fax 42 279 25 11

Ocena
rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek.med. Anny Bogaczyk
pt. „Znaczenie kliniczne zmian ekspresji wybranych mikroRNA w diagnostyce i leczeniu raka endometrium"

Rak endometrium, jest obecnie najczęściej występującym nowotworem żeńskich narządów płciowych w krajach Ameryki Północnej i Europy. Wysoki współczynnik zapadalności wynoszący 13-20 przypadków /100 000 kobiet przypisuje się rosnącej częstości występowania czynników ryzyka, do których należą zwłaszcza otyłość i związane z nią choroby, starzenie się populacji i brak aktywności fizycznej. Nasilanie się zjawisk związanych z tymi czynnikami ryzyka stanowi przyczynę stale rosnącej zapadalności na ten nowotwór, szczególnie o endometroidalnej histologii, w krajach wysoko rozwiniętych, w tym w Polsce. Postępy w zrozumieniu przyczyn i biologii raka endometrium doprowadziły do wzrostu zainteresowania molekularnymi mechanizmami regulującymi jego wzrost, co znalazło odzwierciedlenie w klasyfikacji molekularnej dzielącej raka endometrium na cztery podtypy (to jest POLEmut, MMRd, p53abn oraz NZMP) o odmiennym rokowaniu i zróżnicowanym podejściu do terapii. Praktyczne wskazówki terapeutyczne wynikające z analizy genotypów raka endometrium sugerują wyraźnie, że mechanizmy regulacyjne mające wpływ na ekspresję genów mogą mieć kluczowe znaczenie nie tylko dla dalszego zrozumienia karcinogenezy, ale także dla wyciągnięcia wniosków o znaczeniu klinicznym i wprowadzenia nowych sposobów diagnostyki i leczenia. Mechanizmami o potencjalnym znaczeniu w tym kontekście mogą być mechanizmy epigenetyczne, w tym regulacyjne niekodujące cząsteczki RNA. Jedną z klas tych cząsteczek są mikroRNA (miRNA), które poprzez regulację posttranskrypcyjną są udowodnionymi modulatorami wielu procesów komórkowych, jak proliferacja, migracja, inwazja czy przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT). MikroRNA wpływają również na stabilność genomu, funkcję metabolomu, apoptozę komórek, neoangiogenezę oraz immunoedycję guza. Nie dziwi więc fakt, że badania nad funkcją miRNA w nowotworach, włączając raka endometrium, są jednym z najbardziej eksploatowanych kierunków badawczych w onkologii. Tym niemniej pomimo rosnącej liczby doniesień literaturowych, wiele aspektów funkcji miRNA i ich roli w patofizjologii wzrostu nowotworowego czeka wciąż na wyjaśnienie, podobnie jak ich potencjalne znaczenie dla kliniki nowotworów. Dlatego inicjatywa Doktorantki aby zbadać ekspresję i związek wybranych miRNA z czynnikami ryzyka i wybranymi parametrami wzrostu guza w grupie chorych z rozrostem atypowym i rakiem endometrium jest ze wszech miar uzasadniona, zaś sam problem można z pewnością określić jako współczesny i interesujący.

Badania stanowiące treść dysertacji doktorskiej zostały przeprowadzone w Laboratorium Biologii Molekularnej Przyrodniczo-Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych *Collegium Medicum* Uniwersytetu Rzeszowskiego we współpracy z Kliniką Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. F. Chopina w Rzeszowie.

Badania sfinansowano ze środków statutowych uczelni i uzyskano na ich przeprowadzenie zgodę Komisji Bioetyki przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Rzeszowie uchwałą nr 54/B/2020.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera 133 strony tekstu podzielonego na 11 rozdziałów, a w tej liczbie rozdział 5 zatytułowany „Wyniki" zawierający trzy pełne artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences w latach 2023-2025. Na początku pracy Doktorantka zamieściła wykaz zastosowanych w pracy skrótów ułatwiający zrozumienie tekstu oraz wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej ocenionych w sumie na 14.7 punktów IF, co stanowi odpowiednik 420 punktów MNiSW. Kolejno następuje rozdział „Wprowadzenie" zawierający podrozdziały opisujące w zwięzły sposób charakterystykę kliniczną, klasyfikację molekularną raka endometrium i znaczenie miRNA w jego patogenezie, a także charakterystykę miRNA będących przedmiotem dysertacji, to jest miRNA-205-5p, miRNA-222-3p i miRNA-21-5p. Rozdział jest krótkim kompendium wiedzy na powyższe tematy i stanowi wybór i syntetyczną kompilację danych zawartych we wstępie do pierwszej pracy stanowiącej artykuł poglądowy dotyczący roli miRNA w rozwoju, wzroście i progresji raka endometrium. Sposób opracowania artykułu i rozdziału świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do rozwiązania problemu badawczego.

Cele pracy, stanowiące kolejny rozdział, zostały sformułowane precyzyjnie i nie budzą zastrzeżeń. Doktorantka postanowiła ocenić ekspresję wybranych miRNA w raku endometrium realizując to poprzez cele szczegółowe, które zawierały ocenę ekspresji miRNA w tkance raka w porównaniu do endometrium niezmienionego oraz w surowicy krwi, poszukiwanie zależności między ekspresją miRNA a klinicznymi czynnikami ryzyka oraz wskaźnikami zaawansowania raka endometrium a także zbadanie stabilności ekspresji jądrowego i jąderkowego RNA U6 i SNORD48.

W kolejnych rozdziale zatytułowanym „Materiały i metody" Autorka w zwięzły sposób przedstawiła opis grup badanych, stosowane techniki laboratoryjne i testy statystyczne służące do analizy danych. Rozdział powyższy stanowi krótkie podsumowanie odnośnych rozdziałów z kolejnych dwóch załączonych oryginalnych artykułów naukowych. Badania ekspresji miRNA w materiale tkankowym przeprowadzono u 111 chorych z rozrostem atypowym i rakiem endometrium oraz w drugim etapie badania w surowicy krwi u 18 chorych. Grupę kontrolną w obu etapach badania stanowiło endometrium i surowica pobrane od 19 zdrowych pacjentek operowanych z powodu zaburzeń statyki narządów płciowych lub mięśniaków macicy. Badane kobiety wyraziły świadomą zgodę na udział w badaniach. Izolację miRNA ze świeżej tkanki przechowywanej w -80 st. C przeprowadzono przy użyciu zestawu miRNeasy Mini Kit firmy Qiagen, zaś miRNA ze świeżej odwirowanej surowicy analogicznie przechowywanej w -80 st. C przeprowadzono przy użyciu zestawu miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit również firmy Qiagen. Reakcję odwrotnej transkrypcji dla próbek przeprowadzono zestawem miRCURY LNA Reverse Transcription Kit firmy Qiagen w termocyklerze T100™ firmy Bio-Rad Hercules. Powyższe etapy metodyki zostały przeprowadzone w sposób typowy z zastosowaniem odpowiednich odczynników. Analizę poziomu ekspresji przeprowadzono techniką digital PCR (dPCR), która w porównaniu z powszechniej stosowaną techniką qPCR charakteryzuje się analizą tysięcy mikropartycji co po zastosowaniu statystyki Poissona pozwala na bezwzględną kwantyfikację liczby kopii produktu bez potrzeby używania krzywych kalibracyjnych. Wyniki przedstawiono jako absolutny poziom ekspresji wyrażony liczbą kopii badanego miRNA / μL. W ten sposób uniknięto potencjalnych błędów związanych z faktem, że zaplanowane do kalibracji RNA wzorcowe U6 i SNORD48 okazały się być niestabilne w analizowanych próbkach. Odpowiednia liczebność grupy badanej i grupy

odniesienia oraz dobór metodyki badania i metod statystycznych pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników i nie budzą merytorycznych zastrzeżeń.

Kolejny rozdział „Wyniki" stanowi wraz z pełnymi tekstami artykułów zasadniczy trzon dysertacji. Doktorantka zamieściła w nim trzy publikacje wraz z krótkim streszczeniem i komentarzami do każdej z nich. Pierwszą jest praca poglądowa pt. „The role of miRNAs in the development, proliferation and progression of endometrial cancer", którą opublikowano w 2023 roku. Praca w w wyczerpujący sposób przedstawiła aktualne dane dotyczące znaczenia miRNA w proliferacji guza, migracji i inwazji jego komórek, intrawazacji komórek do naczyń, przetrwania w krążeniu, ekstrawazacji w narządach docelowych i tworzeniu niszy pre-metastatycznej. Autorka omówiła także ekspresję różnych miRNA u chorych z czynnikami ryzyka raka endometroidalnego endometrium, w raku endometrium, jak również znaczenie miRNA dla rokowania w przebiegu tej choroby. Pracę kończą podrozdziały opisujące szczegółowo miRNA o patogenetycznym znaczeniu dla raka endometrium, w tym: miR-205, miR-21, miR-182, miR-200, miR-103, miR-105, miR-136, miR-155, miR-372, miR-93, miR-222, miR-429 i Let-7. W pracy zacytowano 199 artykułów, co świadczy o konieczności zgłębienia tematu przez Autorkę i nabyciu szerokiej wiedzy na temat znaczenia miRNA w onkologii i w raku endometrium w szczególności. W podsumowaniu Autorka zauważa, że miRNA mogą stanowić użyteczne biomarkery wspomagające rozpoznanie i monitorowanie raka endometrium oraz rokowanie w tym nowotworze. Kolejne dwie publikacje mają charakter prac oryginalnych i opublikowane zostały w 2024 i 2025 roku. Pierwsza zatytułowana „Absolute quantification of selected microRNAs expression in endometrial cancer by digital PCR" przedstawia ekspresję trzech miRNA: miR-21-5p, miR-205-5p i miR-222-3p w tkance rozrostów atypowych i raka endometrium (n=111) i porównuje ją z ekspresją odnośnych miRNA w endometrium prawidłowym (n=19). Wyniki wskazują na istotny statystycznie wzrost ekspresji miR-205-5p oraz spadek ekspresji miR-222-3p w tkance raka endometrium. W przypadku miR-21-5p zanotowano obniżenie ekspresji w podgrupie raka o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej (G3). Wyniki potwierdzono za pomocą analizy regresji logistycznej. Znaczenie wzrostu ekspresji miR-205-5p polega najprawdopodobniej na obniżeniu działania genu supresorowego *PTEN* co wpływa na kancerogenezę oraz na stymulowaniu proliferacji i hamowaniu apoptozy komórek raka poprzez wpływ na gen *FOXO1*. Inhibitorem *PTEN* jest również miR-21-5p, którego ekspresja zmieniła się w najagresywniejszych histologicznie typach raka. Wyniki dotyczące miR-222-3p nie potwierdzają jego pro-onkogennej roli i sugerują raczej działanie onkosupresorowe. Praca omawia również ekspresję RNA U6 i SNORD48, które to RNA zostały początkowo wybrane jako referencyjne do kalibracji ekspresji RNA badanych. Wybór taki został umotywowany stabilnością powyższych RNA w różnych tkankach potwierdzoną w danych literaturowych. Jednak w przebiegu badania nie potwierdzono tej cechy zarówno dla U6 jak i SNORD48 wykazując niestabilność obu cząstek w tkankach raka endometrium. Autorka sprawdziła to za pomocą narzędzia NormiRazor potwierdzając nieprzydatność obu RNA referencyjnych w badaniu ekspresji miRNA w raku endometrium. Wpłynęło to pozytywnie na metodykę badania i prezentację wyników i pozwoliło uniknąć zafałszowania wyników miRNA. Ostatnia załączona publikacja pt. „MiR-205-5p and miR-222-3p as potential biomarkers of endometrial cancer" opisana przez Autorkę jako badanie pilotażowe, poświęcona została ocenie ekspresji wolnego krążącego miRNA miR205-5p, miR-222-3p oraz miR-21-5p w surowicy krwi 18 pacjentek z rakiem endometrium i tych samych co poprzednio 19 pacjentek z grupy kontrolnej. Wykazano, że spośród badanych miRNA jedynie miR-222-3p wykazywał obniżoną ekspresję w surowicy krwi u chorych z rakiem endometrium, co zdaniem Autorki może sugerować jego przydatność jako biomarkera dla tego nowotworu. Niestety Autorka nie opisała jak w praktyce klinicznej mogłoby wyglądać wykorzystanie takiego biomarkera. Doktorantka krytycznie podchodzi do wyników

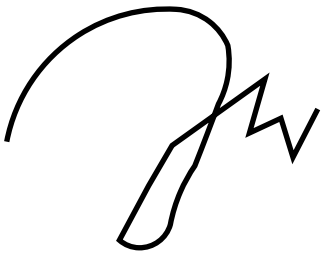
własnych badań wskazując zarówno w publikacjach, jak i w komentarzach do nich na ograniczenia i słabe strony badania. Opublikowanie przez Doktorantkę wyników badań stanowiących temat pracy doktorskiej w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej, recenzowanym przez niezależnych recenzentów, podnosi wartość naukową pracy oraz otrzymanych wyników.

Wnioski stanowiące podsumowanie dysertacji zawarte są w rozdziale 6, i choć są częściowo rekapitulacją wyników to odpowiadają na cele pracy. Uwagi dotyczące ograniczenia pracy są zawarte w dyskusji obu artykułów i nie powinny znaleźć się ponownie we wnioskach. Najważniejszymi wnioskami w mojej ocenie są te, które wskazują na potencjalny udział badanych miRNA w patogenezie raka endometrium, oraz te, które „zasiały wątpliwości" dotyczące stabilności RNA referencyjnych U6 i SNORD48 w tkance raka endometrium. Jest to interesujący wątek, który w mojej opinii jest warty kontynuacji badań.

W następujących kolejno rozdziałach 7 i 8 Doktorantka przedstawia polskie i angielskie streszczenie pracy. Rozdział 9 to piśmiennictwo stanowiące wybór 139 pozycji spośród tych, zawartych w artykułach naukowych. Wśród nich jest 50 pozycji najnowszej literatury tematu z lat 2020 i powyżej. Ostatnie części dysertacji to „Oświadczenia współautorów" oraz zgoda Komisji Bioetycznej. Dysertacja napisana jest zwięzłym i przejrzystym stylem, poprawną polszczyzną. Podobnie, artykuły stanowiące jej integralną część, napisano poprawnym językiem angielskim, w sposób czytelny i zrozumiały.

Oceniana rozprawa stanowi samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu badawczego przez lek. med. Annę Bogaczyk, która wykazała się doskonałą wiedzą teoretyczną na temat epigenetycznych aspektów patogenezy raka endometrium, a także umiejętnością prowadzenia badań w tym zakresie. Poddana mojej ocenie dysertacja naukowa stanowi dobrą podstawę do rozwiązywania kolejnych problemów naukowych związanych z zagadnieniami epigenetycznych mechanizmów regulacji wzrostu raka endometrium. Stwierdzam, że rozprawa odpowiada merytorycznym i formalnym wymogom stawianym pracom na stopień doktora nauk medycznych określonym w art. 13 ustęp 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz 595 z późn. zm). Mam zatem zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej *Collegium Medicum* Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie lekarz Anny Bogaczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość pracy potwierdzoną publikacjami w impaktowanym czasopiśmie, a także potencjalnie praktyczny wymiar otrzymanych wyników, składam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

Z wyrazami szacunku



Prof. Jacek R. Wilczyński

Łódź, 29.11.2025.