

Lublin, 07.10.2025 r.

Prof. dr hab. n. med. Marek Gogacz

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. Klaudii Klickiej

**pt. „ROLA INDUKOWANYCH PRZEZ ESTRADIOL mikroRNA W PATOGENEZIE
RAKA ENDOMETRIUM”.**

wykonanej pod kierownictwem naukowym prof. dr hab. n. med. Pawła Włodarskiego
z Zakładu Metodologii Badań Naukowych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącej Rady
Dyscypliny Nauk Medycznych, prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Marty Struga
(RDNM/D/203/2025), zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM.

Koncepcja przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jest bardzo ciekawa i odnosi
się do roli mikroRNA w regulacji ekspresji genów i histonów na poziomie
postranskrypcyjnym, poprzez różne szlaki metaboliczne. Epigenetyczne oddziaływanie
mikroRNA na DNA i histony na poziomie translacji może odrywać ważną rolę w
kancerogenezie.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi cykl publikacji odnoszących się
do problematyki karcinogenezy, potencjalnej roli mikroRNA jaką może odgrywać w tym
procesie, ze szczególnym uwzględnieniem raka trzonu macicy. Rak endometrium to
najczęściej występujący nowotwór złośliwy żeńskich narządów płciowych, stanowiący
niezwykle ważny problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny. Doktorantka konsekwentnie
i szczegółowo przedstawia podjętą problematykę oraz poddaje analizie za pomocą
zaawansowanych technik z zakresu biologii molekularnej wpływ estrogenów na ekspresję
mikroRNA w raku endometrium oraz próbuje zidentyfikować szlaki metaboliczne związane
z oddziaływaniem mikroRNA. Tematyka treści zawartych w dysertacji prac uzasadnia
połączenie ich w jeden, powiązany i spójny tematycznie cykl.

Rozprawa doktorska liczy 203 strony, ma typowy układ i obejmuje: słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, nazwy projektów badawczych finansujących badania, wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską oraz spis treści. Spis treści jest przejrzysty, zrozumiały i zawiera:

1. Wykaz stosowanych skrótów
2. Streszczenie w języku polskim
3. Streszczenie w języku angielski
4. Wstęp
5. Bibliografii
6. Założenia i cel pracy
7. Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora
8. Podsumowanie i wnioski
9. Oświadczenie Komisji Bioetycznej
10. Oświadczenia współautorów publikacji
11. Analiza bibliometryczna dorobku

Tytuł pracy doktorskiej odpowiada tematyce i treści publikacji przedstawionych w dysertacji.

W skład cyklu prac składających się na rozprawę doktorską wchodzi pięć publikacji:

1. Tomasz M. Grzywa, Klaudia Klicka, Paweł K. Włodarski. Regulators at Every Step-How microRNAs Drive Tumor Cell Invasiveness and Metastasis. *Cancers* (Basel). 2020 Dec 10;12(12):3709. doi: 10.3390/cancers12123709.
IF=6,639, 140 pkt. MEiN
2. Klaudia Klicka, Tomasz M. Grzywa, Alicja Klinke, Aleksandra Mielniczuk, Paweł K. Włodarski. The Role of miRNAs in the Regulation of Endometrial Cancer Invasiveness and Metastasis-A Systematic Review. *Cancers* (Basel). 2021 Jul 6;13(14):3393. doi: 10.3390/cancers13143393.
IF=6,575, 140 pkt. MEiN
3. Klaudia Klicka, Tomasz M. Grzywa, Aleksandra Mielniczuk, Alicja Klinke, Paweł K. Włodarski. The role of miR-200 family in the regulation of hallmarks of cancer. *Front. Oncol.* 12:965231. doi: 10.3389/fonc.2022.965231
IF=4,700, 100 pkt. MEiN
4. Klaudia Klicka, Tomasz M. Grzywa, Alicja Klinke, Aleksandra Mielniczuk, Jarosław Wejman, Joanna Ostrowska, Agata Gondek, Paweł K. Włodarski. Decreased expression of miR-23b is associated with poor survival of endometrial cancer patients. *Sci Rep.* 2022 Nov 5;12(1):18824. doi: 10.1038/s41598-022-

22306-w.

IF= 4,600, 140 pkt. MEiN

5. Klaudia Klicka, Tomasz M. Grzywa, Jarosław Wejman, Joanna Ostrowska, Paweł K. Włodarski. Estradiol induces global changes in miRNA expression in endometrial cancer cells and upregulates oncogenic miR-182.

Preprint w bioRxiv

Pierwsze trzy prace to prace przeglądowe opublikowane w roku 2020, 2021 i 2022. Dwie kolejne publikacje to prace oryginalne opublikowane w kolejnych latach, ostatnia w formie preprintu z roku 2024. Wszystkie prace opublikowane były w czasopismach o zasięgu międzynarodowym w języku angielskim. Na podkreślenie zasługuje znaczący współczynnik wpływu wszystkich opublikowanych prac oraz wysoka punktacja MEiN – 100 - 140 pkt każdej z prac. W czterech publikacjach jest pierwszym autorem zaś w jednej widnieje na drugiej pozycji. Doktorantka ma dominujący wkład w tworzeniu koncepcji prac doświadczalnych, realizacji badań, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do publikacji. Taki układ prac świadczy o zaplanowanym, harmonicznym i dojrzałym rozwoju naukowym doktorantki.

Sumaryczna wartość tych publikacji według kryteriów MEiN (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi zatem **520** punktów a wartość współczynnika oddziaływania czasopism IF (*ang. impact factor*) według listy JCR wynosi **22,514**.

Pozytywna ocena prac przez recenzentów i redaktorów oraz prestiż czasopism w których zostały opublikowane, wskazuje, że badania zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone oraz reprezentują wysoki poziom naukowy, stanowiąc tym samym cenny wkład do nauki.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym – oświadczenie AKBE/78/2021. Współautorzy zamieszczonych prac złożyli oświadczenia, w których przedstawili swój wkład, mierzony udziałem procentowym w ich powstaniu oraz wyrazili zgody na wykorzystanie poszczególnych prac jako części rozprawy doktorskiej

Zważywszy, że oryginalne prace badawcze, składające się na rozprawę doktorską, były już poddane ocenie tematyczno-merytorycznej, moja recenzja przygotowanej rozprawy przede wszystkim koncentruje się na kompleksowej ocenie dysertacji zawartej na stronach 28-171 opracowania. Ta część opracowania, zawierająca także włączone do dysertacji prace, jest autorskim opracowaniem Doktorantki, pokazuje bowiem Jej obszerny i

usystematyzowany zasób wiedzy, umiejętności formułowania wniosków i posługiwania się piśmiennictwem naukowym.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Od dwóch dekad obserwuje się wzrost zachorowalności na raka endometrium w tak ujęciu globalnym jak i w Polsce. Niepokojącym zjawiskiem jest także wzrost śmiertelności w tej grupie kobiet oraz coraz częstsze występowanie nowotworu u kobiet przed menopauzą. Obecnie obserwuje się ponad 6 tys. nowych przypadków raka endometrium w Polsce (około 10 tys. w roku 2020) i umieralność na poziomie ok. 30%. Rokowanie zależy od wielu czynników: stopnia zaawansowania klinicznego raka, typu histologicznego, profilu molekularnego – (wprowadzonego do diagnostyki w roku 2013) oraz inwazji naczyń limfatycznych. W leczeniu raka dąży się do personalizacji na podstawie przeprowadzonej diagnostyki.

W tym świetle problematyka podjęta przez Doktorantkę jak wspomniałem wcześniej, wydaje się zarazem interesująca i niezwykle ważna, nie dziwi zatem, że stała się przedmiotem naukowej fascynacji. We wstępie Doktorantka szczegółowo odnosi się do epidemiologii, patogenezy, objawów, diagnostyki oraz leczenia raka endometrium. W części dotyczącej raka endometrium nie można jednak zgodzić się z doktorantką, że podstawowe leczenie...."polega na radykalnej histerektomii z usunięciem przydatków i biopsją węzłów biodrowo-zastonowych".. oraz informacją o historycznym wyróżnianiu 2 typów raka endometrium, co nie jest ze stanem obecnej wiedzy – brak zgodności z rekomendacjami PTGO z roku 2023, na które powołuje się doktorantka. Na stronie 7 ww. rekomendacji jest wzmianka o dwustopniowej klasyfikacji raka trzonu macicy wg Bokhmana. Do podziału na te dwa typy doktorantka odnosi się także przy zbieraniu materiału biologicznego do badań. Niemniej jednak te drobne niedociągnięcia nie umniejszają wartości naukowej i merytorycznej dysertacji.

Na kolejnych stronach lek. Klaudia Klicka wprowadza czytelnika w problematykę mikroRNA. Przedstawia krótki rys historyczny, charakterystykę i rolę cząsteczek mikroRNA oraz ich potencjalnego zastosowania jako biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych. Na podkreślenie zasługuje szczegółowe przeanalizowanie przez doktorantkę wpływu mikroRNA na różne etapy karcinogenezy, w tym na wzrost pierwotnego guza, miejscową inwazję, migrację, proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, angiogenezę i tworzenie guzów przerzutowych, odnosząc się do badań przeprowadzonych w raku piersi oraz raku endometrium. Problematyka będące sednem dysertacji przedstawiona jest obszernie a zarazem zwięźle i przejrzystie.

Główny cel pracy doktorskiej przedstawiony został jasno, zwięźle i logicznie:

- zbadanie roli cząsteczek mikroRNA indukowanych estradiolem na rozwój raka endometrium
- określenie poziomu ekspresji cząsteczek mikroRNA w tkankach raka endometrium i zdrowego endometrium, a następnie
- określenie ich wpływu na komórki raka endometrium w badaniach *in vitro* oraz poznanie mechanizmu oddziaływania na komórki nowotworowe

Cele dodatkowego są ściśle związane z realizowanym projektem i wynikają z celu głównego:

- przegląd literatury na temat roli mikroRNA w regulacji migracji, inwazyjności i przerzutów komórek nowotworowych
- przegląd systematyczny literatury na temat roli mikroRNA w regulacji inwazyjności i przerzutów komórek raka endometrium
- przegląd literatury na temat wpływu rodziny mikroRNA-200 na różne cechy nowotworów zaproponowane przez Hanahana i Weinberga
- identyfikacja indukowanych przez estradiol cząsteczek mikroRNA w komórkach raka endometrium
- zbadanie poziomu ekspresji cząsteczek mikroRNA w tkankach surowiczego i endometrioidalnego raka endometrium oraz w tkankach zdrowego endometrium
- zbadanie wpływu poszczególnych cząsteczek mikroRNA na komórki raka endometrium w badaniach *in vitro*;
- określenie roli mikroRNA jako biomarkerów w modelu raka endometrium;
- zbadanie mechanizmu działania mikroRNA w komórkach raka endometrium

Doktorantka konsekwentnie realizowała założone cele.

Na początku swojego rozwoju naukowego dokonała przeglądu piśmiennictwa na temat roli mikroRNA w patogenezie nowotworów, w tym raka endometrium, co zaowocowało pierwszą publikacją. Dowiadujemy się z niej - co warto podkreślić, że głównym ograniczeniem dotyczącym zastosowania mikroRNA w terapii nowotworów jest złożoność oddziaływań pomiędzy mikroRNA a mRNA, gdyż jedna cząsteczka mikroRNA może mieć wiele docelowych mRNA.

W kolejnym etapie ścieżki naukowej doktorantka dokonała systematycznego przeglądu literatury dotyczący złożonej roli mikroRNA w patogenezie raka endometrium

ze szczególnym uwzględnieniem danych dotyczących zmienionej ekspresji mikroRNA w tkankach i liniach komórkowych raka endometrium, a także ich roli w regulacji inwazji, przerzutów oraz wpływu na wyniki leczenia pacjentów. Szczegółowo omówiono rolę jaką mikroRNA pełnią w komórkach raka endometrium poprzez wpływ na proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, cykl komórkowy, czynniki wzrostu, cytoszkielet, epigenetykę, hormony, szlak sygnałowy PI3K/AKT, apoptozę, macierz pozakomórkową, szlak sygnałowy JAK-STAT, czynniki adhezyjne, angiogenezę, szlak sygnałowy cAMP, i inne

W trzeciej, przeglądowej, publikacji opisano rolę rodziny mikroRNA-200, która pełni głównie rolę supresorową w komórkach nowotworowych poprzez wpływ na zinc-finger E-box binding homeobox (ZEB) i zahamowanie procesu przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). Z publikacji dowiadujemy się, że poziom ekspresji cząsteczek z rodziny mikroRNA-200 jest podwyższony w tkankach raka endometrium w porównaniu do zdrowej tkanki. Dodatkowo poziomy mikroRNA-200a i mikroRNA-141 są podwyższone w surowicy pacjentów chorych na raka endometrium. Omówiono także rolę mikroRNA-200 w regulacji oporności na leczenie.

Na kolejnych stronach dysertacji znajduje się omówienie osiągnięć badawczych doktorantki zebranych w 2 oryginalnych manuskryptach. Są one kontynuacją poszukiwań naukowych autorki i świadczą o harmonijnym rozwoju naukowym. Powstały one na podstawie dobrze ugruntowanej, głębokiej wiedzy i znajomości problematyki. Pierwsza praca odnosi się do patogenezy raka endometrium. Celem jej była ocena ekspresji panelu mikroRNA w komórkach raka endometrium w odniesieniu do prawidłowej tkanki. W przygotowanym materiale tkankowym oceniono poziom ekspresji panelu 16 cząsteczek mikroRNA. Analizie poddano komórki raka endometrium od 18 pacjentek z typem I, 12 pacjentek z typem II raka oraz 15 pacjentek z grupy kontrolnej. Oryginalnym osiągnięciem naukowym doktorantki było stwierdzenie istotnego statystycznie obniżenia poziomu ekspresji mikroRNA-23b, mikroRNA-125b-5p, mikroRNA-199a-3p i mikroRNA-221-3p w tkankach raka endometrium w porównaniu do prawidłowej tkanki. Ponadto stwierdzono, że obniżona ekspresja mikroRNA-23b korelowała z gorszym przeżyciem pacjentów. W kolejnym etapie badania stwierdzono zahamowanie proliferacji komórek raka endometrium po transfekcji syntetycznym mikroRNA-23b. Zastosowanie inhibitora mikroRNA-23b powodowało zwiększoną proliferację transfekowanych komórek linii Ishikawa. Przeprowadzone badanie wskazało cząsteczki mikroRNA, które potencjalnie mogą służyć jako biomarkery choroby, w

szczególności mikroRNA-23b. Doktorantka ostrożnie wyciąga wnioski i wskazuje ograniczenia wynikające ze stosunkowo małej liczebności analizowanych preparatów. Wytycza też dalszy kierunek badań dotyczący zastosowania klinicznego badanych mikroRNA co wydaje się bardzo interesujące.

W kolejnej oryginalnej pracy zbadano rolę indukowanych przez estradiol mikroRNA w raku endometrium. W celu zbadania poziom ekspresji cząsteczek mikroRNA zastosowano szerokospektralną metodę mikromacierzy. Oceniono poziom ekspresji 754 cząsteczek mikroRNA w komórkach raka endometrium, które były uprzednio inkubowane z estradiolem przez 48 godzin. Spośród nich wybrano 26 mikroRNA, których ekspresja wzrosła najbardziej pod wpływem estradiolu. Oryginalnym osiągnięciem doktorantki był zaobserwowany zwiększony poziom ekspresji mikroRNA-182 w tkankach raka endometrium typu I w porównaniu do prawidłowego endometrium, obniżony poziom ekspresji mikroRNA-27b w tkankach raka endometrium typu II w porównaniu do endometrium z grupy kontrolnej oraz obniżony poziom ekspresji mikroRNA-140 w tkankach raka endometrium typu I i typu II w porównaniu do prawidłowego endometrium. Wykazano, że mikroRNA-182 pełni rolę onkomiRNA w komórkach raka endometrium a zahamowanie mikroRNA-182 prowadzi do zwiększonej ekspresji SMAD4, który jest elementem szlaku TGF.

Na uwagę zasługują przejrzyste ryciny oraz tabele umieszczone w publikacjach, które znacznie ułatwiają zrozumienie poruszanej problematyki oraz istotę przeprowadzonych badań oraz uzyskanych wyników. Spotkało się to także z uznaniem ze strony recenzentów prac. Doktorantka wykazała się głęboką znajomością poruszanej w dysertacji problematyki, dojrzałością naukową w projektowaniu modelu badawczego oraz zdolnością do kompleksowej interpretacji uzyskanych przez siebie wyników w odniesieniu do danych literaturowych jak i ograniczeniach prowadzonych badań. W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej zebrano i usystematyzowano dotychczasową wiedzę dotyczącą roli mikroRNA w regulacji inwazyjności i przerzutów komórek nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w modelu raka endometrium.

Dysertacja kończy się podsumowaniem najważniejszych osiągnięć doktorantki w postaci 9 sformułowanych wniosków przedstawionych poniżej.

1. Estradiol wpływa na globalną zmianę poziomu ekspresji cząsteczek mikroRNA w komórkach raka endometrium;
2. Ekspresja miR-23b, miR-125-b-5p, miR-140, miR-199a-3p, miR-221-3p i miR-

451a jest obniżona w tkankach raka endometrium w porównaniu do zdrowego endometrium;

3. Ekspresja miR-34a-5p i miR-146-5p jest wyższa w tkankach raka endometrium typu I w porównaniu do raka endometrium typu II;
4. Ekspresja miR-182 jest podwyższona w tkankach raka endometrium typu I w porównaniu do zdrowego endometrium;
5. Ekspresja miR-27b jest obniżona w tkankach raka endometrium typu II w porównaniu do zdrowego endometrium;
6. Obniżona ekspresja miR-23b jest związana z gorszym rokowaniem u pacjentów;
7. MiR-23b hamuje proliferację komórek raka endometrium linii Ishikawa;
8. MiR-182 zwiększa proliferację komórek raka endometrium linii Ishikawa;
9. Zahamowanie miR-182 powoduje zwiększenie ekspresji SMAD4, który jest członkiem szlaku sygnałowego TGF β .

W mojej opinii wnioski sformułowane są prawidłowo i są wartościowe zarówno z punktu widzenia badacza jak i klinicysty. Kontynuacja badań dotyczących problematyki podjętej przez doktorantkę może przyczynić się do opracowania skutecznych algorytmów diagnostycznych, prognostycznych jak i strategii terapeutycznych w leczeniu raka trzonu macicy.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Klaudii Klickiej charakteryzuje się trafnością wyboru tematyki, która została poddana wnikliwej analizie. W przedstawionym do recenzji cyklu publikacji doktorantka wykazała się szeroką wiedzą i umiejętnością prowadzenia badań naukowych w tym umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii, planowania, formułowania celów badań naukowych oraz wniosków z nich wypływających.

Zawarty w rozprawie cykl publikacji jest spójny tematycznie co warto jeszcze raz podkreślić, analizuje problematykę roli mikroRNA w procesie karcinogenezy ze szczególnym uwzględnieniem raka endometrium. Metodyka badań jest odpowiednia do założonego celu, wykorzystuje adekwatne metody analizy danych literaturowych i uzyskanych wyników, hodowli komórkowych oraz zaawansowanych technik z zakresu biologii molekularnej. Tematyka doktoratu omówiona została szeroko, szczegółowo, wyczerpująco i zarazem przejrzysto. W związku z tym stanowi cenne uzupełnienie piśmiennictwa naukowego w tym zakresie.

Zważywszy na niezwykle istotną i ciekawą tematykę jak i dużą wartość poznawczą przedstawionej do recenzji pracy, jest ona niezwykle cennym uzupełnieniem literatury

przedmiotu i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie. Na podkreślenie zasługuje także całokształt aktywności naukowej Doktorantki (zbiorczy IF 46,776, łączna punktacja MEiN 1135).

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Klaudii Klickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na istotną tematykę podjętych badań w kontekście naukowym, klinicznym jak i społecznym, istotność i oryginalność uzyskanych wyników, które zostały docenione i spotkały się także z pozytywną oceną recenzentów znaczących czasopism naukowych, zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. n. med. Marek Gogacz
specjalista ginekologii i położnictwa