



**KATEDRA POŁOŻNICTWA I GINEKOLOGII**  
WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE  
Collegium Maximum  
ul. Staszica 4-6, 20-081 Lublin  
tel. 81 448 68 92; e-mail: zak.poligin@umlub.pl

---

Lublin, 8 sierpnia 2023

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej lek. med. Anny Zubrzyckiej**

**pt. „Ocena ekspresji wybranych genów oraz mikro-RNA regulujących przejście epitelialno- mezenchymalne (*ang. Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT*) jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych w endometriozie”**

### **PROMOTOR:**

Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzezińska-Lasota  
Kierownik Katedry Biologii i Mikrobiologii Medycznej Kierownik Zakładu  
Biomedycyny i Genetyki UM w Łodzi

### **PROMOTOR POMOCNICZY:**

Dr n. med. Monika Migdalska-Sęk  
Zakład Biomedycyny i Genetyki UM w Łodzi

Posiadanie potomstwa jest najważniejszym celem biologicznym człowieka, warunkującym przetrwanie ludzkiego gatunku. Problemy prokreacyjne utrudniają uzyskanie ciąży prawie co piątej parze w Polsce, a podobne zjawisko obserwuje się niemal na całym świecie. W związku z tym faktem Światowa Organizacja Zdrowia uznała niepłodność za chorobę cywilizacyjną. Przyczyny tak częstego występowania problemów prokreacyjnych nie są w pełni poznane. Niewątpliwie za znaczną część niepowodzeń rozrodu odpowiada endometrioza. Endometrioza jest przewlekłą, estrogenozależną chorobą polegającą na występowaniu tkanki endometrium poza jamą macicy, co w wielu przypadkach wiąże się z bólem i/lub niepłodnością. Choroba ta dotyka 6-10% kobiet w wieku rozrodczym. Do chwili obecnej nie określono jednoznacznie jej patogenezę, ani nie opracowano w pełni skutecznego biomarkera i schematu leczenia. Zatem należy stwierdzić, że Autorka podjęła się ważnego dla medycyny rozrodu opracowania naukowego dotyczącego oceny ekspresji wybranych genów oraz mikro-RNA regulujących przejście epitelialno- mezenchymalne (*ang. Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT*) jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych w endometriozie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 140 stron maszynopisu, a jej bibliografia zawiera 259 pozycji dobranych poprawnie, głównie najnowszych publikacji dotyczących

omawianego zagadnienia. Rozprawa składa się z trzech ściśle ze sobą powiązanych artykułów naukowych z wysoko cenionych czasopism z IF: 2,979; 6,208 oraz 6,208.

Układ pracy można nazwać konwencjonalnym, powszechnie przyjętym w dysertacjach doktorskich opartych na artykułach naukowych z dziedziny medycyny i nauk o zdrowiu. Zawiera bowiem, za spisem treści: wstęp, który jest niezbędny do uzyskania właściwych informacji wprowadzających czytelnika w problematykę podjętych badań, dobrze przedstawione cele i założenia pracy, materiał, metody, organizację i przebieg badań, wyniki przeprowadzonych badań, omówienie wyników, omówienie prac będących przedmiotem rozprawy oraz wnioski. Na końcu znajdują się oświadczenia współautorów o ich udziale w załączonych artykułach. Świadczą one o bardzo istotnym wkładzie Autorki w przeprowadzenie badań. Przywołane części stanowią logicznie powiązaną całość.

Założenia i cele pracy są ciekawe, zrozumiałe i prawidłowo sformułowane. Za cel główny Autorka przyjęła dokonanie analizy przydatności wybranych genów/miRNA uczestniczących w procesie EMT jako potencjalnych molekularnych biomarkerów diagnostycznych w endometriozie.

#### **Do celów szczegółowych postawionych w niniejszej pracy doktorskiej należało:**

Ocena poziomu ekspresji genów: *TGF-β1*, *SMAD3*, *SMAD4*, *ILK*, *BMP7* i *CDH1* w sparowanej tkance eutopowej i ektopowej endometrium oraz w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) pacjentek z rozpoznaną endometriozą w odniesieniu do grupy kontrolnej. Ocena ekspresji miR-21-5p i miR-542-3p w sparowanej tkance eutopowej i ektopowej endometrium oraz w PBMC pacjentek z rozpoznaną endometriozą w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Ocena zależności pomiędzy poziomami ekspresji badanych genów a ekspresją regulatorowych miRNA.

Analiza korelacji poziomów ekspresji badanych genów i miRNA z obrazem klinicznym choroby: wiekiem w chwili rozpoznania, stopniem zaawansowania endometriozy (według klasyfikacji rASRM), objawami bólowymi miednicy mniejszej (według numerycznej skali ocen – NRS), fazami cyklu miesięczkowego oraz stężeniami markerów biochemicznych: CA125 i HE4. Na podstawie uzyskanych wyników badań Autorka wykazała znamienne różny wzór ekspresji badanych genów (*TGF-β1*, *SMAD3*, *SMAD4*, *ILK*, *BMP7*, *CDH1*) oraz miR-21 i miR-542-3p pomiędzy sparowaną tkanką eutopową i ektopową kobiet z endometriozą, który wskazuje na zmianę fenotypu molekularnego komórek nabłonka endometrium w przebiegu choroby. Uzyskane wyniki sugerują regulacyjną rolę miR-21 dla *TGF-β1* – głównego promotora EMT, z kolei miR-542-3p może bezpośrednio celować w sygnalizację BMP biorącej udział w decydującym u kobiet z endometriozą. Niniejsza rozprawa podkreśla kluczową rolę osi miR-21-TGF-β1-SMAD3-ILK oraz miR-542-3p-BMP7-SMAD4-CDH1 w złożonym mechanizmie molekularnym

pozostającym u podłoża etiopatogenezy endometriozy. Przedstawiony do oceny cykl publikacji dostarcza również dowodów, że ekspresja krążącego miRNA (np. miR-200, miR-let-7, miR-20a, miR-199a, miR-143 oraz miR-145) jest symptomatyczna dla choroby, z wyraźnie inną ekspresją u kobiet dotkniętych endometriozą niż u osób zdrowych. Ocena profilu ekspresji miRNA, szczególnie w panelu z genami nie tylko otwiera nowe horyzonty w zrozumieniu zdarzeń molekularnych zaangażowanych w patogenezę i patomechanizm endometriozy, ale również cząsteczki te mają potencjał jako biomarkery choroby w kontekście próby opracowania nieinwazyjnego narzędzia diagnostycznego.

Metody badawcze zastosowane w artykułach uważam za właściwie dobrane. Dla dobrego zrozumienia zostały one opisane w pracy. Pozytywne wrażenie sprawia metodologia badań zilustrowana prawidłowo w artykułach. Wiarygodność uzyskanych wyników potwierdza starannie przeprowadzona analiza statystyczna.

Wyniki badań przedstawione są w sposób przejrzysty, do czego przyczyniło się też prawidłowe określenie teoretyczne obszaru, w jakim poruszała się Autorka.

Przeprowadzona przez Doktorantkę dyskusja jest napisana prawidłowo i świadczy o dojrzałości naukowej Autorki. Na podstawie poprawnie przeprowadzonych analiz Doktorantka wyciągnęła trzy wnioski odpowiadające postawionym celom badawczym.

1. Heterogeny wzór ekspresji badanych genów (*TGF-β1*, *SMAD3*, *SMAD4*, *ILK*, *BMP7*, *CDH1*) i miRNA (miR-21-5p, miR-542-3p) w tkance eutopowej i ektopowej sugeruje utratę fenotypu nabłonka endometrium u kobiet z endometriozą i podkreśla ich kluczową rolę w rozwoju i utrzymaniu się zmian endometrialnych.
2. Znacząco podwyższone poziomy ekspresji miR-21-5p i miR-542-3p z jednoczesnym obniżeniem transkryptów mRNA *TGF-β1*, *SMAD3*, *SMAD4*, *ILK*, *BMP7*, *CDH1* w ogniskach endometrialnych świadczą o supresyjnej funkcji badanych miRNA, przy czym miR-21-5p został zidentyfikowany jako potencjalny regulator osi TGF-β1-SMAD3-ILK a miR-542-3p sygnalizacji BMP7-SMAD4-CDH1 związanych z EMT w endometriozie.
3. Wykonany przegląd systematyczny doniesień wraz z wynikami eksperymentalnymi badań własnych dostarczają dowodów, że ocena profilu ekspresji miRNA, szczególnie w panelu z genami otwiera nowe horyzonty w zrozumieniu patogenetycznych zdarzeń molekularnych pozostających u podłoża endometriozy jak i będą podstawą do opracowania nowych narzędzi diagnostycznych.

Wnioski wysunięte przez Doktorantkę wnoszą wybitny wkład do dziedzin nauki związanych ze zdrowiem reprodukcyjnym. Takie obserwacje są ważne z punktu widzenia możliwości diagnostyki jednostki chorobowej, jaką jest endometrioza. Jest to szczególnie ważne z punktu widzenia lekarza starającego się pomóc w uzyskaniu ciąży pacjentce borykającej się z tym schorzeniem z dwóch powodów. Po pierwsze uświadomienie parze, że mamy do czynienia z

endometriozą jest wskazaniem do szybszego zastosowania technik rozrodu wspomaganego (ART) i nie marnowania czasu reprodukcyjnego kobiety. Po drugie pozwala uniknąć interwencji operacyjnej, której efekty czasami obniżają skuteczność ART poprzez uszkodzenie tkanki jajnika prowadzące do obniżenia ilości i jakości oocytów uzyskiwanych podczas procedury zapłodnienia pozaustrojowego.

Należy wspomnieć, że poszukiwania podobne jak Autorka poczynili nasi rodacy, publikując je przez Żeberkiewicz M, Hyc A, Iwan A, Zwierzchowska A, Ścieżyńska A, Kalaszczyńska I, Barcz E, Malejczyk J. Expression of Fucosyltransferase 4 (*FUT4*) mRNA Is Increased in Endometrium from Women with Endometriosis. J Clin Med. 2022 Sep 23;11(19):5606. doi: 10.3390/jcm11195606. PMID: 36233470; PMCID: PMC9572337. Publikacja ta stała się podstawą do wdrożenia tego badania jako badania komercyjnego przez firmę Diagnostyka. Badania nad komercyjnymi testami endometriozy prowadzi także prof. Piotr Laudański.

Reasumując merytoryczna strona pracy zasługuje na uznanie i nie budzi poważnych zastrzeżeń. Mam jednak pewne uwagi dotyczące metodologii. W mojej ocenie w grupie kontrolnej jest zbyt duży przedział wiekowy pacjentek. Uważam także, że badanie powinno być prowadzone w tej samej fazie cyklu. Mam też pytania do Autorki, na które odpowiedzi nie znalazłem w dysertacji:

1. Jak wykluczono endometriozę wśród kobiet z grupy kontrolnej, u których wykonano tylko histeroskopię bez laparoskopii?

2. Czy wykonywano histeroskopię w fazie wydzielniczej? Praktycznie jest to trudne.

Biorąc pod uwagę kobiety z grupy kontrolnej to były to pacjentki leczone z powodu mięśniaków macicy, co jest pewną niedoskonałością, ale zdaję sobie sprawę, że namówienie zupełnie zdrowej pacjentki do uczestnictwa w tym badaniu byłoby raczej niemożliwe. Uważam, że moje drobne uwagi dotyczące metodyki, nie umniejszają w żaden sposób merytorycznej wartości rozprawy.

Praca od strony redakcyjnej przygotowana została poprawnie, układ jest czytelny i nie zaburza logiki rozumowania. Doktorantka dysertacją przedstawioną do recenzji dowiodła swoją dojrzałość naukową i badawczą.

Podsumowując, stwierdzam, że praca będąca przedmiotem niniejszej recenzji jest innowacyjna i wykonana została dużym nakładem pracy, co odzwierciedlone zostało zarówno w zastosowanych technikach badawczych jak i starannej i przejrzystej formie dysertacji. Dowodzi to, że Doktorantka potrafi samodzielnie rozwiązać wybrany przez siebie problem naukowy, realizując założone cele. Przedstawiona mi do recenzji dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom naukowym na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne określone w *Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz*

postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz. 1669), stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a Doktorantka wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną w danej dyscyplinie naukowej oraz posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę zatem o dopuszczenie **lek. med. Anny Zubrzyckiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego

p. o. Kierownika  
Zakładu Położnictwa i Ginekologii  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
*Aneta Włodarczyk*  
prof. dr hab. n. med. Aneta Włodarczyk