

Lek. Klaudia Klicka

**Rola indukowanych przez estradiol mikroRNA w patogenezie
raka endometrium**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Paweł Włodarski

Zakład Metodologii Badań Naukowych Warszawskiego Uniwersytetu
Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2025 r.

Streszczenie w języku polskim

Rak endometrium jest najczęstszym nowotworem żeńskich dróg rodnych i czwartym najczęstszym nowotworem u kobiet. Jest diagnozowany głównie u pacjentek po menopauzie. W związku z rosnącym występowaniem otyłości w populacji, nowotwór ten jest coraz częściej rozpoznawany. Wśród czynników ryzyka wyróżniamy m.in. zespół metaboliczny, zaburzenia miesiączkowania i nie zrównoważoną terapię estrogenową. Historycznie wyróżniano dwa typy raka endometrium- typ I (gruczolakorak endometrioidalny, zależny od estrogenów) i typ II (gruczolakorak nieendometrialny - najczęściej rak surowiczy, niezależny od hiperestrogenizmu), który charakteryzuje się gorszym rokowaniem. Obecnie w diagnostyce istotną rolę pełnią badania molekularne, których wyniki uwzględnione są w najnowszej klasyfikacji FIGO 2023 raka endometrium.

MikroRNA to krótkie niekodujące cząsteczki RNA, których mechanizm działania polega na post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów poprzez wyciszenie translacji lub degradację mRNA. Poprzez ten wpływ biorą udział w patogenezie wielu chorób, w tym nowotworów. W komórkach nowotworowych mogą pełnić rolę inhibitorów transformacji nowotworowej i progresji choroby lub cząsteczek stymulujących te procesy (nazywanych onkomiRami). Ekspresja mikroRNA jest regulowana wieloma czynnikami. Wcześniejsze badania wykazały wpływ estrogenów na ekspresję mikroRNA i transformację nowotworową w raku piersi. Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej, złożonej z cyklu trzech artykułów przeglądowych i dwóch prac oryginalnych, było zbadanie roli indukowanych przez estradiol mikroRNA w patogenezie raka endometrium.

Pierwszym artykułem wchodzącym w skład cyklu publikacji jest praca przeglądowa pt. „*Regulators at Every Step-How microRNAs Drive Tumor Cell Invasiveness and Metastasis*”, która została opublikowana w czasopiśmie *Cancers*. W artykule szczegółowo omówiono mechanizm działania oraz rolę cząsteczek mikroRNA jako inhibitorów lub promotorów poszczególnych etapów progresji nowotworów. Opisano wpływ mikroRNA na migrację komórek nowotworowych, miejscową inwazję, proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, angiogenezę oraz przerzutowanie. W tabelach uporządkowano dotychczas zebrane dane dotyczące roli poszczególnych cząsteczek mikroRNA i wiążących je, docelowych mRNA w wymienionych procesach. Ponadto omówiono potencjalne zastosowanie mikroRNA jako biomarkerów nowotworów, a nawet jako czynników terapeutycznych.

Drugim artykułem wchodzącym w skład cyklu jest przegląd systematyczny pt. „*The Role of miRNAs in the Regulation of Endometrial Cancer Invasiveness and Metastasis-A Systematic Review*”. Praca przygotowana wg wytycznych PRISMA poddaje analizie 163 artykułów, które spełniły kryteria włączenia. W pracy zebrano dane dotyczące ekspresji 106 cząsteczek mikroRNA i ich roli w regulacji inwazyjności i migracji komórek raka endometrium *in vitro* oraz wzrostu guza i tworzenia przerzutów w badaniach *in vivo*. Spośród nich 63 cząsteczki mikroRNA pełniły funkcję inhibitorów, a 38 sprzyjały rozwojowi raka endometrium. Usystematyzowano również dane dotyczące mechanizmu działania mikroRNA w komórkach raka endometrium oraz ich wpływu na różne szlaki sygnałowe. Podsumowano korelację ekspresji poszczególnych mikroRNA z parametrami klinicznymi pacjentów. Badanie to wykazało złożoność procesów, w jakie zaangażowane są mikroRNA w patogenezie raka endometrium oraz zidentyfikowało dalsze kierunki badań nad mikroRNA.

Szczególną grupą cząsteczek mikroRNA jest rodzina mikroRNA-200, w skład której wchodzi mikroRNA-200a, mikroRNA-200b, mikroRNA-200c, mikroRNA-141, oraz mikroRNA-429. Regulują one wszystkie cechy nowotworów opisane przez Hanahana i Weinberga, co omówiono w trzeciej publikacji wchodzącej w skład cyklu pt. „*The role of miR-200 family in the regulation of hallmarks of cancer*”. Rodzina mikroRNA-200 pełni funkcję onkomirRNA jak i inhibitorów proliferacji, wzrostu guza, migracji, inwazji i angiogenezy w różnych typach nowotworów, uwzględniając raka endometrium.

Przeprowadzony przegląd literatury stanowił podstawę do badań oryginalnych, których wyniki zostały zebrane w dwóch manuskryptach. Artykuł pt. „*Decreased expression of miR-23b is associated with poor survival of endometrial cancer patients*” został opublikowany w czasopiśmie *Scientific Reports*. Celem tego badania była ocena ekspresji wybranych 16 miRNA w obu typach raka endometrium i zdrowym endometrium. W badaniu wzięło udział 45 pacjentek: 18 pacjentek z rakiem endometrium typu I, 12 z rakiem endometrium typu II i 15 ze zdrowym endometrium (grupa kontrolna). Przy zastosowaniu metody laserowej mikrodyssekcji (LCM) wyizolowano komórki nowotworowe oraz zdrowe tkanki endometrium z preparatów histologicznych. Z tych tkanek wyizolowano RNA, a ekspresję wybranych miRNA określono ilościowo za pomocą metody qPCR w czasie rzeczywistym. Ekspresja miR-23b, miR-125b-5p, miR-199a-3p, miR-221-3p i miR-451a była obniżona w tkankach raka endometrium w porównaniu do zdrowego endometrium. Natomiast ekspresja miR-34a-5p i miR-146-5p była wyższa

w raku endometrium typu I w porównaniu do raka endometrium typu II. Analiza bazy danych The Cancer Genome Atlas (TCGA) potwierdziła obniżoną ekspresję miR-23b, miR-125b-5p i miR-199a-3p w tkankach raka endometrium w porównaniu do zdrowych tkanek. Zmniejszona ekspresja miR-23b wiązała się z krótszym przeżyciem pacjentów chorych na raka endometrium.

Artykuł pt. „*Estradiol induces global changes in miRNA expression in endometrial cancer cells and upregulates oncogenic miR-182*” został opublikowany jako preprint w *bioRxiv*. Celem tego badania była ocena roli osi miRNA-estrogen w komórkach raka endometrium. W badaniu wykorzystano modelową linię komórkową raka endometrium Ishikawa, która jest zależna od estrogenów. Komórki inkubowano z estradiolem, a następnie wyizolowano z nich RNA. Zastosowano mikromacierze, aby zidentyfikować miRNA indukowane estradiolem w komórkach raka endometrium. Następnie wykorzystano tkanki pochodzące od 45 pacjentów (18 pacjentek z rakiem endometrium typu I, 12 z rakiem endometrium typu II, 15 pacjentek ze zdrowym endometrium), które zostały pocięte przy zastosowaniu LCM. Ekspresję wybranych miRNA i regulowanych przez nie mRNA oceniono przy użyciu metody qPCR w czasie rzeczywistym. Komórki Ishikawa zostały transfekowane miRNA-mimetykiem, inhibitorem miRNA (anty-miRNA) i ich kontrolami. Zidentyfikowano 66 miRNA, których ekspresja była zwiększona po inkubacji komórek raka endometrium z estradiolem. Spośród nich, poziom ekspresji miR-182 był podwyższony w tkankach raka endometrium typu I w porównaniu do zdrowego endometrium. Badania funkcjonalne wykazały, że miR-182 pełnił funkcję oncomiRNA w raku endometrium, ponieważ jego zwiększona ekspresja promowała proliferację komórek raka endometrium, a zmniejszona ekspresja miR-182 była związana z hamowaniem proliferacji komórek nowotworowych. Hamowanie miR-182 zwiększyło ekspresję SMAD4, ważnego elementu szlaku sygnałowego TGF β , co może być potencjalnym mechanizmem działania tego mikroRNA.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują na ważną rolę mikroRNA w patogenezie raka endometrium, w tym cząsteczek mikroRNA indukowanych przez estradiol. W związku z tym mikroRNA mogą stać się obiecującymi biomarkerami choroby. Potencjalnie mikroRNA mogą być zastosowane w celach leczniczych, lecz ich zastosowanie kliniczne wymaga wielu dalszych badań translacyjnych.