

## OCENA

rozprawy „Analiza poziomu metabolitów witaminy D oraz poziomu ekspresji genów cytochromu P450 i długich niekodujących RNA w rozrostach endometrium u kobiet po menopauzie”

przedstawionej przez lek. Magdalenę Dudę-Wiewiórkę na stopień doktora nauk medycznych

Mimo, że zachorowanie na raka endometrium jest związane z dobrze zdefiniowanymi czynnikami ryzyka nowotwór ten stanowi wciąż rzeczywisty problem i jest poważnym wyzwaniem dla służby zdrowia. We współczesnych społeczeństwach z nadmierną alimentacją i jednoczesnym brakiem nawyków prozdrowotnych, następuje kumulacja czynników ryzyka w postaci cukrzycy, otyłości i nadciśnienia. Stąd niezwykle znaczenie wczesnego rozpoznania i eliminacji czynników ryzyka już na etapie stanów przednowotworowych. Te działania powinny być poparte zarówno oceną kliniczną jak i wiedzą z zakresu mechanizmów molekularnych kancerogenezy w endometrium. Pomimo olbrzymiego postępu nauk podstawowych w zakresie biologii molekularnej i genetyki, mechanizmy onkogenezy w endometrium są poznane jedynie cząstkowo.

Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi interesujące studium przydatności profili metabolomicznych witaminy D oraz ekspresji genów cytochromu P450 i długich niekodujących fragmentów RNA (lncRNA) w rozrostach endometrium u kobiet po menopauzie. W mojej opinii ten innowacyjny nurt badań ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale idealnie wpisuje się w kierunek pracy klinicznej, tym bardziej, że niedobór witaminy D jest powszechny i dotyczy ok. 70% kobiet po menopauzie. Znaczenie witaminy D w rozwoju nowotworów jest szeroko opisane. Jej antykancerogenne działanie wykazane zostało w wielu badaniach, a geny regulowane przez receptory witaminy D (VDR) uczestniczą m. in. w procesach różnicowania komórek, naprawie DNA, w stymulacji apoptozy komórek rakowych i hamowaniu angiogenezy. Polimorfizmy VDR wiążą się z częstszym występowaniem nowotworów złośliwych, cięższym ich klinicznym przebiegiem oraz zwiększonym przerzutowaniem. Biorąc pod uwagę opisane zależności oraz fakt, że rozrosty endometrium poprzedzają raka endometrium ważne jest poznanie znaczenia witaminy D w rozrostach endometrium. Skuteczna wczesna diagnostyka wymaga również zrozumienia metabolicznych podstaw powstania raka endometrium i sięgnięcia po nowoczesne, dostosowane do badania metabolomu techniki diagnostyczne.

Przedstawiona do recenzji praca wpisuje się w kluczowy obszar badawczy metabolomicznych i genetycznych zmian molekularnych w rozrostach endometrium, a obiektem zainteresowania Doktorantki stało się ustalenie związku pomiędzy poziomem witaminy D i jej metabolitami w surowicy kobiet po menopauzie z rozrostem błony śluzowej macicy z atypią i bez atypii, a także określenie różnic w ekspresji wybranych lncRNA oraz miRNA powiązanych z cytochromem P450.

Praca składa się z 7 rozdziałów, które wraz z streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem skrótów, spisem rysunków, tabel, wykresów oraz piśmiennictwem spisanych na 78 stronach. Układ rozprawy jest typowy dla prac na stopień doktora nauk medycznych. Po podziękowaniach następuje przegląd piśmiennictwa naukowego z zakresu etiopatogenezy rozrostów jako rzeczywistego stanu poprzedzającego raka endometrium z uwzględnieniem epidemiologii, histopatologii, czynników genetycznych i epigenetycznych, co z punktu widzenia klinicysty daje możliwość przełożenia wyników badań molekularnych na działania kliniczne. Wiedza na temat korelacji pomiędzy szeroko pojętymi stanami przednowotworowymi endometrium, szczególnie w przypadku kobiet po menopauzie, jest o tyle istotna gdyż dyktuje zakres nadzoru oraz postępowania klinicznego. Ten rozdział dysertacji został dobrze skomponowany w sensie proporcji pomiędzy częścią *stricte* kliniczną a stanem wiedzy z zakresu zmian molekularnych w związku z niedoborem witaminy D i VDR i ich rolą w onkogenezie endometrium. Niewątpliwą zaletą tej części rozprawy jest umiejętność selekcji i gradacji ważności danych z rozległego przecież piśmiennictwa z zakresu badań molekularnych w rozrostach i raku endometrium. Sprawia to, że obok walorów naukowych rozdział ten posiada walory dydaktyczne, zwłaszcza, że jest napisany w logicznym porządku i jednoznacznie.

Rozdział drugi rozprawy formułuje cele pracy. Sformułowanie celu pracy wynika z fragmentaryczności danych piśmiennictwa o sekwencji zdarzeń molekularnych związanych z czynnością receptora witaminy D, ale także pojawia się przesłanka o możliwości personalizacji leczenia pacjentek z rozrostem i rakiem endometrium. Innym celem Doktorantki była próba korelacji mikroskopowych zmian morfologicznych (rozrostu endometrium z i bez atypii) ze zmianami poziomów metabolitów witaminy D w surowicy badanych kobiet. Forma prezentacji jest dosyć lakoniczna, brakuje mi hipotezy badawczej, ale jednoznaczna w zakresie celów pracy.

Część materiałowo-metodyczna zawarta w rozdziale trzecim jest precyzyjnie, a jednocześnie jednoznacznie zaplanowana. W poszczególnych grupach pacjentek liczba badanych wynosiła 51 kobiet po menopauzie konsultowanych w Poradni Ginekologii

Onkologicznej i Profilaktyki Nowotworów Narządu Płciowego oraz hospitalizowanych w Oddziale Klinicznym Ginekologii i Onkologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Badanie zostało wykonane w okresie od 1 maja 2019 do 28 lutego 2022 roku. Grupa kobiet, u których wykonano ocenę metabolitów witaminy D to 44 pacjentki; w tym 30 kobiet z rozrostem z atypią i 14 z rozrostem bez atypii. W podgrupie pacjentek, u których dokonano analizy ncRNA, długość telomerów oraz analizy uszkodzenia DNA znalazło się 51 kobiet; 30 z rozrostem z atypią i 23 kobiety z rozrostem bez atypii. Grupę kontrolną stanowiły 54 zdrowe kobiety w wieku 48-68 lat. W pierwszym etapie wykonano analizę genetyczną, epigenetyczną i metaboliczną. Analiza długiego, niekodującego RNA, uszkodzenia DNA, genów kodujących enzymy biorących udział w metabolizmie witaminy D oraz analizę długości telomerów wykonano w Zakładzie Diagnostyki Genetycznej Katedry Biochemii Klinicznej CMUJ. Analizę analogów witaminy D: 25-OH wit.D3, 25-OH wit.D2, 1,25-diOH wit.D3 z surowicy kobiet z dwoma typami rozrostów endometrium przeprowadzono w Laboratorium Spektrometrii MAS i Pracowni Leków i Metabolitów – Instytut Biochemii i Biofizyki PAN. Do badań wykorzystano spektrometr mas Waters Xevo TQ-MS posiadający potrójny kwadropol z jonizacją ESI sprzężony z chromatografem cieczowym Waters Acquity UPLC, a analizę chromatogramów przeprowadzono z użyciem oprogramowania TargetLynx. W końcowej fazie badania wykonano kompleksową bioinformatyczną i statystyczną analizę danych.

W rozdziale piątym, a właściwie czwartym (nie znajduję rozdziału czwartego) Doktorantka przedstawiła szczegółową, a jednocześnie jasną i dobrze opracowaną pod względem graficznym prezentację wyników badań w relacji do wybranych parametrów kliniczno-histopatologicznych analizowanych tkanek. Doktorantka nie zaobserwowała związku pomiędzy poziomem witaminy D a obecnością rozrostu endometrium z atypią. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie dwóch metabolitów witaminy D tj. 25-OH D2 i 1,25-diOH D3 u kobiet z hiperplazją z atypią i bez atypii. LncRNA podobnie jak KCNMB2-AS1, MIR205HG, RP11-357H14.17 wykazały wyższą ekspresję w grupie rozrostów z atypią. W grupie z atypią wykazano nadekspresję whsa-miR-26a-5p oraz miR-27b, co może mieć związek z hamowaniem składowych cytochromu P450 i niższym poziomem aktywnych metabolitów witaminy D. Analiza długości telomerów wykazała tylko tendencje do skracania się w grupie rozrostów z atypią. Na podkreślenie zasługuje umiejętnie zaprezentowana analiza statystyczna (liczbowa i graficzna) uzyskanych wyników.

Rozdział szósty rozprawy stanowi obszerna (ponad 9 stron) i umiejętnie napisana dyskusja porównująca i interpretująca uzyskane przez Doktorantkę wyniki na tle

dotychczasowych danych piśmiennictwa światowego. Ciekawym fragmentem tego rozdziału jest część, w której Doktorantka odnosi się do wyjściowo znacznego niedoboru witaminy D przy braku jednoznacznego związku pomiędzy poziomem witaminy D a obecnością rozrostu endometrium z atypią. Fakt ten weryfikuje z wynikami innych badaczy. Nie potwierdzono również istotnych różnic w poziomie dwóch innych metabolitów witaminy D tj. 25-OH wit.D2 oraz 1,25-diOH wit.D3 u kobiet z obecnością rozrostu z atypią oraz bez atypii. Co zastanawiające to fakt, iż w grupie pacjentek z atypią stwierdzono wysoką, bo aż 56,7% obecność raka endometrium w materiale pooperacyjnym. Pomimo braku stwierdzenia związku pomiędzy poziomem metabolitów wit. D a atypowym rozrostem endometrium Doktorantka stwierdza, iż wyniki uszkodzenia DNA, długość telomerów w badanej grupie mogą wskazywać na współistnienie niedoboru witaminy D i pozostałych ocenianych zmiennych może sprzyjać i promować procesy transformacji nowotworowej. Stwierdzenie to wydaje mi się dość intencjonalne, gdyż nie jest poparte wynikami przeprowadzonego badania. W rozdziale tym brakuje mi omówienia przez Doktorantkę ograniczeń badania. Brakuje mi krytycznego podejścia do swoich wyników biorących pod uwagę m. in. ograniczenia badania, a także wytyczenia szlaków dalszych badań w tym zakresie. Wskazanie kierunków dalszych badań tego interesującego zagadnienia byłoby ciekawym zakończeniem tego rozdziału.

Wnioski końcowe sformułowane w rozdziale siódmym są jednoznaczne i w znajdują uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych badań, choć w większości są powtórzeniem wyników, a niektóre elementy zawarte we wnioskach wydają się być intencjonalne, nie do końca poparte wynikami badań własnych. Zdaniem recenzenta, Doktorantka została uprawniona do ich postawienia, tym niemniej jak powiedziano powyżej wymaga to dalszych badań potwierdzających wyniki uzyskane przez Doktorantkę.

Rozdział siódmy (po raz kolejny, odpowiednio 7.1 i 7.2) stanowi krótkie, ale zawierające wszystkie niezbędne informacje, streszczenia w języku polskim i angielskim. Na kolejnych stronach rozprawy w rozdziale 8 umieszczone zostały wykaz skrótów zawartych w pracy, a rozdział 9,10, 11 to spis rysunków (w liczbie 5), tabel (10 tabel) i wykresów (6 wykresów). Rozdział 12 to spis aktualnego i historycznego piśmiennictwa, stanowi istotne i cenne wzbogacenie prezentowanej pracy i liczy 131 pozycji, w tym 37 z ostatnich pięciu lat. Przy pracy numer 18 zauważyłem brak roku ukazania się pracy, a 64 tytuł wyróżniony jest dużą czcionką.

Mimo, że rozprawa napisana jest poprawnym językiem, Doktorantka nie ustrzegła się kilku uchybień interpunkcyjnych, stylistycznych - slangowych na przykład: waga – a chodzi o masę ciała (str. 27, drugi akapit). Podobny błąd powtarza Doktorantka na stronie 47 (drugi

akapit) oraz stronie 56 (wniosek 5). Proponuję „ilość ciąż i porodów” zastąpić liczbą ciąż i porodów (jako rzeczowniki policzalne, str. 27). Na stronie 47 i 48 zauważyłem trzykrotne zastosowanie nieadekwatnego terminu „przerost endometrium”, winno być rozrost endometrium, a w rozdziale pt. Cele badania (str. 25) proponuję zastąpić termin „nieprawidłowym rozrostem błony śluzowej macicy...” określeniem rozrostem błony śluzowej macicy. W miejsce potocznie stosowanego terminu „lepszy biomarker” proponuję zastosować termin korzystniejszy biomarker (str. 54 drugi akapit). Błędy te w większości zostały zaznaczone w tekście recenzowanej pracy i powinny być uwzględnione w redakcji ostatecznej wersji.

#### Wnioski końcowe

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska zawiera wartościowy materiał badawczy, metodycznie dobrze opracowany, jasno i jednoznacznie opisany i stanowi oryginalne opracowanie problemu naukowego. Wyniki przeprowadzonych badań zostały ciekawie przedyskutowane na tle aktualnego piśmiennictwa, a Doktorantka wykazała się umiejętnościami samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Biorąc pod uwagę całość rozprawy stwierdzam, że spełnia ona ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim i tym samym jest podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych UJ wniosek o dopuszczenie lek. Magdaleny Dudy-Wiewiórki do dalszych części przewodu doktorskiego.

Katowice, 5 sierpnia 2024r.  
Andrzej Niek