

OCENA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH
I NAUK O ZDROWIU LEKARZA KLAUDII KLINKIEJ PT.:
„ROLA INDUKOWANYCH PRZEZ ESTRADIOL mikroRNA W PATOGENEZIE
RAKA ENDOMETRIUM”.

Nowotwory złośliwe błony śluzowej macicy stanowią istotny z epidemiologicznego punktu widzenia problem zdrowotny. Nowotwór ten, stanowiący bez wątpienia duże wyzwanie w ginekologii onkologicznej ze względu na wzrastającą zachorowalność, najczęściej jest rozpoznawany we wczesnym stadium zaawansowania, czyli w stopniu I wg klasyfikacji FIGO. Jednak, mimo dobrego rokowania, jakie wynikałoby ze stopnia zaawansowania, u części chorych dochodzi do nawrotu i progresji choroby. Klasyczny podział tej choroby uwzględnia jej 2 fenotypy: typ I związany z hyperestrogenizmem oraz typ 2, niezależny od niego. Niemniej podział ten nie do końca odzwierciedla ryzyko nawrotu po leczeniu. Nowa, molekularna klasyfikacja raka endometrium na 4 podtypy trafniej odnosi się do tego problemu. Pokazuje również kierunek, w którym powinny zmierzać wysiłki, aby lepiej przewidywać odpowiedź na leczenie oraz naturalny przebieg choroby w indywidualnych przypadkach. Jednym z narzędzi, które mogą mieć potencjalne znaczenie jako właśnie te czynniki predykcyjne i prognostyczne są mikroRNA, czyli krótkie, jednoniciowe, niekodujące cząsteczki RNA. Ich mechanizm działania polega na zahamowaniu translacji lub degradacji mRNA poprzez wiązanie się cząsteczki mikroRNA do komplementarnych sekwencji w docelowym mRNA. Stąd pełnią ważną rolę w patogenezie wielu chorób, w tym także nowotworów. Cząsteczki mikroRNA mogą pełnić rolę supresorów lub promotorów transformacji nowotworowej przez wpływ na regulację różnych szlaków sygnałowych. W przypadku nowotworów estrogenozależnych do tej pory opisywany był związek szlaków sygnałowych estrogenów z cząsteczkami mikroRNA. Wiedza na temat mechanizmów regulujących działanie tych cząsteczek daje nadzieję na eksplorację nowych, potencjalnie skutecznych markerów mogących mieć znaczenie w terapii pacjentów z chorobą nowotworową. Wskazują na to dotychczasowe badania prowadzone na liniach raka piersi. Natomiast w przypadku drugiego nowotworu estrogenozależnego, jakim jest rak endometrium, takich badań jak dotąd nie prowadzono.

Stąd poznanie roli oraz mechanizmów oddziaływania mikroRNA w raku endometrium stało się przedmiotem zainteresowań badawczych Doktorantki przedstawionych w niniejszej dysertacji.

Pracę doktorską stanowi cykl pięciu publikacji opisujących rolę cząsteczek mikroRNA w patogenezie nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem roli indukowanych przez estradiol mikroRNA w rozwoju raka endometrium. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (ang. *impact factor*) czasopism, w których opublikowano artykuły, wynosi 22,514, a całkowita liczba punktów MEiN to 520. Trzy z tych publikacji to prace poglądowe, w których Doktorantka jest pierwszym (2x) i drugim (1x) autorem. Dwie to prace oryginalne, w których Doktorantka również jest pierwszym autorem. W dwóch pracach jest również autorem korespondencyjnym. Na cykl składają się następujące publikacje:

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.
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.
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
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.
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

Całość dysertacji, obejmująca 203 strony, zawiera przedruki całych publikacji, które stanowią podstawę do oceny badań przeprowadzonych przez Doktorantkę. Wszystkie te prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach o wysokim Impact Factor, co dowodzi znaczenia i jakości całego procesu badawczego przeprowadzonego przez Doktorantkę. Praca uzupełniona jest o **Wstęp** zawierający opis problemu oraz zwięzłe omówienie metod badawczych i uzyskanych wyników, które znalazły się w publikacjach. Ponadto lek. Klaudia Klicka przedstawiła szczegółowo **Założenia i Cele** projektu badawczego, które następnie zostały opatrzone komentarzem w krótkiej **Dyskusji**. Całość kończy podsumowanie w postaci **Wniosków**. Umieszczenie na początku pracy wykazu skrótów oraz streszczenia (również w języku angielskim) jest pomocne i ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z treścią pracy. Dysertacja ma staranne opracowanie graficzne i edytorskie, a tekst napisany jest poprawną polszczyzną. Wartym szczególnego podkreślenia jest fakt, że projekt badawczy zyskał finansowanie z grantu PRELUDIUM 20 Narodowego Centrum Nauki oraz środków własnych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Celem pracy było zbadanie osi estradiol-mikroRNA w komórkach 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. Doktorantka powyżej opisane cele postanowiła zrealizować, odnosząc się do następujących punktów przeprowadzonego projektu:

- a. Przegląd literatury na temat roli mikroRNA w regulacji migracji, inwazyjności i przerzutów komórek nowotworowych;
- b. Przegląd systematyczny literatury na temat roli mikroRNA w regulacji inwazyjności i przerzutów komórek raka endometrium;
- c. Przegląd literatury na temat wpływu rodziny mikroRNA-200 na różne cechy nowotworów zaproponowane przez Hanahana i Weinberga;
- d. Identyfikacja indukowanych przez estradiol cząsteczek mikroRNA w komórkach raka endometrium;
- e. Zbadanie poziomu ekspresji cząsteczek mikroRNA w tkankach surowiczego endometrioidnego raka endometrium oraz w tkankach zdrowego endometrium;
- f. Zbadanie wpływu poszczególnych cząsteczek mikroRNA na komórki raka endometrium w badaniach *in vitro*;

- g. Określenie roli mikroRNA jako biomarkerów w modelu raka endometrium;
- h. Zbadanie mechanizmu działania mikroRNA w komórkach raka endometrium.

Wstęp pracy zawiera zwięzły opis problemu raka endometrium: jego epidemiologii, diagnostyki i leczenia oraz charakterystykę cząsteczek mikroRNA i ich roli w patogenezie nowotworów złośliwych. Dzięki takiemu podejściu czytelnik uzyskuje niezbędne podstawy do dalszego zrozumienia pracy, bez wrażenia, często spotykanego w dysertacjach mniej doświadczonych badaczy, nadmiaru przekazywanych informacji. W dalszej części Wstępu Autorka omawia znaczenie i wyniki kolejnych publikacji stanowiących podstawę dysertacji. W dwóch pierwszych wymienionych wcześniej publikacjach Doktorantka dokonuje prezentacji dotychczasowej wiedzy na temat roli mikroRNA w patogenezie nowotworów, w tym raka endometrium, jako inhibitorów i promotorów inwazyjności przerzutów komórek nowotworowych. Dyskutuje także o roli mikroRNA jako potencjalnych biomarkerów nowotworowych oraz możliwości wykorzystania tych cząstek jako terapeutycznych nośników informacji. Zwłaszcza drugi artykuł, dotyczący złożonej roli mikroRNA w patogenezie raka endometrium, jest starannym opracowaniem z krytycznym wyborem przedstawionych publikacji, gdyż został on przygotowany wg wytycznych PRISMA. W kolejnym artykule przeglądowym opublikowanym w czasopiśmie *Frontiers in Oncology*, 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). W artykule zebrano dane literaturowe na temat poziomu ekspresji rodziny mikroRNA-200 w tkankach różnych typów nowotworów oraz w płynach ustrojowych. Zwrócono uwagę, że poziom ekspresji cząsteczek z rodziny mikroRNA-200 jest podwyższony w tkankach raka endometrium w porównaniu do zdrowej tkanki. Omówiono również ważną rolę mikroRNA-200 w regulacji oporności na leczenie. Ten trzeci artykuł stanowi bezpośrednio wprowadzenie do badań, które Doktorantka przeprowadziła na grupie 45 pacjentek – 30 z rakiem endometrium; 15 pacjentek stanowiło grupę kontrolną. Badania te miały na celu ocenę ekspresji panelu mikroRNA w aspekcie lepszego poznania patogenezy raka endometrium, co zostało określone w założeniach projektu. Aby to osiągnąć, oceniła ekspresję wybranych 16 cząstek rodziny mikroRNA-200, w wyniku czego zidentyfikowała grupę kilku wykazujących obniżoną ekspresję w porównaniu do zdrowych tkanek: *mikroRNA-23b*, *mikroRNA-125b-5p*, *mikroRNA-199a-3p*, *mikroRNA-221-3p* i *mikroRNA-451a*. Ciekawym pomysłem była weryfikacja tej obserwacji z wykorzystaniem

obszernego materiału z bazy TCGA. Co więcej, Doktorantka jako badacz i naukowiec wykazała niezwykle przekonujące podejście do tematu, gdyż te obserwacje poddała dalszej weryfikacji w warunkach *in vitro* na komórkach linii *Ishikawa*. Analiza ta pozwoliła jej zidentyfikować mechanizmy działania mikroRNA-23b oraz jakie szlaki komórkowe są angażowane w działanie tych mechanizmów. Kolejnym etapem badań była próba identyfikacji i analizy cząstek mikroRNA, które są indukowane przez estradiol w komórkach raka endometrium. W tym celu Doktorantka ponownie użyła do badań komórkowej linii *Ishikawa*. Wykazała, że indukowany przez estradiol w komórkach raka endometrium mikroRNA-182 pełni rolę onkomirna i stymuluje proliferację komórek raka endometrium w badaniach *in vitro*, a poziom jego ekspresji koreluje z poziomem ekspresji ważnego czynnika sygnałowego SMAD4. Co więcej, Doktorantce udało się wykazać, że poziom jego ekspresji koreluje z przeżyciem pacjentek z rakiem endometrium – gorsze rokowanie wykazywały te, u których, ekspresja mikroRNA-23b była obniżona w tkankach raka endometrium. Wyniki tych badań zostały opublikowane w ostatniej, wspomnianej wcześniej, oryginalnej publikacji.

W części Podsumowanie i wnioski znajdujemy bardzo zwięzłe odniesienie się do określonych wcześniej założeń i celów projektu. Zdecydowana ich większość, jak przegląd literaturowy, w tym systemowy, zbadanie poziomu ekspresji i wpływu cząstek mikroRNA w tkankach raka endometrium zostały zrealizowane. Powiodła się również próba określenia mechanizmów działania i identyfikacji *in vitro* szlaków komórkowych działania niektórych cząstek mikroRNA w komórkach raka endometrium. Natomiast nie do końca jestem przekonany, że na podstawie takiej grupy badawczej i kontrolnej, pod względem liczebności, można stawiać zdecydowane sformułowania, że estradiol wpływa w jednakowym stopniu na każdy rodzaj cząstek mikroRNA, co sugeruje sformułowanie: „globalnie”. Ponadto nie zostało dość jasno przedstawione, które cząstki mikroRNA zostały zidentyfikowane jako te, na które estradiol ma największy wpływ w kontekście potencjalnych biomarkerów. A taki był jeden z podstawowych celów pracy, jak wynikałoby to z samego jej tytułu. Oczywiście brak takich jasnych i zdecydowanych deklaracji może, i pewnie wynika z ostrożności badawczej Doktorantki. Co należałoby uznać raczej za pozytywny aspekt jej przygotowania i warsztatu badawczego, świadczący o jej ciekawości i dociekliwości jako badacz.

Praca w zasadzie pozbawiona jest słabych stron, stąd nie mam uwag krytycznych. Chciałbym natomiast podkreślić niezwykle dojrzały i staranny warsztat naukowy Doktorantki, jak i cenny wybór samego celu przeprowadzonych badań. Wnioski, jakie wynikają z niniejszej rozprawy,

mogą przełożyć się na praktykę w przyszłości, a co się z tym wiąże, dają szansę na poprawę wyników leczenia tej choroby.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja dotyczy nowatorskiego problemu badawczego, zawiera jasno postawiony cel pracy, demonstruje nowoczesny i profesjonalny warsztat badawczy oraz prawidłowo przedstawia wyniki i wnioski z nich płynące. Wnioski te mają szansę bezpośrednio wpływać na praktykę kliniczną. Stąd uważam, że rozprawa lekarza Klaudii Klickiej pt.: *Rola indukowanych przez estradiol mikroRNA w patogenezie raka endometrium* spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarza Klaudii Klickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie innowacyjny charakter badania, potencjalna możliwość wykorzystania jego wyników w praktyce klinicznej oraz weryfikacja przeprowadzonych badań przez ich publikację w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, skłania mnie do postawienia wniosku o wyróżnienie tej pracy.

ENIGMA

Podpisano elektronicznie przez
Pawel Rosta
31.10.2025
15:38:18 +01'00'