

UNIwersytet Rzeszowski

Collegium Medicum

Wydział Medyczny



lek. med. Anna Bogaczyk

**Znaczenie kliniczne zmian ekspresji wybranych mikroRNA
w diagnostyce i leczeniu raka endometrium**

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

Promotor: prof. dr hab. Tomasz Kluz

Promotor pomocniczy dr n. med. Natalia Potocka

Rzeszów 2025

**Pragnę serdecznie podziękować osobom, bez których wsparcia
i zaangażowania niniejsza rozprawa nie mogłaby powstać**

Szczególne podziękowania kieruję do
Pana Prof. dr. hab. n. med. Tomasza Kluza
za inspirację, motywację, nieocenione wsparcie, za zaangażowanie
i za umożliwienie nauki, która potrafi być fascynująca i zaskakująca.

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania mojemu
promotorowi pomocniczemu,
Pani Dr n. med. Natalii Potockiej
za nieocenione wsparcie, cierpliwość i merytoryczne wskazówki,
które prowadziły mnie na każdym etapie pracy podczas pisania
artykułów i niniejszej rozprawy doktorskiej.

Serdeczne podziękowania kieruję do
Pani Prof. dr hab. n. med. Izabeli Zawlik
za cenne wskazówki, wsparcie i wiedzę.

Pragnę również podziękować mojemu mężowi
Krzysztofowi Bogaczykowi
za wsparcie, miłość, przyjaźń, za wyrozumiałość i za to, że jesteś
zawsze przy mnie, gdy Cię potrzebuję.

Badania zostały sfinansowane ze środków przyznanych na działalność statutową uczelni numery sygnatur: INM/03/2023, INM/06/2024, WMED/06/2025 i WMED/17/2025.

Badania zrealizowano w Laboratorium Biologii Molekularnej Przyrodniczo-Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych *Collegium Medicum* Uniwersytetu Rzeszowskiego we współpracy z Kliniką Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Chopina w Rzeszowie.

Spis treści

<i>Wykaz zastosowanych skrótów:</i>	5
1. WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	8
2. WPROWADZENIE	9
2.1. RAK ENDOMETRIUM: CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA, KLASYFIKACJA MOLEKULARNA ORAZ ZNACZENIE MIKRORNA W PATOGENEZIE TEGO NOWOTWORU	9
2.2. ZNACZENIE MIKRORNA W KANCEROGENEZIE I W RAKU ENDOMETRIUM.....	12
2.3. OMÓWIENIE WYBRANYCH MIKRORNA	16
2.3.1. <i>MikroRNA-205-5p</i>	16
2.3.2. <i>MikroRNA 222-3p</i>	18
2.3.3. <i>MikroRNA 21-5p</i>	20
3. CELE PRACY	23
4. MATERIAŁY I METODY	24
4.1. GRUPA BADANA	24
4.2. METODY	25
4.2.1. <i>Izolacja mikroRNA z tkanki</i>	25
4.2.2. <i>Izolacja mikroRNA z surowicy</i>	25
4.2.3. <i>Odwrotna transkrypcja</i>	26
4.2.4. <i>Analiza poziomu ekspresji metodą dPCR</i>	26
4.2.5. <i>Analiza statystyczna</i>	28
5. WYNIKI	30
5.1. PUBLIKACJA PRZEGLĄDOWA: „THE ROLE OF MI RNAs IN THE DEVELOPMENT, PROLIFERATION, AND PROGRESSION OF ENDOMETRIAL CANCER”	30
5.2. PUBLIKACJA ORYGINALNA: „ABSOLUTE QUANTIFICATION OF SELECTED MICRORNAs EXPRESSION IN ENDOMETRIAL CANCER BY DIGITAL PCR”	56
5.3. PUBLIKACJA ORYGINALNA: „MiR-205-5P AND MiR-222-3P AS POTENTIAL BIOMARKERS OF ENDOMETRIAL CANCER”	84
6. WNIOSKI	105
7. STRESZCZENIE	107
8. SUMMARY	109
9. PIŚMIENNICTWO	111
10. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	118
11. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ	130

Wykaz zastosowanych skrótów:

AGO2: składnik katalityczny RISC 2 argonaute (ang. Argonaute 2, catalytic component of RISC)

ARID5B: domena interakcji bogata w AT 5B (AT-rich interaction domain 5B)

asRNA antysensowne RNA (ang. antisense RNA)

BMI: wskaźnik masy ciała (ang. Body Mass Index)

BRAF: Protoonkogen B-Raf, kinaza serynowo-treoninowa (ang. B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)

ceRNA: konkurujący endogenny RNA (ang. competing endogenous RNA)

CDKN1C: inhibitor kinazy zależny od cykliny 1C (ang. cyclin dependent kinase inhibitor 1C)

circRNA: koliste RNA (ang. Circular RNA)

dPCR: cyfrowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. digital Polymerase Chain Reaction)

EC: rak endometrialny (ang. Endometrial Cancer)

EMT: przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. pithelial-mesenchymal transition)

EOC: nabłonkowy rak jajnika (ang. Epithelial Ovarian Cancer)

ERK: kinaza regulowana pozakomórkowo (ang. Extracellularly Regulated Kinase)

FBXO11: członek podrodziny F-box (ang. F-box protein 11)

FIGO: Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa (ang. The International Federation of Gynecology and Obstetrics)

FOXO1: białko Forkhead 01 (ang. Forkhead box 01)

GAS5: transkrypt specyficzny dla zatrzymania wzrostu 5 (ang. Growth Arrest Specific 5)

GNAI2: podjednostka alfa G-białka hamująca aktywność i2 (ang. G protein subunit alpha i2)

JPH4: juntofilina 4 (ang. junctophilin 4)

lncRNA: długie niekodujące RNA (ang. long noncoding RNA)

L1CAM: cząsteczka adhezji komórkowej L1 (ang. L1 cell Adhesion Molecule)

MAPK: kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. mitogen activated kinase-like protein)

MEG3: gen 3 wyrażony po matce (ang. maternally Expressed Gene 3)

miRISC: kompleks wyciszający indukowany przez miRNA (ang. miRNA-induced silencing complex)

miRNA: mikroRNA (ang. microRNA)

MMP2: metaloproteinaza macierzy 2 (ang. matrix metalloproteinase 2)

MMP9: metaloproteinaza macierzy 9 (ang. matrix metalloproteinase 9)

MMRd: niedobór naprawy niedopasowania (ang. mismatch repair deficient)

MSI: niestabilność mikrosatelitarna (ang. Microsatellite Instability)

NBTA1: długi niekodujący transkrypt RNA związany z neuroblastomą 1 (ang. long noncoding RNA neuroblastoma-associated transcript 1)

ncRNA: niekodujące RNA (ang. noncoding RNA)

NF- κ B: czynnik jądrowy kappa B (ang. nuclear factor kappa B)

NSMP: niespecyficzny profil molekularny (ang. non-specific molecular profile)

PCOS: zespół policystycznych jajników (ang. polycystic ovary syndrome)

PIK3CA: podjednostka katalityczna kinazy fosfatydyloinozytolu-3,4,5-trifosforanu, (ang. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha)

PIK3R1: podjednostka regulacyjna kinazy fosfatydyloinozytydu-3 (ang. phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1)

piRNA: RNA wiążące się z białkiem PIWI (ang. piwi-interactive RNA)

PTEN: homolog fosfatazy i tensyny (ang. phosphatase and tensin homolog)

rRNA: rybosomalne RNA (ang. ribosomal RNA)

SNORD48: małe jąderkowe RNA, pole C/D 48 (ang. Small Nucleolar RNA, C/D Box 48)

snoRNA: małe jąderkowe RNA (ang. small nucleolar RNA)

snRNA: małe jądrowe RNA (ang. small nuclear RNA)

SOX17: czynnik transkrypcyjny SOX17 związany z regionem SRY (ang. SRY-related HMG-box)

STAT3: przetwornik sygnału i aktywator transkrypcji 3 (ang. Signal Transducer and Activator of Transcription 3)

TCGA: atlas genomu raka (ang. The Cancer Genome Atlas)

TNM: system oceny stopnia zaawansowania nowotworu (ang. Tumor, Nodus, Metastases)

tRNA: transportowe RNA (ang. transport RNA)

TRPS1: represor transkrypcyjny wiążący GATA 1 (ang. transcriptional repressor GATA binding 1)

TSHR: receptor hormonu tyreotropowego (ang. Thyroid Stimulating Hormone Receptor)

U6: (RNU6-1) RNA, mały jądrowy RNA (ang. small nuclear RNA)

ZEB1: homeoboks1 wiążący E-box z cynkowym palcem (ang. zinc finger E-box binding homeobox 1)

ZEB2: homeoboks2 wiążący E-box z cynkowym palcem (ang. zinc finger E-box binding homeobox 2)

1. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

Publikacja	IF	Punkty MNiSW
<p>Bogaczyk A, Zawlik I, Zuzak T, Kluz M, Potocka N, Kluz T. The Role of miRNAs in the Development, Proliferation, and Progression of Endometrial Cancer. Int J Mol Sci. 2023 Jul 15;24(14):11489. doi: 10.3390/ijms241411489. PMID: 37511248 Free PMC article. Review.</p>	4.9	140
<p>Bogaczyk A, Potocka N, Paszek S, Skrzypa M, Zuchowska A, Kośny M, Kluz M, Zawlik I, Kluz T. Absolute Quantification of Selected microRNAs Expression in Endometrial Cancer by Digital PCR. Int J MolSci. 2024 Mar. 14;25(6):3286. doi:10.3390/ijms25063286. PMID: 38542261.</p>	4.9	140
<p>Bogaczyk A, Potocka N, Paszek S, Skrzypa M, Zuchowska A, Kośny M, Kluz-Barłowska M, Wróbel A, Wróbel J, Zawlik I, Kluz T. MiR-205-5p and MiR-222-3p as Potential Biomarkers of Endometrial Cancer. Int J Mol Sci. 2025 Mar 14;26(6):2615. doi: 10.3390/ijms26062615. PMID: 40141259; PMCID: PMC11941963.</p>	4.9	140

2. Wprowadzenie

2.1. Rak endometrium: charakterystyka kliniczna, klasyfikacja molekularna oraz znaczenie mikroRNA w patogenezie tego nowotworu

Rak endometrium (EC) jest szóstym najczęściej diagnozowanym nowotworem u kobiet na świecie [1]. Jest drugim najczęściej występującym nowotworem żeńskich narządów płciowych [2]. W 2020 r. zdiagnozowano 417 367 EC na całym świecie. Jego częstość występowania wynosi 12,9–20,2 na 100 000 kobiet, a współczynnik śmiertelności 2,0–3,7 na 100 000 kobiet [3].

Częstość zachorowania na raka endometrium ma tendencję wzrostową, najwięcej zachorowań odnotowuje się w krajach Ameryki Północnej i Europy, gdzie jest to najczęstszy nowotwór żeńskich narządów płciowych. Wysoki współczynnik zapadalności można przypisać dużej częstości występowania czynników ryzyka EC związanych ze stylem życia, takich jak wysoki standard życia, starzenie się populacji, otyłość i brak aktywności fizycznej, które są związane z około 50% przypadków EC [1,4]. Według European Cancer Observatory wskaźnik zapadalności na raka endometrium gwałtownie rośnie i szacuje się, że do 2040 r. wzrośnie o ponad 50% na całym świecie. Odnotowano także, że wskaźnik ten ma tendencję wzrostową w USA i kilku krajach europejskich od około 2000 r. [5].

Rozpoznanie EC stawia się na podstawie wyniku histopatologicznego uzyskanego poprzez biopsję aspiracyjną endometrium lub wyłyżeczkowanie jamy macicy poprzedzonego lub nie histeroskopią [6].

Wyróżnia się kilka rodzajów klasyfikacji EC. Najstarszym historycznym podziałem jest podział morfologiczny, według dualistycznej teorii Bokhmana, gdzie EC klasyfikowano jako typ I, tzw. endometrioidalny, który jest związany z nadmierną stymulacją estrogenową, występuje głównie u kobiet otyłych z zespołem policystycznych jajników (PCOS) i cyklami bezowulacyjnymi. Może również wystąpić u kobiet z predyspozycjami genetycznymi, np. zespół Lyncha. Typ ten rozwija się na podstawie hiperplazji endometrium. Typ I EC jest częstszy, ma korzystne rokowanie i stanowi 80–90% przypadków raka endometrium. Natomiast typ II (nieendometrioidalny) niezwiązany ze

stymulacją estrogenową ma złe rokowanie. Typ I obejmuje gruczolakoraka endometrioidalnego w stadium I lub II, podczas gdy typ II EC obejmuje gruczolakoraka endometrioidalnego w stadium III, surowiczego, jasnokomórkowego i niezróżnicowanego raka [7, 8].

Klasyfikacja WHO z 2005 r. (5. edycja) identyfikuje 10 podtypów histologicznych złośliwego rozrostu błony śluzowej macicy. Są to: rak endometrioidalny (85%), rak surowiczy (3–10%), rak jasnokomórkowy (<5–10%), rak niezróżnicowany/odróżnicowany, gruczolakorak mieszanokomórkowy (10%), gruczolakorak z pozostałości przewodów Wolffa, rak płaskonabłonkowy (< 0,5%), rak śluzowy typu jelitowego, gruczolakorak imitujący raka z przewodów Wolffa i mięsakorak (ok 5%) [9, 10].

Zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Federacji Ginekologów i Położników (FIGO) raka endometrium można również podzielić na trzy stopnie w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego (opierają się przede wszystkim na cechach architektonicznych), tj.: G1–G3. G1 charakteryzuje się $\leq 5\%$ litym wzorem wzrostu, G2 ma od 6 do 50% litego wzoru wzrostu, podczas gdy G3 ma $> 50\%$ litego wzoru wzrostu. Według FIGO 2023 guzy G1 i G2 należą do guzów niskiego stopnia zróżnicowania, natomiast G3 są guzami wysokiego stopnia zróżnicowania [11].

W 2013 r. The Cancer Genome Atlas (TCGA) wprowadził nową klasyfikację molekularną raka endometrium, która jest niewątpliwym postępem w diagnostyce i leczeniu raka endometrium. Wskazuje ona na zmianę paradygmatu z klasyfikacji morfologicznej na molekularną i pozwala na wiarygodne oszacowanie rokowania i ocenę odpowiedzi na leczenie. Na podstawie badania TCGA zidentyfikowało cztery podgrupy molekularne, należą do nich:

- grupa POLEmut – charakteryzuje się mutacjami w genie polimerazy epsilon (POLE) (7%),
- grupa MSI – związana jest z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI) wynikającą z niedoboru mechanizmu naprawy niedopasowań (MMRd) (28%),
- grupa p53abn – cechuje się dużymi zmianami liczby kopii somatycznych, napędzanymi przez mutacje w genie *TP53* (26%),

- grupa NSMP – obejmuje nowotwory o małej liczbie kopii, bez zdefiniowanego profilu molekularnego (39%).

Grupy te różnią się profilem mutacji, immunogennością, rokowaniem i wymagają odmiennego postępowania [12, 13].

Guzy POLEmut mają najlepsze rokowanie, natomiast grupa z dużą liczbą kopii napędzana mutacjami w genie *TP53* rokuje niekorzystne. Rokowanie guzów z niedoborem naprawy niedopasowań (MMRd) i tych bez specyficznego profilu molekularnego (NSMP) jest pośrednie [14, 15]. Molekularna ocena zaawansowania raka endometrium jest przydatna ze względu na jej wartość prognostyczną i potencjał przewidywania korzyści terapii adiuwantowej [16].

Wprowadzenie nowego podziału molekularnego miało wpływ na zmianę klasyfikacji FIGO z 2009 r., która oceniała stopień zaawansowania chirurgiczno-patologicznego EC, na klasyfikację FIGO 2023. Nowa klasyfikacja opierająca się na wytycznych ESGO/ESTRO/ESP zawiera nowe podklasyfikacje uwzględniające mutacje genetyczne [11, 17].

Ocena kompletnej klasyfikacji molekularnej (POLEmut, MMRd, NSMP, p53abn) jest przeprowadzana we wszystkich przypadkach raka endometrium w celu prognostycznej stratyfikacji grup ryzyka. Podtypy molekularne mają istotny wpływ na rokowanie, nawrót choroby i wyniki przeżycia w różnych kohortach pacjentów i są potencjalnymi czynnikami wpływającymi na decyzje dotyczące leczenia adiuwantowego lub systemowego. Charakterystyka molekularna EC to szybko rozwijająca się dziedzina wymagająca dalszych badań. Podstawowym leczeniem raka endometrium jest leczenie chirurgiczne, ewentualnie następcza chemioterapia, radioterapia i chemioradioterapia [14, 18, 19]. Ryzyko nawrotu raka endometrium występuje również w przypadkach o wczesnym zaawansowaniu i wynosi 2,9% w ciągu pierwszych 3 lat po zakończeniu leczenia [20].

Najczęstszą mutacją genetyczną w raku endometrium jest mutacja genu supresorowego *PTEN*. Funkcjonalna inaktywacja *PTEN* związana jest z inicjacją i progresją raka endometrium. Badania wykazały 34–55% częstość występowania mutacji somatycznych

genu *PTEN* przy 50–83% częstości występowania utraty lub spadku białka PTEN [21, 22].

Zmniejszenie ekspresji genu *PTEN* w tkankach raka endometrium może być też spowodowane hipermetylacją jego promotora. Metylacje promotora *PTEN* zostały zaobserwowane w 52,0% tkanek nowotworowych [23]. Innym istotnym genem zaangażowanym w kancerogenezę raka endometrium jest *SOX17* (ang. SRY-related HMG-box) pełniący funkcję genu supresorowego. Jego inaktywacja odgrywa istotną rolę w progresji nowotworu poprzez deregulację procesu przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) [24].

2.2. Znaczenie mikroRNA w kancerogenezie i w raku endometrium

Do mechanizmów regulujących ekspresję genów zalicza się zarówno klasyczne mechanizmy epigenetyczne, jak i niekodujące RNA (ncRNA, noncoding RNA). Pomimo że ncRNA nie są klasycznymi czynnikami epigenetycznymi, to odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym [25, 26].

Do klasycznych mechanizmów epigenetycznych należą: metylacja DNA, modyfikacje histonów (np. acetylacja, metylacja, fosforylacja) tworzące tzw. kod histonowy oraz remodeling chromatyny [27].

Niekodującymi RNA są: tRNA (ang. transport RNA), rRNA (ang. ribosomal RNA), lncRNA (ang. long noncoding RNA), snRNA (ang. small nuclear RNA), snoRNA (ang. small nucleolar RNA), asRNA (ang. antisense RNA), ceRNA (ang. competing endogenous RNA), piRNA (ang. piwi-interactive RNA), miRNA (ang. micro RNA) [28].

MikroRNA stanowią szczególnie interesującą klasę niekodujących RNA ze względu na rolę, jaką pełnią w regulacji ekspresji genów. Zostały odkryte w 1993 r., są to jednoniciowe, małe cząsteczki RNA o długości około 19–25 nukleotydów. Pierwszym opisanym miRNA była cząsteczka kodowana przez gen *lin-4*, która reguluje ekspresję białka LIN14 u *Caenorhabditis elegans*, co zostało opisane przez Lee i wsp. [29].

Biogeneza miRNA rozpoczyna się w jądrze komórkowym, gdzie polimeraza RNA II (Pol II) syntetyzuje pierwotny transkrypt miRNA (pri-miRNA). Pri-miRNA jest przycinana

przez kompleks DROSHA-DGCR8 do prekursora miRNA (pre-miRNA). Pre-miRNA jest następnie transportowana do cytoplazmy przez Exportynę 5, która w tym procesie wchodzi w interakcję z białkiem Ran-GTP [30]. W cytoplazmie pre-miRNA jest dalej przetwarzany przez endonukleazę DICER do dwuniciowego dupletu miRNA. Jedna z nici (tzw. nić przewodnia) zostaje włączona do kompleksu miRISC (miRNA-induced silencing complex), którego kluczowym komponentem jest białko Argonaute 2 (AGO2), natomiast druga nić ulega degradacji [31, 32].

MikroRNA działają jako składniki kompleksu rybonukleoproteinowego zwanego miRISC (mikroRNA-induced silencing complex) [33]. Dojrzałe cząsteczki miRNA, osadzone w kompleksach miRISC, mają zdolność wiązania się w obrębie regionu 3'UTR mRNA genu docelowego. W przypadku pełnej komplementarności miRNA do sekwencji docelowej dochodzi do degradacji mRNA. Znacznie częściej jednak występuje niepełna komplementarność prowadząca do represji translacyjnej [34]. Mechanizmy działania miRNA obejmują regulację posttranskrypcyjną poprzez: represję translacji, degradację mRNA, skrócenie ogona poli (A) oraz usunięcie czapeczki 5'-7-metyloguanozylowej, co skutkuje destabilizacją i wyciszeniem ekspresji docelowego genu [35].

MikroRNA uczestniczą w regulacji wielu procesów komórkowych, takich jak: proliferacja, migracja, inwazja oraz przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT). EMT to ważny proces, w którym komórki nabłonkowe tracą kontakt komórka-komórka i przechodzą stopniową transformację z fenotypu nabłonkowego w mezenchymalny, co obejmuje np. przebudowę cytoszkieletu i aktywność migracyjną [36]. MikroRNA wpływają również na stabilność genomu, regulację metabolizmu, apoptozę komórek nowotworowych, a także uczestniczą w angiogenezie i umożliwiają nowotworowi ucieczkę przed kontrolą ze strony układu odpornościowego [37–41]. Mogą regulować ekspresję genów zarówno wewnątrz komórki, w której są syntetyzowane, jak i w komórkach sąsiadujących – po ich wydzieleniu do mikrośrodowiska guza. Tym samym stanowią istotne regulatory złożonej sieci procesów zachodzących w mikrośrodowisku guza [42]. Przykładem jest rodzina *let-7*, która działa jako regulator normalnego różnicowania i proliferacji komórek oraz hamuje wzrost komórek nowotworowych. Poziom *let-7* ma kluczowe znaczenie dla komórek rozwijających się, a jego działanie obejmuje m.in. bezpośrednią regulację genów *RAS* poprzez interakcję z białkiem LIN28 [43].

Podczas kancerogenezy obserwuje się znaczące zmiany w profilu ekspresji miRNA. Deregulacja ta może być wynikiem wielu zmian, w tym amplifikacji lub delecji genów kodujących miRNA, zmian epigenetycznych, a także zaburzeń w mechanizmach biogenezy, takich jak defekty białek DICER i DROSHA [35, 44]. MikroRNA mogą pełnić zarówno funkcje onkogenne, jak i supresorowe. Jako onkogeny promują rozwój raka poprzez hamowanie ekspresji genów supresorowych lub genów kontrolujących różnicowanie komórek i apoptozę. Z kolei miRNA działające jako supresory kancerogenezy mogą hamować rozwój nowotworu poprzez regulację onkogenów lub genów kontrolujących cykl komórkowy [45]. Przykładami są miR-181a, miR-181b i miR-181c, których ekspresja jest obniżona w glejaku [46], podczas gdy miR-181a i miR-181b ulegają nadmiernej ekspresji u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) [47].

MikroRNA uczestniczą także w regulacji szlaków sygnałowych związanych z nowotworzeniem, w tym JAK/STAT3 [48], NF-KB [49] i MAPK/ERK [50]. Ponadto mogą wzajemnie regulować swoje działanie w ramach złożonej sieci miRNA–miRNA [51].

Same mikroRNA mogą być regulatorami powyższych procesów, jednak ich aktywność podlega również precyzyjnej regulacji. Jednym z mechanizmów modulowania jest ich kontrola przez inne klasy niekodujących RNA, takie jak koliste RNA (circRNA), długie niekodujące RNA oraz pseudogeny. Szczególnie circRNA działają jako „gąbki molekularne”, wiążąc i ograniczając ich dostępność oraz zdolność do oddziaływania z docelowymi mRNA. W ten sposób modulują ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Pojedyncza cząsteczka circRNA może oddziaływać z wieloma różnymi miRNA [52, 53].

Obecnie mikroRNA są atrakcyjnymi kandydatami na cele terapeutyczne w leczeniu nowotworów złośliwych. Dlatego identyfikacja ich genów docelowych jest kluczowa w badaniach nad mechanizmami kancerogenezy. MikroRNA są również wykorzystywane jako biomarkery do oceny odpowiedzi na leczenie. W badaniach wykazano, że miRNA indukują chemiooporność w różnych typach nowotworach [54]. Ponadto opisany został związek między ekspresją miRNA a odpowiedzią na leczenie, przykładem może być rak piersi, w którym stwierdzono, że ekspresja miRNA-205 była podwyższona w komórkach

opornych na tamoksifen MCF-7/TAMR-1 (M/T) i egzosomach pochodzących z komórek M/T (M/T-Exo) [55].

W raku płuc wykazano również związek między zmienionymi poziomami mikroRNA a opornością na cisplatynę. Nadekspresji ulegały miR-33b-3p, miR-425-3p, miR-124, miR-295-5p, podczas gdy obniżoną ekspresję odnotowano dla miR-98, miR-26a, miR-107 lub miR-17 [56].

W zaawansowanym raku jelita grubego wykazano, że oporność na FOLFOX (5-fluorouracyl, leukoworyna i oksaliplatyna) koreluje z nadmierną ekspresją miR-19a [57]. Podobna sytuacja ma miejsce podczas leczenia pacjentów z zaawansowanym rakiem jelita grubego inhibitorami anty-VEGF lub anty-EGFR, np. nadmierna ekspresja miR-126 koreluje z opornością na bevacizumab [58].

Zjawisko chemiooporności występuje również w raku endometrium. Wykazano, że miR-222-3p zwiększa oporność komórek nowotworowych na raloksifen poprzez hamowanie ekspresji receptora estrogenowego alfa ($ER\alpha$). Sugeruje to, że miR-222-3p może być potencjalnym celem umożliwiającym przywrócenie ekspresji $ER\alpha$ i skutecznej odpowiedzi na terapię antyestrogenową w EC. Nadekspresja miR-222-3p zmniejszała wrażliwość komórek RL95-2 na raloksifen, podczas gdy zahamowanie ekspresji miR-222-3p zwiększało wrażliwość komórek AN3CA [59].

Ciekawym kierunkiem badań jest oporność na cisplatynę u pacjentek z EC. Wykazano, że nadekspresja miR-135a zwiększyła przeżywalność komórek raka endometrium po leczeniu cisplatyną, natomiast jej obniżenie prowadziło do zwiększenia apoptozy indukowanej przez lek. Wyniki te wskazują, że miR-135a reguluje oporność na cisplatynę w komórkach EC. Poziom ekspresji miR-135a jest związany z apoptozą indukowaną przez cisplatynę w komórkach EC. Wyniki te sugerują, że miR-135a może wpływać na chemiowrażliwość komórek raka endometrium na leczenie cisplatyną [60].

2.3. Omówienie wybranych mikroRNA

Kancerogeneza jest złożonym mechanizmem, na który mają niewątpliwy wpływ mikroRNA, jednak w dalszym ciągu procesy te wymagają lepszego zrozumienia. Identyfikacja potencjalnych markerów ułatwiających diagnostykę EC, jak również potencjalnych celów terapeutycznych jest wyzwaniem dla medycyny i nauki, dlatego analiza zmian ekspresji wybranych mikroRNA, takich jak miR-205-5p, miR-222-3p i miR-21-5p, może w przyszłości stanowić fundament dla opracowania nowych strategii terapeutycznych.

2.3.1. MikroRNA-205-5p

Hsa-miR-205-5p-5p (miR-205-5p, miR-205) to mikroRNA, którego nadmierna ekspresja jest istotnie skorelowana z zaawansowanym stadium choroby EC, częstością nawrotów i słabymi wskaźnikami przeżycia [61, 62]. Karaayvaz i wsp. wskazali, że poziomy ekspresji miR-205-5p były istotnie związane z przeżyciem pacjentek z rakiem endometrium. Pacjentki z niską ekspresją miR-205-5p miały większe szanse dłuższego przeżycia niż te z wysokimi poziomami miR-205-5p, co potwierdza obserwacje, że podwyższone poziomy miR-205-5p w tkankach nowotworowych mogą prowadzić do gorszego wskaźnika przeżycia u pacjentek z rakiem endometrium [61].

MiR-205-5p bierze udział w regulacji ekspresji genu supresorowego *PTEN* [63, 64]. Zaobserwowano, że ekspresja miR-205-5p jest znacznie wyższa w komórkach linii Ishikawa w porównaniu do prawidłowego endometrium [65]. MiR-205-5p oddziałuje bezpośrednio z regionem 3'-UTR genu *PTEN*, co skutkuje obniżeniem poziomu mRNA i białka PTEN. Ponadto ustalono, że miR-205-5p blokuje translację *PTEN* i aktywuje szlak sygnalizacyjny AKT. Konstytutywna aktywacja AKT przyczynia się do progresji nowotworu i do deregulacji genów takich jak *TP53* i *BCL-2*. Obniżenie ekspresji miR-205-5p powoduje spadek poziomu białka p53 i wzrost poziomu białka BCL-2. W związku z tym, że geny *TP53* i *BCL-2* są zaangażowane we wzrost komórek, apoptozę i proliferację, wyniki te stanowią podstawę do dalszych badań nad rolą miR-205-5p w komórkach EC. Szybkość apoptozy komórek może być również hamowana przez miR-205-5p. MiR-205-5p funkcjonuje zatem jako onkogen i hamuje apoptozę komórkową w EC poprzez ukierunkowanie na szlak *PTEN/AKT* [65].

Ponadto miR-205-5p hamuje ekspresję także innego genu supresorowego *JPH4*, promując nowotworzenie i progresję nowotworu [66].

Należy również zauważyć, że miR-205-5p odgrywa ważną rolę w migracji i inwazji raka endometrium. Mechanizm ten opiera się aktywacji szlaku AKT. Hamowanie ekspresji E-kadheryny i promowanie ekspresji Snail poprzez aktywację AKT i zmniejszenie ekspresji kinazy syntezującej glikogen 3 β jest związane z nadmierną ekspresją miR-205-5p. Molekularny mechanizm działania miR-205-5p regulujący przejście nabłonkowo-mezenchymalne poprzez aktywację sygnalizacji AKT w komórkach raka endometrium w liniach komórkowych HEC-50B i HEC-1-A opisali Jin C. i wsp. [67]. Inny mechanizm działania miR-205-5p regulujący EMT opisywany jest w komórkach raka piersi poprzez wyciszenie ZEB2 i ZEB1 (ang. zinc finger E-box binding homeobox 1,2) [68].

Ekspresję miR-205-5p badano też w innych nowotworach i wykazano, że ulega on nadekspresji w liniach komórkowych raka głowy i szyi [69], raku szyjki macicy [70], raku nerki i pęcherza moczowego [71], niedrobnokomórkowym raku płuc [72] i raku piersi [68] w porównaniu z tkankami normalnymi. Natomiast obniżona ekspresja miR-205-5p została opisana w raku żołądka [73].

Ekspresję miR-205-5p badano również w surowicy krwi i stwierdzono istotnie wyższy poziom ekspresji u pacjentów z rakiem niedrobnokomórkowym płuc w porównaniu z grupą kontrolną [74, 75]. Przeprowadzono też badania poziomu ekspresji miR-205-5p w surowicy w celu odróżnienia łagodnych guzów tarczycy od złośliwych. Poziomy w surowicy były najwyższe u pacjentów ze złośliwymi guzami tarczycy, niższe u pacjentów z guzami łagodnymi, a najniższe w grupie kontrolnej. Ponadto jego ekspresja korelowała z rozmiarem guza, stopniem zaawansowania, przerzutami do węzłów chłonnych, naciekaniem torebki guza i statusem mutacji *BRAF* (ang. B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase). Zidentyfikowano dodatnią korelację między ekspresją miR-205-5p a poziomami mRNA *TSHR* (ang. thyroid stimulating hormone receptor) u pacjentów z rakiem tarczycy [76].

Zmiany ekspresji miR-205-5p badano w guzach EC opornych na leczenie. Zhuo i Yu zaobserwowali, że miR-205-5p ulega nadekspresji w komórkach Ishikawa-PR (opornych na progesteron) w porównaniu z komórkami Ishikawa. Ponadto badacze zaobserwowali,

że leczenie inhibitorem miR-205-5p-5p znacząco zahamowało wzrost komórek Ishikawa i komórek guza PR. Obserwacje te pokazują, że miR-205-5p może być zaangażowany w oporność na progesteron w EC, chociaż mechanizm oporności nadal pozostaje niejasny. Wyniki badań wskazują również nową perspektywę mechanizmu regulacyjnego miR-205-5p-5p na gen *PTEN* w PR-EC, gdzie poziomy *PTEN* były znacząco zmniejszone w komórkach PR Ishikawy, a inhibitor miR-205-5p zwiększył ekspresję *PTEN* w tych komórkach. Odkrycia te pokazują, że miR-205-5p odgrywa ważną rolę w utracie ekspresji *PTEN* i rozwoju PR w komórkach EC [77].

Badania wpływu miR-205-5p na mechanizm oporności na paklitaksel wykazały, że miR-205-5p ulega nadekspresji w tkankach EC, a jego celem jest *FOXO1* (ang. Forkhead box O1). *FOXO1* to czynnik transkrypcyjny szeroko rozpowszechniony w sercu, mózgu, płucach i innych tkankach i narządach. MiR-205-5p indukował wzrost oporności na paklitaksel i przyczyniał się do neoplazji komórek EC poprzez wpływ na *FOXO1*. Obniżenie ekspresji miR-205-5p zwiększyło wrażliwość komórek EC na paklitaksel, co skutkowało zmniejszeniem proliferacji komórek i przyspieszeniem apoptozy. Regulacja ekspresji miR-205-5p wyznacza nowy możliwy kierunek leczenia pacjentów z EC [78]. Należy również wspomnieć, że lncRNA także mają wpływ na raka endometrium poprzez modulację osi sygnalizacyjnej miR-205-5p-5p-*PTEN*. Taki przykład przedstawili Xin i wsp., opisując wpływ lncRNA, tj. LA16c-313D11.11, na oś miR-205-5p-5p-*PTEN*, gdzie LA16c-313D11.11 może hamować rozwój i progresję EC, działając jak gąbka miR-205-5p, a tym samym pośrednio zwiększając ekspresję *PTEN* [79]. Xin i wsp. donieśli, że aż 13 lncRNA może być powiązanych z siecią miR-205-5p-5p-*PTEN* i są to: LINC00657, RP11-395G23.3, HNRNPU-AS1, MCM3AP-AS1, SNHG5, SNHG16, LA16c-313D11.11, THAP9-AS1, RP11-379K17.11, RP11-38P22.2, RP11-349A22.5, UBXN8 i ERVK3-1. Wykazano, że tych 13 lncRNA może działać jako endogenne „spongy RNAs”, wchodząc w interakcję z miR-205-5p-5p i go tłumiąc [80].

2.3.2. MikroRNA 222-3p

Kolejnym wybranym do badań mikroRNA jest hsa-miR-222-3p (miR-222-3p, miR-222). Był on intensywnie analizowany w kontekście wielu typów nowotworów, w tym w raku endometrium. Wykazano, że ekspresja miR-222-3p jest podwyższona w tkankach EC ujemnych pod względem ER α . Ponadto ekspresja miR-222-3p jest istotnie niższa

w próbkach tkanki EC ER α -dodatniej niż w ER α -ujemnej i poziom ekspresji miR-222-3p jest odwrotnie skorelowany z ekspresją Era. Wykazano również, że nadmierna ekspresja miR-222-3p była skorelowana z wyższymi stopniami, późniejszymi stadiami i większą liczbą przerzutów węzłowych. Ponadto stwierdzono, że *in vivo* supresja miR-222-3p może znacząco hamować wzrost guza [59].

Poziom ekspresji miR-222 badano w surowicy i wykazano jego wyższe poziomy w surowicy u pacjentek z EC w porównaniu z grupą kontrolną [81]. Natomiast w moczu u starszych kobiet jego poziom ekspresji uległ obniżeniu [82].

Ekspresję miR-222-3p badano również w innych nowotworach, np.: u pacjentek z nabłonkowym rakiem jajnika (EOC). Wykazano, że jest on supresorem, a nadekspresja wiąże się z lepszym ogólnym przeżyciem u pacjentek z EOC. Ponadto jego ekspresja była negatywnie skorelowana ze wzrostem guza *in vivo*. Eksperymenty przeprowadzone przez Fu i wsp. *in vitro* wykazały, że miR-222-3p hamuje proliferację i migrację komórek EOC oraz zmniejsza fosforylację AKT. *GNAI2* (G Protein Subunit Alpha I2) został zidentyfikowany jako cel dla miR-222-3p i ma działanie promujące na proliferację komórek EOC. Jest też aktywatorem szlaku PI3K/AKT [83]. Zaobserwowano nadekspresję miR-222-3p w tkankach nowotworowych niedrobnokomórkowego raka płuca. Zastosowanie inhibitora miR-222-3p prowadziło do zahamowania aktywności nowotworowej – obniżeniu ulegała proliferacja komórek, a jednocześnie wzrastała ich apoptoza. Z kolei nadekspresja miR-222-3p w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc promowała proliferację komórek i zmniejszała ich apoptozę. Badania wykazały, że składnik wiążący Bcl-2 jest jednym z genów docelowych dla miR-222-3p. Jego wyciszenie osłabiło regulacyjny wpływ inhibitora miR-222-3p na proliferację komórek i apoptozę w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc [84].

Wyniki badań dotyczących innych nowotworów również wykazały jego onkogeną rolę w tkance nowotworowej, na przykład w kostniakomięsaku lub raku płuc [85, 86].

Poziom ekspresji miR-222-3p był badany także w egzosomach surowicy u pacjentek z rakiem jajnika, a jego poziom był związany z nabłonkowym rakiem jajnika (EOC). Egzosomalny miR-222-3p jest skutecznym regulatorem polaryzacji makrofagów M2 promującej guz [87]. U pacjentów z rakiem brodawkowym tarczycy również wykorzystano egzosomy do badania ekspresji miR-222-3p i stwierdzono jego istotny

wzrost u pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych [88]. Ponadto wykorzystano surowicę jako materiał do badania poziomu ekspresji czterech miRNA, w tym miR-21-5p i miR-222-3p, u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc i wykazano, że ma on dobrą wartość diagnostyczną, zwłaszcza we wczesnym stadium choroby [89]. Jednak rola klinicznego znaczenia miR-222-3p w EC nadal nie jest w pełni poznana, dlatego też wybrano ją do naszych analiz.

2.3.3. MikroRNA 21-5p

Trzecim badanym mikroRNA jest hsa-miR-21-5p (miR-21-5p, miR-21). Ulega on nadekspresji niemal we wszystkich nowotworach u ludzi [90]. Działa jako onkogen i może być użytecznym klinicznym biomarkerem i celem terapeutycznym. Jego poziom wzrasta również w raku endometrium. Sato i wsp. ocenili ekspresję miR-21-5p w komórkach guza EC i podścielisku oddzielnie. Zwiększenie ekspresji miR-21-5p w komórkach EC było istotnie związane z wyższym stopniem histologicznym i przerzutami do węzłów chłonnych. Było również istotnie związane ze słabym przeżyciem bez progresji [91]. Ekspresja miR-21-5p może być powiązana z zaawansowanymi stadiami klinicznymi, głęboką inwazją mięśnia macicy i wysokim stopniem histologicznym [92].

Wykazano różne mechanizmy działania miR-21-5p. Jego onkogenna rola polega na hamowaniu genu supresorowego *FBXO11* (ang. F-box protein 11), a następnie na hamowaniu apoptozy i zatrzymywaniu degradacji białka [93]. Inny mechanizm polega na bezpośrednim ukierunkowaniu na 3'-UTR mRNA *PTEN*. Funkcjonalna inaktywacja *PTEN* jest związana z inicjacją i progresją raka endometrium [92].

Jak wspomniano wcześniej, miRNA wiążą się z docelowymi mRNA poprzez komplementarność sekwencji i prowadzą do zahamowania translacji i destabilizacji mRNA. Wiadomo, że na ten proces mogą wpływać lncRNA poprzez interakcje lncRNA:miRNA. Przykładem lncRNA jest MEG3 (ang. Maternally Expressed Gene 3), który wpływa na ekspresję miR-21-5p [94, 95]. Innym przykładem interakcji lncRNA:miRNA jest miR-21-5p i *GAS5* (ang. Growth Arrest Specific 5). Zaobserwowano zmniejszoną ekspresję *GAS5* w makrofagach związanych z guzem w raku endometrium. Jego rola przeciwnowotworowa polega na promowaniu fagocytozy,

prezentowaniu antygenów i aktywowaniu cytotoksycznych limfocytów T. MiR-21-5p jako onkogen hamuje supresyjny efekt *GAS5* w komórkach raka endometrium [96].

Inny mechanizm działania miR-21-5p został zbadany przez Li Xiao i wsp. i jest związany z niedotlenieniem komórek nowotworowych. W warunkach niedotlenienia komórki nowotworowe wytwarzają znacznie więcej egzosomów niż komórki w warunkach normoksji. Niedotlenienie prowadzi do nadekspresji miR-21-5p w egzosomach. Monocyty ulegają przekształceniu w makrofagi polaryzujące typu M2 poprzez dostarczenie egzosomalnego miRNA-21-5p. Przykład ten może stanowić jeden z mechanizmów ucieczki immunologicznej komórek nowotworowych. MiR-21-5p może indukować potencjalny mechanizm tworzenia mikrośrodowiska immunologicznego w progresji raka endometrium. Niedotlenienie jest zatem agresywną cechą raka endometrium i cechuje się nadekspresją miR-21-5p. Ten wzrost powoduje obniżenie ekspresji *PTEN* i silny wzrost ekspresji genu *LICAM* (ang. L1 Cell Adhesion Molecule), co sprzyja inwazji komórek nowotworowych i przerzutom [97].

Nadmierna ekspresja miR-21-5p promuje również przejście nabłonkowo-nabłonkowe. Natomiast wyciszenie miR-21-5p odwróciło EMT w liniach komórek EC. Mechanizm ten jest związany z SRY-box 17 (*SOX17*) i jest skorelowany ze słabym przeżyciem u pacjentek z rakiem endometrium. *SOX17* koduje 414-aminokwasowe białko należące do rodziny czynników transkrypcyjnych HMG-box (SOX) związanych z SRY. Nadmierna ekspresja miR-21-5p znacząco hamuje ekspresję białka *SOX17* w liniach komórek raka endometrium. *SOX17* ma działanie supresyjne, a jego nadmierna ekspresja promuje przejście nabłonkowo-mezenchymalne, podczas gdy wyciszenie *SOX17* indukuje EMT w liniach komórek raka endometrium [24].

W innym badaniu potwierdzono hamujący wpływ miR-21-5p na *PTEN*. Ponadto wykazano, że miR-21-5p jest potencjalnym celem NBTA1 (ang. long noncoding RNA neuroblastoma-associated transcript 1), co zostało potwierdzone przez test reporterowy aktywności lucyferazy. Badanie potwierdziło, że nadekspresja miR-21-5p nie tylko promowała proliferację i inwazję EC, ale także hamowała apoptozę poprzez mechanizm blokowania NBTA1 w komórkach EC [98].

Poziom ekspresji miR-21-5p badano również w innych nowotworach, np. raku otrzewnej [99], raku płuc [100], raku jelita grubego [101], raku piersi [102] i raku jajnika [103].

MiR-21-5p był szeroko badany w surowicy u pacjentów z różnymi nowotworami. W raku jelita grubego wykazał nadekspresję w próbkach surowicy i obniżenie ekspresji u pacjentów w okresie pooperacyjnym. Jego nadekspresja była skorelowana z klasyfikacją TNM (system oceny stopnia zaawansowania nowotworu) i przerzutami do węzłów chłonnych [104]. MiR-21-5p jest również biomarkerem w wykrywaniu i prognozowaniu raka trzustki [105] i niedrobnokomórkowego raka płuc [106]. Wysokie poziomy miR-21-5p w surowicy obserwowano również u chorych na raka gardła środkowego związanego z zakażeniem wirusem Epsteina-Barr [107].

W raku piersi miR-21-5p wykazał jednak zmniejszoną ekspresję i ograniczoną wartość diagnostyczną w przypadku choroby we wczesnym stadium. Niemniej jednak jego zmniejszona ekspresja może służyć jako biomarker w diagnostyce przerzutów raka piersi [108].

Badanie roli i mechanizmów działania mikroRNA w raku endometrium ma istotne znaczenie zarówno z naukowego, jak i medycznego punktu widzenia. Dogłębne poznanie procesów kancerogenezy może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych strategii terapeutycznych, zahamowania przerzutów nowotworowych oraz poprawy rokowania i jakości życia pacjentek.

3. Cele pracy

Podstawowym celem pracy jest poznanie zmian ekspresji wybranych mikroRNA u pacjentek z EC.

Do celów szczegółowych pracy należą:

1. Wykazanie zmiany ekspresji w tkance raka endometrium dla miR-205-5p, miR-222-3p i miR-21-5p w porównaniu z tkanką endometrium w grupie kontrolnej.
2. Wykazanie zależności między ekspresją badanych miRNA a wskaźnikiem masy ciała oraz chorobami współistniejącymi u pacjentek z rakiem endometrium.
3. Wykazanie związku ekspresji miRNA w różnych stopniach zaawansowania i zróżnicowania histopatologicznego nowotworu.
4. Potwierdzenie zmian ekspresji w surowicy u pacjentek z rakiem endometrium.
5. Ocena przydatności mikroRNA oznaczanego w surowicy jako mniej inwazyjnego i potencjalnie użytecznego biomarkera w porównaniu z miRNA pochodzenia tkankowego.
6. Zbadanie stabilności ekspresji SNORD48 i U6 w tkankach raka endometrium.

4. Materiały i metody

4.1. Grupa badana

Badanie zostało przeprowadzone w dwóch etapach i objęło pacjentki hospitalizowane w Klinice Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa Szpitala Uniwersyteckiego im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie. Pacjentki zgłaszały się do szpitala w okresie od 03/2021 do 11/2022 w celu rozpoczęcia leczenia onkologicznego. W pierwszym etapie analizowano ekspresję wybranych mikroRNA w materiale tkankowym pobranym od 111 pacjentek z histopatologicznie potwierdzonym rakiem endometrium. Drugi etap badania objął 18 pacjentek z EC, które brały udział również w pierwszym etapie. U tych samych kobiet oznaczono poziom ekspresji mikroRNA w surowicy i porównywano z poziomem ekspresji w materiale tkankowym, co umożliwiło ocenę przydatności oznaczeń z surowicy jako potencjalnie mniej inwazyjnej metody diagnostycznej. Grupę kontrolną w obu etapach stanowiło 19 zdrowych kobiet operowanych z powodu wypadania narządów miednicy mniejszej lub mięśniaków macicy, bez rozpoznania nowotworu. Żadna z pacjentek nie otrzymywała terapii hormonalnej, radioterapii ani chemioterapii przed pobraniem próbki.

Wszystkie kobiety wyraziły świadomą zgodę na udział w badaniu oraz na wykorzystanie tkanek do badań genetycznych. Projekt uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej (uchwała nr 54/B/2020 z dnia 21 maja 2020 r.).

4.2. Metody

4.2.1. Izolacja mikroRNA z tkanki

Tkanki po pobraniu były umieszczane w RNAprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Niemcy) w celu stabilizacji RNA, a następnie przechowywano je w temperaturze -80°C . Izolację całkowitego RNA, z frakcją mikroRNA, z tkanki nowotworowej wykonano przy użyciu zestawu miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z protokołem producenta. Tkanki były rozmrażane na lodzie i przenoszone do próbek zawierających $700\ \mu\text{l}$ odczynnika do lizy QIAzol, a następnie zostały poddane homogenizacji przez sonikację. Kolejnym krokiem było dodanie chloroformu i wirowanie (15 min przy $12\ 000\times g$ w 4°C). Fazę wodną zawierającą całkowite RNA, w tym miRNA, przeniesiono do nowych próbek i dodano etanol, następnie całość została przeniesiona na kolumny RNeasy MiniElute Spin Column. Do przepłukiwania kolumn zastosowano bufor do płukania RWT, który został rozcieńczony izopropanolem, wg zaleceń producenta. Podczas procedury oczyszczania przeprowadzono trawienie DNA przy użyciu zestawu RNase-free DNase (Qiagen, Hilden, Niemcy). Do elucji RNA użyto $30\ \mu\text{l}$ wody wolnej od RNaz. Stężenie RNA zostało zmierzone przy użyciu spektrofotometru NanoDrop™ 2000c (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Jakość wyizolowanego RNA oceniano przez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. Izolaty zostały rozcieńczone do końcowego stężenia RNA wynoszącego $5\ \text{ng}/\mu\text{l}$ i bezpośrednio po izolacji poddano je reakcji odwrotnej transkrypcji.

4.2.2. Izolacja mikroRNA z surowicy

Po pobraniu krwi od pacjentek odwirowano ją dwukrotnie, a powstałą surowicę przechowywano w temperaturze -80°C . Przed izolacją próbki surowicy rozmrożono na lodzie. Izolację miRNA wykonano z $400\ \mu\text{l}$ surowicy przy użyciu zestawu miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z protokołem producenta. Objętości buforów dostosowano do większej początkowej objętości próbek. Na etapie izolacji do próbek dodano po $1\ \mu\text{l}$ kontroli spike-in, są to wewnętrzne standardy, dzięki którym istnieje możliwość oceny poprawności przebiegu kolejnych etapów doświadczeń. Po dodaniu buforu próbki odwirowano, a górną wodną fazę zawierającą RNA przeniesiono do nowej próbki. Do supernatantu dodano izopropanol, aby zapewnić odpowiednie warunki do wiązania się cząsteczek RNA (>18 nukleotydów)

z membraną krzemionkową. Całą próbkę przeniesiono na kolumny RNeasy UCP MinElute, w kolejnym etapie poprzez płukania usunięto zanieczyszczenia związane z błoną. Do elucji RNA użyto 20 μ l wody wolnej od RNazy. MikroRNA bezpośrednio po izolacji poddano reakcji odwrotnej transkrypcji.

4.2.3. Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano przy użyciu zestawu miRCURY LNA Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z załączonym protokołem. MikroRNA zostało najpierw poddane poliadenylacji za pomocą enzymu poli(A) polimerazy, a następnie przekształcone do cDNA przy użyciu starterów oligo-dT zawierających zdegenerowaną kotwicę 3', co umożliwia specyficzną amplifikację miRNA w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Proces poliadenylacji i odwrotnej transkrypcji przeprowadzono jednocześnie w jednej probówce. Skład mieszaniny reakcyjnej: 2 μ l RNA, 2 μ l 5 \times miRCURY SYBR[®] Green RT Reaction Buffer, 1 μ l 10 \times miRCURY RT Enzyme Mix, po 0,5 μ l UniSp6 i miR-cel-39-3p, uzupełniono wodą do objętości końcowej wynoszącej 10 μ l.

- dla RNA wyizolowanego z tkanki użyto 10 ng RNA
- dla RNA wyizolowanego z surowicy użyto 2 μ l nierozcieńczonego RNA

Reakcję RT przeprowadzono w 96-dołkowym termocyklerze T100[™] (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) w następujących warunkach: inkubacja w 42 $^{\circ}$ C przez 60 min, inaktywacja w temperaturze 95 $^{\circ}$ C, następnie cała mieszanina została schłodzona do 4 $^{\circ}$ C. Do czasu dalszego użycia cDNA przechowywano w temperaturze -20 $^{\circ}$ C.

4.2.4. Analiza poziomu ekspresji metodą dPCR

W badaniu zastosowano metodę digital PCR (dPCR) z wykorzystaniem systemu QIAcuity (Qiagen, Hilden, Niemcy) do bezwzględnego oznaczenia ekspresji wybranych miRNA. Technologia ta opiera się na podziale reakcji PCR na tysiące mikroprzedziałów w specjalnych nanopłytkach, co umożliwia precyzyjną analizę punktu końcowego amplifikacji w każdym z nich. Do obliczeń stosowana jest statystyka Poissona, dzięki czemu możliwe jest dokładne określenie liczby kopii cząsteczek docelowych. Do analizy użyto zestawu miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen) i 96-dołkowej płytki

Nanoplate 8.5K dla mikroRNA izolowanego z tkanki oraz 24-dołkowej płytki Nanoplate 26K dla mikroRNA izolowanego z surowicy. Oceniano bezwzględną ekspresję mikroRNA: hsa-miR-21-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-222-3p. Dodatkowo dla mikroRNA wyizolowanego z tkanki użyto kontrole referencyjne U6 snRNA i SNORD48, natomiast dla mikroRNA wyizolowanego z surowicy użyto cel-miR-39-3p jako egzogenny gen referencyjny. Przed właściwymi pomiarami przeprowadzono optymalizację stężenia cDNA w celu uniknięcia przeciążenia nanopartycji i zapewnienia wiarygodności wyników. Optymalizację przeprowadzono oddzielnie dla każdego miRNA, analizując zakres rozcieńczeń od 10-krotnego do 100-krotnego w stosunku do materiału wyjściowego.

Reakcje dPCR dla analizy poziomu miRNA wyizolowanego z tkanek przeprowadzono w 12 µl mieszaniny reakcyjnej składającej się z 4 µl EvaGreen PCR Master Mix (3×), 1,2 µl starterów miRCURY LNA PCR (10×) oraz 3 µl rozcieńczonego cDNA (20-krotnie dla miR-205-5p i miR-222-3p oraz 40-krotnie dla miR-21-5p, SNORD48 i U6). Próbki nałożono do studzienek 96-dołkowej nanopłytki QIAcuity Nanoplate 8.5K, którą następnie uszczelniono.

W przypadku analizy poziomu miRNA wyizolowanego z surowicy reakcje przeprowadzono w 40 µl mieszaniny reakcyjnej składającej się z 13,3 µl EvaGreen PCR Master Mix (3×), 4 µl mieszanki starterów miRCURY LNA, 10 µl rozcieńczonego cDNA (1:20) oraz 12,7 µl wody wolnej od RNazy. Próbki naniesiono na 24-dołkową nanopłytkę QIAcuity Nanoplate 26K, którą następnie uszczelniono.

Profil termiczny reakcji dla obu rodzajów próbek obejmował: denaturację wstępną w 95°C przez 2 minuty, następnie 45 cykli po 95°C przez 15 sekund i 60°C przez 1 minutę, końcowym etapem było chłodzenie w 4°C przez 5 minut. Odczyt fluorescencji wykonano w kanale zielonym, z parametrami czasu ekspozycji 500 ms i wzmocnienia 6. Fluorescencję mierzono po zakończeniu wszystkich cykli. Poziomy ekspresji badanych miRNA określono na podstawie liczby kopii miRNA w próbce, wykorzystując oprogramowanie QIAcuity Software Suite w wersji 2.1.8 (Qiagen, Hilden, Niemcy).

4.2.5. Analiza statystyczna

W następnej kolejności dokonano analizy statystycznej wyników uzyskanych z materiału tkankowego dla następujących podgrup: tkanka – tylko grupa badana, tkanka – tylko grupa kontrolna, jak również surowica – grupa badana i surowica – grupa kontrolna. Ekspresję miRNA kwantyfikowaną metodą dPCR przekształcono logarytmicznie, aby uzyskać normalny rozkład danych. Następnie oceniono analizę stabilności miRNA przy użyciu NormiRazor. Jest to narzędzie, które implementuje trzy różne istniejące algorytmy normalizacyjne – geNorm, NormFinder i BestKeeper [109]. Pierwotnie oszacowane snRNA U6 i SNORD48 okazały się niestabilne, dlatego dane nie zostały znormalizowane przez te miRNA. Takie podejście skutkuje wyższymi wartościami logarytmu dla wyższej ekspresji miRNA, umożliwiając prostą interpretację biomarkerów. Dane kliniczne i analizę różnicowej ekspresji dla zmiennych ilościowych przeprowadzono przy użyciu niezależnego testu *t*, testu *t* Welcha oraz testu U Manna-Whitneya lub testu Kruskala-Wallisa, w zależności od rozkładu zmiennych i równości wariancji testowanych odpowiednio testem Shapiro-Wilka i testem Levene’a.

W przypadku zmiennych jakościowych zastosowano test χ^2 z korektą Yate’a i dokładnym testem Fishera, gdy było to konieczne, w zależności od wielkości próby. Jednowymiarowa analiza regresji logistycznej została użyta do oceny wpływu poszczególnych czynników na występowanie raka endometrium. Następnie statystycznie istotne zmienne zidentyfikowane w analizie jednowymiarowej zostały uwzględnione w wielowymiarowym modelu regresji logistycznej.

Celem kontroli współczynnika fałszywych odkryć związanych z wielokrotnymi porównaniami zastosowano metodę Benjaminiego-Hochberga. Sparowany test *t* zastosowano do oceny różnic między stężeniem miRNA w surowicy i tkance. Test korelacji rang Spearmana zastosowano do oceny korelacji między stężeniem miRNA w surowicy i tkance. Jednowymiarowa analiza regresji logistycznej została zastosowana do oceny wpływu określonych czynników na występowanie EC. Zmienne uznane za istotne w analizie jednowymiarowej zostały następnie uwzględnione w wielowymiarowym modelu regresji logistycznej.

Zmienne nominalne przedstawiono jako liczby i procenty lub jako medianę (wraz z zakresem lub rozstępem kwartyłowym) i średnią (wraz z odchyleniem standardowym),

w zależności od normalności ich rozkładu. Wartości p mniejsze niż 0,05 uznano za istotne. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu Statistica 13.1 (Tibco, Palo Alto, CA, USA) i wersji R 4.2.1.

5. Wyniki

5.1. Publikacja przeglądowa: „The Role of miRNAs in the Development, Proliferation, and Progression of Endometrial Cancer”



Review

The Role of miRNAs in the Development, Proliferation, and Progression of Endometrial Cancer

Anna Bogaczyk ¹, Izabela Zawlik ^{2,3}, Tomasz Zuzak ¹, Marta Kluz ⁴, Natalia Potocka ^{2,*} and Tomasz Kluz ^{1,3}

¹ Department of Gynecology, Gynecology Oncology and Obstetrics, Fryderyk Chopin University Hospital, FSzopena 2, 35-055 Rzeszów, Poland; annabogaczyk@interia.pl (A.B.); tomasz.zuzak@gmail.com (T.Z.); jtkluz@interia.pl (T.K.)

² Laboratory of Molecular Biology, Centre for Innovative Research in Medical and Natural Sciences, Medical College of Rzeszów University, Warzywna 1a, 35-959 Rzeszów, Poland; izazawlik@gmail.com

³ Institute of Medical Sciences, Medical College of Rzeszów University, Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów, Poland

⁴ Department of Pathology, Fryderyk Chopin University Hospital, FSzopena 2, 35-055 Rzeszów, Poland; marta.kluz@interia.pl

* Correspondence: npotocka@ur.edu.pl

Abstract: Endometrial cancer is one of the most common cancers in developing and developed countries. Although the detection of this cancer is high at the early stages, there is still a lack of markers to monitor the disease, its recurrence, and metastasis. miRNAs are in charge of the post-transcriptional regulation of genes responsible for the most important biological processes, which is why they are increasingly used as biomarkers in many types of cancer. Many studies have demonstrated the influence of miRNAs on the processes related to carcinogenesis. The characteristics of miRNA expression profiles in endometrial cancer will allow their use as diagnostic and prognostic biomarkers. This paper focuses on the discussion of selected miRNAs based on the literature and their role in the development of endometrial cancer.

Keywords: miRNA; endometrial cancer; epigenetics; carcinogenesis



Citation: Bogaczyk, A.; Zawlik, I.; Zuzak, T.; Kluz, M.; Potocka, N.; Kluz, T. The Role of miRNAs in the Development, Proliferation, and Progression of Endometrial Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11489. <https://doi.org/10.3390/ijms241411489>

Academic Editor: Marcin Majka

Received: 31 May 2023

Revised: 30 June 2023

Accepted: 13 July 2023

Published: 15 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

1.1. Endometrial Cancer

Endometrial cancer (EC) was diagnosed in 417,367 women worldwide in 2020, with the highest burden of the disease recorded in North America and Western Europe. The incidence of EC is rapidly increasing. As of 2020, uterine cancer is the fourth most common female cancer in Europe, with an incidence of 12.9–20.2 per 100,000 women and a mortality rate of 2.0–3.7 per 100,000 women [1]. The high incidence rate in North America and Western Europe can be attributed to the high prevalence of lifestyle risk factors for EC, such as high standard of living, aging population, and obesity, which are associated with approximately 50% of EC cases [2].

In the historical morphological division (according to Bokhman's dualistic theory), EC was classified as type I, the so-called endometrioid, which is associated with excessive estrogen stimulation, develops on the basis of endometrial hyperplasia, is more common, and has a favorable prognosis. Type II (non-endometrioid) unrelated to estrogen stimulation has a poor prognosis. Type I includes stage I or II endometrioid adenocarcinoma, while type II EC includes stage III endometrioid adenocarcinoma, serous, clear cell, undifferentiated, and carcinoma [3]. The Cancer Genome Atlas (TCGA), introduced molecular profiling in 2013, which indicates a paradigm shift from morphological to molecular classification [4]. The TCGA studies identified four molecular subgroups characterized by the *POLE* mutation (*POLEmut* group), microsatellite instability (MSI group), which arises from MMRD, high somatic copy number changes (driven by the *TP53* mutation, also called p53abn group), and a low number of copies without a specific molecular profile (NSMP group), each

with a separate prognosis [4]. *POLEmut* tumors, despite their aggressive appearance, have an extremely favorable prognosis, while the group with a high copy number driven by the *TP53* mutation has an unfavorable prognosis. The prognosis of tumors with a mismatch repair deficiency (MMRd) and those without a specific molecular profile (NSMP) is relatively favorable [5,6].

The basic treatment of endometrial cancer is surgery and, possibly, subsequent chemotherapy, radiotherapy, and chemoradiotherapy [5,7,8]. The risk of endometrial cancer recurrence is also present in very low-risk cases and is 2.9% within the first 3 years after the end of treatment [9]. Therefore, it is necessary to study the molecular mechanisms in the pathogenesis of endometrial cancer in order to discover new therapeutic methods.

1.2. MicroRNAs

The non-coding molecules play a particular role in the regulation of gene expression. The group of regulatory non-coding RNAs includes transport RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA), antisense RNA (asRNA), microRNA (miRNA), small nuclear RNA (snRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), competing endogenous RNA (ceRNA), and piwi-interactive RNA (piRNA) [10].

MiRNAs are a particularly interesting group in terms of regulation of gene expression. They were discovered in 1993 and are non-coding, single-stranded, small RNA molecules about 19–25 nucleotides long. The first ones to be described were small RNA molecules encoded by the *lin-4* gene, which regulates the expression of the *lin-14* protein in *Caenorhabditis elegans* by Lee et al. [11].

MiRNA formation begins in the cell nucleus where polymerase II (Pol II) transcribes the pri-miRNA. Pri-miRNA is trimmed by the DROSHA complex and DGCR8 proteins to pre-miRNA. Then, the pre-miRNA is exported by Exportin 5 to the cytoplasm [12]. In this transport, Exportin 5 interacts with the Ran protein. In the cytoplasm, a miRNA duplex is formed from the pre-miRNA, which then separates into two mature single-stranded miRNAs. This process takes place with the participation of DICER and Argonaute 2 (AGO2) [13,14].

MiRNAs function as components of a ribonucleoprotein complex called miRISC (microRNA-induced silencing complex) [15]. Mature miRNA molecules, embedded in miRISC complexes, have the ability to bind to the 3' untranslated regions (3' UTR) of the mRNA of the target gene. As a result of full nucleotide complementarity, they can lead to transcript degradation. In most cases, miRNAs are usually imperfectly complementary to their target gene and modulate the effect on gene expression via translational repression [16]. The mechanism of action of miRNAs involves binding to a sequence within the RNA-induced silencing complex (RISC), and then gene regulation through translational repression, mRNA degradation, poly(A) tail shortening, and removal of the 5'-methylguanyl cap [17].

MiRNAs are involved in various cellular functions including proliferation, migration, invasion, and the epithelial–mesenchymal transition (EMT) process. EMT is an important process where epithelial cells lose cell–cell contact and undergo a gradual transformation from an epithelial to a mesenchymal phenotype, which includes, i.e., cytoskeletal remodeling and migratory activity [18]. MiRNAs affect genome instability, regulate metabolism, and influence the apoptosis process of tumor cells; in addition, they also play a role in angiogenesis and immune escape of cancer [19–23]. They may also regulate gene expression within the cell or may be released outside the cell. This leads to the regulation of gene expression in neighboring cells. Therefore, they are regulators of a complex network of processes occurring in the tumor microenvironment [24]. For instance, the let-7 family acts as a regulator of normal cell differentiation and proliferation and inhibits the growth of cancer cells. Let-7 levels are crucial for development cells and act directly on *RAS* genes via LIN28 [25]. Masood N. et al. have reported mutual inhibition of let-7 and LIN28, but let-7 also inhibits IL-6 in embryonic cells, resulting in high levels of NFκB. NFκB together

with c-Myc has a stimulating effect on the formation of higher levels of LIN28 in cells. This increase in LIN28 then leads to a marked decrease in let-7 [26].

During carcinogenesis, the miRNA expression profile is significantly dysregulated. This is the result of many changes, including amplification and deletion of genes or epigenetic abnormalities. Moreover, miRNA expression is deregulated in cancer as a result of defects in their biogenesis machinery, including DICER and DROSHA [17,27]. Overexpressed miRNAs in cancers can function as oncogenes and promote cancer development through downregulated tumor suppressor genes or genes that control cell differentiation or apoptosis. Underexpressed miRNAs can function as cancer suppressor genes and can inhibit cancers by regulating oncogenes or genes that control cell differentiation or apoptosis [28]. Such examples are miR-181a, miR-181b, and miR-181c, which are downregulated in glioma [29], while miR-181a and miR-181b are overexpressed in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) [30].

In addition, they are involved in the regulation of cancer-related signaling pathways, including the JAK/STAT3 transcription pathway [31], the NF-KB pathway [32], and the MAPK/ERK pathway [33]. They may also affect other miRNAs and may be subject to mutual regulation of miRNAs: miRNAs [34].

MiRNAs can be regulators of the above processes, but they can also be regulated by such molecules as circular RNAs, long ncRNAs, or pseudogenes. CircRNA molecules act as "sponges" for miRNA and thus regulate the amount of free miRNA. They are post-transcriptional regulators of gene expression regulation. A single circRNA molecule can bind to several miRNAs [35,36].

Currently, miRNAs are attractive candidates for therapeutic targets in the treatment of malignancies. Therefore, identifying their targets is essential for cancer research. They are used to assess response to treatment. MiRNAs have also been found to induce chemoresistance in various cancers [37]. A relationship has also been found between miRNA expression and response to treatment, for example, in breast cancer, miRNA-205 was upregulated in tamoxifen resistance cells MCF-7/TAMR-1 (M/T) and M/T cell-derived exosomes (M/T-Exo) [38]. In lung cancer, the relationship between miRNA levels and cisplatin resistance has also been demonstrated, and miR33b-3p, miR-425-3p, miR-124, miR-295-5p are overexpressed, while miR-98, miR-26a, miR-107 or miR-17 [39]. In advanced colorectal cancer, resistance to FOLFOX (5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin) has been shown to correlate with miR-19a overexpression [40]. A similar situation occurs when treating patients with advanced CRC with anti-VEGF or anti-EGFR inhibitors, e.g., overexpression of miR-126 has been correlated with resistance to bevacizumab [41].

The phenomenon of chemoresistance also occurs in endometrial cancer. MiR-222-3p has been shown to increase raloxifene resistance by suppressing ER α expression in cancer cells. MiR-222-3p may be a potential target for restoring ER α expression and response to antiestrogen therapy in the EC. With the upregulation of miR-222-3p, RL95-2 cells were less sensitive to raloxifene. In contrast, AN3CA cells were more sensitive after miR-222-3p inhibition [42].

An interesting direction of research is resistance to cisplatin. Cisplatin has been used in the treatment of various cancers as an effective chemotherapeutic agent for several decades. Wang et al. showed that overexpression of miR-135a increased the survival of endometrial cancer cells after cisplatin treatment. And the decrease in miR-135a expression reduced the survival of endometrial cancer cells after cisplatin treatment. Researchers indicated that miR-135a regulated cisplatin resistance in EC cells. The expression level of miR-135a was associated with cisplatin-induced apoptosis in EC cells. These findings suggest that miR-135a may affect the chemosensitivity of endometrial cancer cells to cisplatin treatment [43].

The most commonly used material for miRNA detection is tissue obtained during surgery. They can also be detected in blood, serum, urine, and other body fluids [44,45]. The method of using blood collection instead of abrasion of the uterus is much easier and carries a lower risk of complications, such as uterine infection. In the future, miRNA profile analysis may be included in routine blood tests for endometrial cancer screening in the

general population. This is of great importance, especially for patients living in places with difficult access to health care.

2. MicroRNAs in Endometrial Cancer Patients

2.1. The Process of Carcinogenesis

The development of endometrial cancer is a complex process involving multiple oncogenes and tumor suppressor genes, although the molecular mechanisms are not clear. In recent years, many studies have been conducted on the expression and function of miRNAs in endometrial cancer [46–49]. Cancer progression involves several key steps (Figure 1), including primary tumor growth, migration, and local invasion, transendothelial migration of cancer cells into vessels known as intravasation, survival in the circulatory system, extravasation, and niche formation (pre-metastatic niche). This is followed by the recruitment of tumor-promoting immune cells and metastasis. Each stage of carcinogenesis is regulated by many miRs (Table 1).

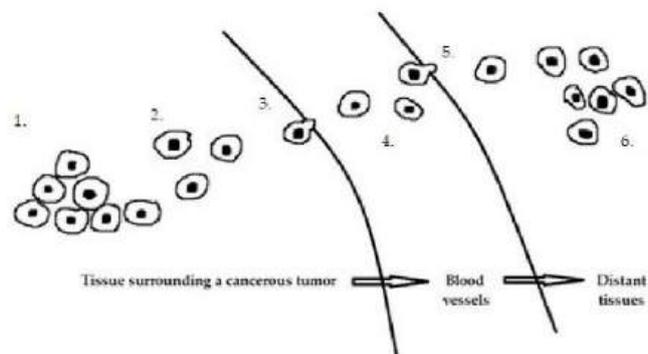


Figure 1. Stages of cancer progression: 1. Primary tumor growth. 2. Migration and local invasion. 3. Transendothelial migration of cancer cells into vessels. 4. Survival in the circulatory system. 5. Extravasation. 6. Pre-metastatic niche formation.

Table 1. miRNAs of significance for the individual stage of carcinogenesis.

Primary Tumor Growth		
miR-15/16	↓	The miR-15/16 family is a highly expressed tumor suppressor group that targets a large network of genes in T cells to limit their cell cycle, memory formation, and survival. Once activated, miR-15/16 T cells are downregulated, allowing rapid expansion of differentiated effector T cells to mediate a sustained immune response. MiR-15/16 deficiency alters Treg expression of critical functional proteins, including FOXP3, IL2R α /CD25, CTLA4, PD-1, and IL7R α /CD127, and results in the accumulation of functionally impaired FOXP3 ^{lo} CD25 ^{lo} CD127 ^{hi} Tregs [50].
miR-17/91	↑	Involved in immune regulation, three clusters of the miR-17/92 family collectively suppressed IL-12 production in macrophages, and miR-17/92 acts through PTEN to inhibit IL-12 expression by modulating the PI3K-Akt-GSK3 pathway [51].
miR-34	↓	It is involved in the regulation of the cell cycle and apoptosis through p53 signaling [52]. It acts as a tumor suppressor through DNA methylation in both epithelial and hematological malignancies [53].
miR-181a	↑	It can interact with <i>H3F3B</i> , <i>ATM</i> , <i>CCDC6</i> , <i>TAM15</i> , <i>RAS</i> , and <i>PLAG1</i> to promote cell proliferation [54].
miR-200	↓	Targets ZEB1 and blocks the epithelial–mesenchymal transition [55].

Table 1. Cont.

miR-211	↑	Targets mRNAs: <i>POU3F2</i> , <i>ZCCHC24</i> , <i>PRLR</i> , <i>ITPR1</i> , and <i>CHRDL1</i> [56].
miR-222	↑	Targets tumor suppressors <i>PTEN</i> and <i>TIMP3</i> . Targets <i>MMP-2</i> i <i>MMP-9</i> [42,57].
Let7	↓	Acting through Lin28, it targets <i>RAS</i> genes. Overexpression of let-7 leads to a decrease in <i>RAS</i> production, accelerating the cell cycle, angiogenesis, and cell adhesion. Therefore, under normal conditions, miR let-7 acts as a tumor suppressor gene and inhibits the activation of oncogenes that can lead to the formation of cancer cells [26,58].
Migration and local invasion		
miR-9	↑	MiR-9, which is upregulated in breast cancer cells, targets <i>CDH1</i> , the mRNA encoding E-cadherin, leading to increased cell motility and invasiveness. The miR-9-mediated downregulation of E-cadherin causes activation of β -catenin signaling, which contributes to the upregulation of growth factor gene expression [59].
miR-10b	↑	It increases invasion, migration, and proliferation and inhibits apoptosis in the EC [60]. It targets <i>HOXB3</i> [61].
miR-21	↑	Overexpression of miR-21-5p promoted epithelial to mesenchymal transition. It works through <i>SOX17</i> [62].
miR-29c	↓	It affects the expression of <i>HBP1</i> , <i>ITGB1</i> , <i>MCL1</i> , <i>MDM2</i> and <i>SGK1</i> [63]. Overexpression of miR-29c reduces <i>COL4A1</i> production in endometrial cells [64].
miR-34a	↓	Inverse correlation between miR-34a and <i>LICAM</i> protein expression. A decrease in miR-34a and an increase in <i>LICAM</i> are associated with poor [65]. MiR-34a is downregulated in endometrial cancer tissues and is negatively correlated with <i>Notch1</i> expression [66].
miR-103	↑	Overexpression of miR-103 promotes EC cell proliferation. It works through <i>ZO-1</i> and triggers its downward adjustments. There is an inverse correlation between <i>ZO-1</i> and miR-103 [67].
miR-107	↑	MiR-107-5p downregulated <i>Erx</i> mRNA and protein expression [68].
miR-135a	↑	MiR-135a can regulate the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) by altering the expression of E-cadherin and N-cadherin. MiR-135a promotes endometrial cancer cell proliferation by regulating <i>PTEN</i> . Expression levels of <i>PTEN</i> and p-AKT in endometrial cancer cells decreased after miR-135a overexpression [43].
miR-135b	↑	Upregulation of miR-135b significantly reduced <i>FOXO1</i> protein and mRNA expression, promoting EC proliferation [69].
miR-145	↓	MiR-145 expression is lower in EC tissues than in neighboring tissues. MiR-145 inhibits <i>SOX11</i> . MiR-145 targets site 3 (3615) of <i>SOX11</i> 3'UTR to affect <i>SOX11</i> expression [70].
miR-148b	↓	Downregulation of miR-148b induced endometrial EMT of the tumor cell as a result of alleviating <i>DNMT1</i> suppression [71]. MiR-148b regulates the expression of endoplasmic reticulum metalloprotease 1 (<i>ERMP1</i>) [72].
miR-155	↑	It impairs the functioning of dendritic cells in endometrial cancer which play an important role in the activation of anticancer immune responses. It acts via the p38MAPK14 pathway [73].
miR-214-3p	↓	MiR-214-3p is downregulated and <i>TWIST1</i> is upregulated in EC tissues and cells. Overexpression of miR-214-3p suppressed migration, invasion, and EMT in EC cells [74]. A decrease in miR-214-3p is associated with an increase in <i>NEAT1</i> , <i>HMGAI</i> , and β -catenin [75].
miR-223	↑	MiR-223 modulates the inflammatory response by directly targeting genes mediating signal transduction, including those present in the canonical NF- κ B pathway [76].
miR-340	↓	MiR-340-5p is downregulated in the EC compared to adjacent normal tissues. In vitro, miR-340-5p inhibited the migratory capacity of EC cells by downregulating <i>MMP-3</i> and <i>MMP-9</i> and prevented TGF- α 1-induced EMT by p-eIF4E [77].

Table 1. Cont.

Transendothelial migration of cancer cells into vessels		
miR-21	↑	It inhibits the suppressive effect of <i>FBXO11</i> (a member of the F-box subfamily lacking a clear unifying domain) [78].
miR-105	↑	It targets the ZO-1 protein. In endothelial monolayers, exosome-mediated transfer of tumor-secreted miR-105 effectively disrupts the tight junctions and integrity of these natural barriers to metastasis. Overexpression of miR-105 in non-metastatic cancer cells induces metastasis and vascular permeability in distant organs [79].
miR-126	↓	It is a tumor suppressor and its growth can downregulate VEGF to inhibit EC cell invasion and migration [80]. Its decrease correlates with high levels of Lnc-ATB, which induced accelerated tumor growth by regulating the miR-126 PIK3R2 target gene and Sox2-related apoptosis. In the tested RL95 and HEC1A cell lines, the downregulation of Lnc-ATB resulted in the upregulation of miR-126. There was an impairment of cell viability, an increase in caspase-3-related tumor apoptosis, and G1/S arrest [81].
Survival in the circulatory system		
miR-26a	↓	Increased peritumoral lymphoid endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) density in LNM patients was negatively associated with the level of miR-26a-5p in primary lesions, indicating that down-expression of miR-26a-5p can induce LNM EC [82].
miR-141	↑	<i>PPP1R12A</i> and <i>PPP1R12B</i> are targeted and degraded. Both are members of the myosin phosphatase (MYPT) targeting protein family [83].
miR-145-3p	↑	MiR-145 participates in M2 macrophage polarization by targeting IL-16 and upregulating IL-10 [84].
miR-181-a	↑	MiR-181a and miR-181b increased the expression of <i>PECAM-1</i> mRNA and protein and VE-cadherin accompanying the differentiation of human embryonic stem cells into vascular endothelial cells [85]. By acting on VE-cadherin, it disrupts the barrier in endothelial cells [86].
miR-424	↓	MiR-424 has a protective role in various types of cancer including endometrial cancer, upregulation of miR-424 inactivated PI3K/AKT signaling mediated by G-1 protein-coupled estrogen receptor (GPER) in endometrial cancer. Moreover, the luciferase report confirmed the targeting reaction between miR-424 and GPER [87].
Extravasation		
miR-7	↓	Through the downregulation of the PI3K and MAPK pathways, its dominant role is to inhibit proliferation and survival, stimulate apoptosis, and inhibit migration [88].
miR-21	↑	It inhibits the expression of the <i>SOX17</i> protein and promotes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [62].
miR-31	↓	MiR-31 acts as an oncogene in endometrial cancer by suppressing the hippopotamus pathway. MiR-31 significantly suppressed mRNA luciferase activity in conjunction with the <i>LATS2</i> 3'-UTR and consequently promoted the translocation of YAP1, a key molecule in the Hippo pathway, into the nucleus [89]. MiR-31 is a master regulator of integrins as it targets multiple partners of the α subunits ($\alpha 2$, $\alpha 5$, and αV) of $\beta 1$ integrins as well as $\beta 3$ integrins, inhibiting cell proliferation in a ligand-dependent manner [90].
miR-155	↓	Targets are MLH1, MSH2, and MSH6 [91].
miR-182	↑	Promotes cancer cell migration and invasion by inhibiting MBNL2 expression [92].
miR-214	↑	Targets are PTEN/AKT, β -catenin, and tyrosine kinase receptor pathways. MiR-214 also regulates the levels of key modulators of gene expression: the epigenetic repressor Ezh2, p53 "genome guardian", the transcription factors TFAP2 and another miRNA, miR-148b. Thus, miR-214 seems to play an important role in coordinating tumor proliferation, stem, angiogenesis, invasiveness, extravasation, metastasis, chemoresistance, and microenvironment [93].

Table 1. Cont.

Pre-metastatic niche formation		
miR-19a	↑	Member of the highly conservative miR-17-92 cluster [94]. The miR-17/miR-20a seed family is responsible for this anti-aging activity [95]. MiR-19a activates the mammalian protein kinase B (AKT) rapamycin (mTOR) pathway, thereby functionally antagonizing <i>PTEN</i> to promote cell survival [96].
miR-126	↑	The target is <i>VEGF</i> . It increases the rate of migration and invasion of EC cells [80].
miR-133a	↓	MiR-133a is a suppressor. The miR-1/133a cluster directly regulates <i>PDE7A</i> in EC cells. PDEs are enzymes that regulate the cellular levels of cAMP and cGMP second messengers by controlling their rate of degradation [97].
miR-503	↓	It plays a tumor suppressor role by targeting <i>CCND1</i> [98].

↑ Upregulation; ↓ Downregulation.

2.2. Risk Factors and Prognostic Factors

Risk factors for EC include genetic predisposition to Lynch syndrome and Cowden syndrome, polycystic ovary syndrome (PCOS), use of tamoxifen, infertility, diabetes, and obesity [99–101]. On the other hand, prognostic factors for EC include the patient's age, stage of endometrial cancer, involvement of lymph nodes, and lymphatic space (LVSI) [102].

2.2.1. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)

PCOS is the most common endocrine disorder among young women of reproductive age. It is characterized by rare or absent ovulation and hyperandrogenism. In patients with PCOS, other factors of endometrial cancer are often diagnosed, such as diabetes, obesity, and nulliparous status [103]. MiRNAs have been studied in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) [104]. This is a large group of mostly young women. The worldwide prevalence of PCOS ranges from 4–21% [105]. Obesity with or without concomitant diabetes often coexists in these women [106]. Many abnormalities and overexpression of many miRNAs have been found in them. It has been discovered that changes in their expression occurring in PCOS are also often associated with metabolic syndrome, which includes hypertension, dyslipidemia, central obesity, and impaired glucose tolerance [107].

PCOS increases the risk of developing endometrial cancer 2.7 times. It has been shown that women with PCOS also change the level of miRNAs, e.g., miR-27a-5p, the level of which is increased in serum-derived exosomes. MiR-27a-5p plays a role in EC cell migration and invasion by regulating *SMAD4* [108].

2.2.2. Obesity and Diabetes

Altered expression patterns of miRNAs are not only associated with cancer development but also with comorbidities that are common in patients with EC. These diseases include obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases [109]. They are risk factors for many cancers, including endometrial cancer. Another important risk factor in EC carcinogenesis is excessive estrogenic stimulation of the endometrium with a simultaneous lack of progesterone effect. This is the case with polycyclic ovary syndrome (PCOS), obesity, functional tumors, and iatrogenic use of estrogens [103,110,111]. Serum miRNA levels were abnormal in obese women or women with type 2 diabetes, data are summarized in Table 2.

Table 2. MiRNA changes in obese women.

Upregulation	miR-17 [112] miR-152 [112] miR-205 [113] miR-376a [114] miR-548ag [115]
--------------	---

Table 2. *Cont.*

Downregulation	miR-15b [116]
	miR-17 [117]
	miR-138 [112]
	miR-150 [118]
	miR-593 [112]

2.2.3. Aging of the Body

Aging is a natural and multifactorial phenomenon characterized by the accumulation of degenerative processes, which in turn are underpinned by multiple changes and damages in molecular pathways [119,120]. Despite many theories that have been proposed to explain the phenomenon of aging, none has been able to fully explain the mechanisms that drive the underlying process so far [120]. MiRNA expression also changes with the age of patients [121]. Some of these were downregulated in long-lived individuals, such as let-7, miR-17, and miR-34 (known as longevity miRNAs). They are conserved in humans and probably promote life extension. Conversely, they are upregulated in age-related diseases such as cancer [122]. MiR-151a-3p, miR-181a-5p, and miR-1248 are downregulated with age [120,123]. In contrast, miR-21 and miR-23a expression increases in middle-aged humans and decreases in advanced age [124].

2.2.4. Involvement of the Lymph Nodes Metastasis

One of the most important prognostic factors used to determine the stage of EC and possible adjuvant treatment is the presence of neoplastic cells in the lymph nodes. Lymphadenectomy is associated with significant surgical and postoperative risks. The use of sentinel lymph node mapping (SLNM) has emerged as an alternative method for total lymphadenectomy in the EC [125]. However, controversy remains over the use of SLNM in high-risk diseases and its false-negative rate (3%) [126]. Reliable SLNM mapping requires surgeons and institutions to be equipped with appropriate knowledge and skills. In addition, SLNM mapping is performed during the operation. It is also worth remembering that the involvement of lymph nodes may also engage paraaortic nodes. Isolated involvement of the paraaortic nodes in patients without pelvic nodal metastases was only 1% [127]. Therefore, finding pre-operative methods that can accurately identify LNM (lymph node metastasis) would be of great clinical value. MiRNA mapping may prove to be such a way. A correlation of miRNAs depending on the presence of relapses in lymph nodes has been demonstrated. Table 3 summarizes the above data.

Table 3. MicroRNAs changes in metastatic lymph nodes.

Upregulation	miR-21 [128]
	miR-107-5p [68]
	miR-429 [129,130]
	miR-501 [131]
	miR-576-5p [132]
Downregulation	miR-24b-5p [133]
	miR-26a-5p [82]
	miR-34a [65,66]
	miR-34b-5p [134]
	miR-34c-3p [134]
	miR-34c-5p [134]
	miR-148b [71]
miR-204-5p [126]	
miR-505 [135]	

2.2.5. The Impact of miRNA Changes on Survival and Recurrence in Patients with Endometrial Cancer

Mortality related to endometrial cancer continues to increase [136]. Although most patients with endometrial cancer have a tumor confined to the uterus that is treated by hysterectomy with or without adjuvant therapy, the advanced disease has a poor prognosis [137]. Although early-stage endometrial cancer is associated with a favorable 5-year relative survival rate (96%), the rate is only 18% in patients with distant metastases [138]. Patients with an increase in the recurrence-free period were examined and changes in microRNA levels were also found here (Table 4).

Table 4. MicroRNA changes occurring in patients with good prognosis, with long PFS (progression-free survival).

Upregulation	miR-29b [139]
	miR-126 [81]
	miR-148b [71,72]
	miR-152 [140,141]
	miR-199a-5p [133]
	miR-214-3p [74]
	miR-340-5p [77]
	miR-455-5p [133]
miR-505 [135]	
Downregulation	miR-429 [129]

On the other hand, the factors associated with shortening the recurrence-free period are a high expression of miR-21 [128] or miR-205 [142].

Changes in miRNA expression levels are clearly visible in tumor tissue but can also be seen in plasma/serum. In patients with endometrial cancer, two groups—increased and decreased expression—were distinguished. Disorders of miRNA expression in plasma/serum are summarized in Table 5. Such studies are particularly important due to the ease of obtaining material for research.

Table 5. Serum miRNA changes in patients with endometrial cancer.

Upregulation	miR-15a-5p [143]
	miR-20b-5p [144]
	miR-27a [145]
	miR-106b-5p [143]
	miR-107 [143]
	miR-143 [44,144]
	miR-143-3p [144]
	miR-150-5p [145]
	miR-186 [146,147]
	miR-195-5p [144]
	miR-200a [146]
	miR-203 [146]
	miR-204 [146]
	miR-204-5p [144]
	miR-222 [146,147]
	miR-223 [146,147]
	miR-423-3p [144]
	miR-449 [146]
	miR-484 [144]
	miR-887-5p [148]

Table 5. Cont.

Downregulation	miR-16 [44] miR-99b [44] miR-125 [44] miR-145 [44] miR-204 [147]
----------------	--

3. Overview of Selected microRNAs

3.1. MiR-205

Multiple studies have shown that miR-205 is overexpressed in the EC compared to normal endometrial tissues. It was previously reported that miR-205 upregulation was significantly correlated with advanced disease stage, relapse incidence, and poor EC survival rates [142,149]. MiR-205 is involved in regulating the expression of PTEN, which is the most common mutated tumor suppressor gene [150,151]. This mutation is also found in endometrial cancer and accounts for 25–83% of cases [152]. PTEN performs an important inhibitory function by promoting apoptosis and proliferation. Its deletion or mutation leads to carcinogenesis. Zhang et al. observed that miR-205 was significantly upregulated in the Ishikawa cell line compared to normal endometrium [153]. MiR-205 interacted directly with the 3'-UTR region of the PTEN gene. Overexpression of miR-205 decreased PTEN mRNA and protein levels in Ishikawa cells. Zhang et al. further reported that miR-205 blocked PTEN translation and activated the AKT pathway. Constitutive activation of AKT contributes to tumor progression and regulates several downstream targets (e.g., TP53 and BCL-2). Downregulation of miR-205 expression is followed by decreased levels of p53 protein and increased levels of BCL-2 protein. Since the TP53 and BCL-2 genes are involved in cell growth, apoptosis, and proliferation, these results provide the basis for further research into the role of miR-205 in EC cells. Also, the rate of cell apoptosis can be inhibited by miR-205. MiR-205 acts as an oncogene and inhibits cellular apoptosis in the EC by targeting the PTEN/AKT pathway [153].

It should also be noted that miR-205 plays an important role in the migration and invasion of endometrial cancer. This mechanism is based on the targeting of miR-205 to the AKT pathway.

Inhibition of E-cadherin expression and promotion of Snail expression by activating AKT and downregulation of glycogen synthesizing kinase 3 β were associated with overexpression of miR-205. The molecular mechanism of action of miR-205 regulating the epithelial–mesenchymal transition (EMT) by activating AKT signaling in endometrial cancer cells in the HEC-50B and HEC-1-A cell lines was described by Jin C. et al. [154].

In addition, several studies have reported that miR-205 inhibits the tumor suppressor gene JPH4, promoting tumorigenesis and progression [46].

3.2. MiR-34

The miR-34 family has three members, i.e., miR-34a, miR-34b, and miR-34c. MiR-34a, b, and c are encoded by two different transcription units. MiR-34a is located on chromosome 1p36.22 and has a unique transcript, while miR-34b and miR-34c share one transcript that is located on chromosome 11q23.1 [155].

MiR-34 is a direct target of the tumor protein p53 (TP53), a tumor suppressor gene that causes cell cycle arrest and apoptosis when activated under cellular stress. Inactivation of p53 can result in a cellular environment that contributes to oncogenesis [52].

It was shown that miR-34c acted as a tumor suppressor in human endometrial carcinoma 1b (HEC-1b) with the E2F3 transcription factor being one of its targets [156].

Reduced miR-34 expression is a negative prognostic factor for serous endometrial cancer and is strongly associated with LVSI. These data reinforce knowledge about the miR-34 family (miR-34a, b, and c), which appears to act as a tumor suppressor [157].

The miR-34 family acts as a negative regulator of cancer-related EMT and plays a large role in suppressing carcinogenesis and delaying tumor progression. As an excellent tumor

suppressor, miR-34a is a cancer therapy agent. Many studies have been conducted on miR-34a and verified its suppressive role in cancer. However, some challenges have arisen with the use of miR-34a therapy. One of them is the aforementioned miRNA degradation. RNase is rich in serum and easily denatures miR-34a, as a result of which miR-34 cannot penetrate the capillary endothelium and does not reach its target cells [158].

3.3. MiR-21

MiR-21 is overexpressed in almost all human cancers. It acts as an oncogene and may be a useful clinical biomarker and therapeutic target. Its level also increases in endometrial cancer [128].

Researchers have demonstrated different mechanisms of action of miR-21. Yan et al. studied its oncogenic role by inhibiting the tumor suppressor gene FBXO11 (a member of the F-box subfamily lacking a distinct unifying domain), subsequently inhibiting apoptosis and stopping protein degradation [78]. In another study (Tu et al.), the opposite effect of miR-21 and GAS5 (growth arrest-specific transcript 5) was observed. Reduced expression of GAS5 in tumor-associated macrophages (TAMs) in endometrial cancer has been observed. Its anticancer role consists in promoting phagocytosis, presenting antigens, and activating cytotoxic T lymphocytes. MiR-21 as an oncogene inhibits the suppressive effect of GAS5 in endometrial cancer cells [159].

As mentioned earlier, miRNAs bind to target mRNAs through sequence complementarity and lead to inhibition of translation and mRNA destabilization. It is known that this process can be influenced by lncRNAs, through lncRNA:miRNA interactions. An example of a lncRNA is MEG3, which changes the expression of miR-21 [160,161].

Another mechanism of miR-21 involvement was investigated by Li Xiao et al. and is related to tumor cell hypoxia [162].

Under hypoxic conditions, cancer cells produced significantly more exosomes than cells in normoxic conditions. Hypoxia increased miR-21 expression in exosomes. Monocytes were also transformed into M2-like polarizing macrophages by delivery of exosomal miR-21, which may be a mechanism for the immune escape of tumor cells. MiR-21 may induce a potential mechanism for creating an immune microenvironment in endometrial cancer progression [162]. Hypoxia is, therefore, an aggressive feature of endometrial cancer and an increase in miR-21 levels. This increase results in the downregulation of PTEN and a strong increase in LICAM gene expression to promote cancer cell invasion and metastasis [162].

Overexpression of miR-21-5p has also been reported to promote epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). In contrast, miR-21-5p silencing reversed EMT in endometrial cancer cell lines. This mechanism is related to the SRY-box 17 (SOX17). Overexpression of miR-21-5p significantly inhibits SOX17 protein expression in endometrial cancer cell lines. SOX17 has a suppressive effect and its overexpression promoted mesenchymal to epithelial transition, while SOX17 silencing induced EMT in endometrial cancer cell lines [62].

MiRNAs also have their regulators. Such a regulator for miR-21 is circRNA, i.e., circFAT1. Wu et al. investigated this relationship and described CircFAT1, which was upregulated in EC and positively correlated with miR-21 in EC tissues. In RL95-2 and HEC-1-A cells, circFAT1 overexpression increased miR-21 expression and decreased miR-21 gene methylation, while miR-21 overexpression did not alter circFAT1 expression. Through stem cell analysis, it was shown that overexpression of circFAT1 and miR-21 had an effect on the number of stem cells that increased. In contrast, miR-21 inhibition resulted in a reduction in the number of stem cells. In addition, the miR-21 inhibitor suppressed the role of circFAT1. In conclusion, circFAT1 is upregulated in the EC and can increase the number of tumor cells by upregulating miR-21 [163].

3.4. MiR-182

It promotes cell proliferation by targeting the tumor suppressor gene TCEAL7 (transcription elongation factor 7-like), which interacts with the E-box sequences of the Myc cyclin D1 target gene. By affecting the regulation of Myc activity and the expression of

cyclin D1, it causes cell proliferation and malignant transformation. Downregulation of TCEAL7 is associated with larger tumor size, higher tumor stage, and poor prognosis [164].

According to Donkers, miR-182 can potentially be used to distinguish high-grade disease from low-grade disease [46].

Devor et al. studied the association of miR-182 and the altered expression of cullin-5 (CUL5), a member of the ubiquitin ligase family cullin-RING E3. They showed that there were two miR-182 binding sites in the 3'-UTR of the CUL5 gene and that miR-182 was overexpressed in two EC model cell lines of Ishikawa H and Hec50co. They showed that CUL5 was the target of miR-182 in EC. Upregulation of miR-182 results in downregulation of CUL5, which promotes EC proliferation [165].

Myatt et al. studied changes in the levels of some miRNAs and the tumor suppressor FOXO1. They showed that FOXO1 was downregulated in endometrial cancer compared to normal endometrium. Whereas, the miRNA including miR-182 was upregulated. The target of miR-182 was probably the 3'-untranslated region of FOXO1 transcripts [166].

3.5. MiR-200

It is a whole family consisting of miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429, and miR-141. It negatively regulates two transcription factors, ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1) and ZEB2, which are well-known suppressors of E-cadherin transcription [55,167]. E-cadherin is a calcium-dependent transmembrane epithelial adhesive molecule involved in cell cohesion. Reduced expression of E-cadherin has been linked to reduced cell-cell adhesion, metastasis potential, tumor differentiation, and deep myometrial invasion in endometrial and other cancers. In endometrial cancer, loss of E-cadherin is strongly associated with histological subtypes where loss is more prevalent in EEC grade 3 compared to serous carcinoma [46].

By targeting E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2, the miR-200 family can regulate the epithelial-to-mesenchymal transition and protect cancer cells from apoptosis [168].

MMP2 is an enzyme that degrades type 4 collagen, the main structural component of basement membranes. This enzyme plays a role in the menstrual breakdown of the endometrium, regulation of vascularity, and tumor metastasis. The natural MMP2 inhibitor is TIMP2 (tissue metalloproteinase 2 inhibitor), it is a metastasis suppressor. MiR-200b suppresses TIMP2 expression and increases the activity of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) [168].

MMP2 expression in endometrial cancer correlates with the histological grade of the tumor, its invasion, or metastases. Increased MMP2 expression and low TIMP2 expression are the strongest markers of endometrial malignancies with a high risk of local and distant metastases [168].

Both miR-200a and miR-200b belong to the miR-200 family, but they have different target genes, which is related to the difference in the seed regions [168].

MiR-200b is overexpressed in endometrial adenocarcinomas. It specifically inhibits TIMP2 expression and increases MMP2 activity in HEC-1A cells. Both MiR-200b and TIMP2 and MMP2 probably play an important role in the initiation and further development of endometrial adenocarcinoma [168].

3.6. MiR-103

MiR-103 has an oncogenic effect. Overexpression of miR-103 increases EC cell proliferation, while downregulation has the opposite effect. ZO-1 is directly suppressed by miR-103. Silencing ZO-1 significantly promotes EC cell proliferation [67].

A possible therapeutic target for miR-103 is TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression). Yu et al. studied the effect of miR-103 on TIMP using a TIMP-3 inhibitor. They showed that miR-103 after transcription downregulated the expression of the tumor suppressor TIMP-3 and stimulated growth and invasion in endometrial cancer cell lines [169].

An important pathway in the pathogenesis of endometrial cancer is the GAS5-miR-103-PTEN pathway. GAS5 is a tumor suppressor gene important in stopping cancer formation. It works by inhibiting the expression of the miR-103 oncogene, which increases the expression of PTEN and promotes the apoptosis of cancer cells. Guo et al. conducted a study in which they studied the GAS5-miR-103-PTEN pathway and found that it may be a new therapeutic target in the treatment of endometrial cancer [170].

3.7. MiR-105

The miR-105 family, which consists of three members (miR-105-1, miR-105-2, and miR-767). It is located on the human Xq28 chromosome. MiR-105 may play an oncogenic or suppressor role in various cancers [171]. In endometrial cancer, it serves as a tumor inhibitor. It is weakly expressed in tumor tissues and endometrial cancer cell lines. Further upregulation of miR-105 inhibits the proliferation and metastatic potential of endometrial cancer cells. A potential target of miR-105 is SOX9. It has been validated as an miR-105 target transcript. MiR-105 likely inhibits the epithelial–mesenchymal transition and gastric cancer metastasis by targeting SOX9. SOX9 is well established as a redundant transcription factor regulating many developmental signaling pathways and its aberrant expression has been associated with tumor initiation, proliferation, metastasis, and stem cell maintenance. This is also true for endometrial cancer, as SOX9 has been reported as an independent risk factor for endometrial hyperplasia in the uterine epithelium, which is a precursor to endometrial cancer. In addition, overexpression of SOX9 was found to cause proliferation of endometrial cancer cells. Other molecules can also act through miR-105, such as Circ_0109046, which acts as an oncogene in endometrial cancer. This affects the development of cancer and its metastases [172].

In other cancers, its function in promoting tumor metastasis has been demonstrated by destroying the vascular endothelial barrier. This mechanism is based on the ZO1 protein and has been described in breast cancer [79].

3.8. MiR-136

MiR-136 has also been studied in various cancers. MiR-136 has been identified as a tumor suppressor gene in various adenocarcinomas such as breast cancer, colon cancer, and lung cancer [173–175].

MiR-136 acts as spongeRNA for circ_PUM1. Circ_PUM1 plays a key role in the development and progression of endometrial cancer, mainly through the uptake of miR-136 via a “sponge” effect, thereby promoting the expression of the NOTCH3 target gene [176].

Zong et al. revealed that miR-136 was an anti-proliferative and anti-metastatic miR in the EC [176].

MiR-136 acts as a spongeRNA also for another circRNA, i.e., circ_0109046. Shi Y. et al. studied the mechanism of action of circ_0109046 sponged miR-136 to regulate HMGA2 via the ceRNA mechanism [177]. Shi Y et al. showed that miR-136 directly targeted HMGA2. HMGA2 is a common oncogenic factor and is involved in various cellular processes including cell proliferation, apoptosis, and differentiation. Meanwhile, HMGA2 accelerates tumor progression in gynecological cancers, including cervical cancer, breast cancer, and ovarian cancer. Ma et al. suggested that miR-302a-5p/367-3p-mediated HMGA2 promoted EC cell malignancy [178]. In a study by Shi Y. et al., HMGA2 was identified as a target for miR-136. Importantly, HMGA2 augmentation abolished miR-136 mimic inhibition in EC development [177].

Li et al. studied miR-136 levels in EC stem cells. They showed that it was significantly reduced in EC tissues and its expression correlated with different FIGO stages and grades. By means of a survival analysis, it was shown that patients with low miR-136 expression had a worse prognosis. It was also shown that the expression of miR-136 in endometrial cancer stem cells (ECSC) was significantly lower than in non-stem cells [179]. Overexpression of miR-136 can inhibit EC cell proliferation, migration, and invasion. Overexpression of

miR-136 may also promote cell apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. They also inhibit the ability of EC cells to form a ball [179].

3.9. MiR-155

MiR-155 negatively regulates p38 protein levels by directly binding to the 3'UTR region of the target mRNA. MiR-155 has a negative effect on the functioning of DCs (dendritic cells, antigen-presenting cells), which plays an important role in the activation of anticancer immune responses. It acts by silencing p38, via the p38 MAPK14 pathway [73].

Yamamoto and Imai studied microsatellite instability (MSI), which is a hallmark of Lynch syndrome [180]. This is an important direction of research because the probability of developing EC as the first tumor in this syndrome is 40–60% [181]. They showed that overexpression of miR-155 or miR-21 downregulated MMR gene expression. MSI-induced frameshift mutation gene targets are involved in essential cellular functions including, for example, DNA repair (MSH3 and MSH6), cell signaling (TGFB2 and ACVR2A), apoptosis (BAX), epigenetic regulation (HDAC2 and ARID1A) and processing miRNAs (TARBP2 and XPO5), and the MSI + CRC subset reportedly shows a mutant phenotype of the miRNA machine [180].

Another study observed reduced levels of IGF1 (insulin-like growth factor 1), MYLK (myosin chain kinase), and overexpression of SOD2 (superoxide dismutase 2) associated with dysregulation of proliferative processes in the EC. MiR-155 was possibly involved in the regulation of MYLK activity in the EC. Its overexpression may promote uncontrolled tumor proliferation and progression [182].

MiR-155 acts on the angiotensin II receptor type 1 (AGTR1) by inhibiting it. Choi et al. studied this compound using anti-miR-155. They found that combination therapy with anti-miR-155 and losartan had a synergistic effect and has an antiproliferative effect [183].

3.10. MiR-372

It acts as a tumor suppressor and inhibits the occurrence and development of endometrial cancer. Its expression is much lower in the EC than in healthy endometrial tissues. Overexpression of miR-372 suppressed cell proliferation, migration, and invasion and led to G1 phase arrest. MiR-372 also promotes apoptosis of endometrial cancer cells in vitro. Researchers detected the expression of known miR-372 targets in other malignancies. They showed that cyclin A1 and cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) were downregulated by miR-372. It was also shown that transfection of miR-372 reduces the expression of RhoC, matrix metalloproteinase 2 (MMP2), and MMP9, while it increases expression of cleaved polymerase poly (ADP ribose) (PARP) and bcl-2-linked protein X (Bax) [184].

Another tested target for miR-372 was PRMT6 (protein arginine methyltransferases). PRMT6 overexpression promotes EC cell proliferation and migration and is significantly associated with higher tumor histology grades and unfavorable prognosis. PRMT6 induces AKT and mTOR phosphorylation in the EC. MK2206 or rapamycin inhibits the AKT/mTOR pathway via PRMT6. miR-372-3p expression downregulates PRMT6. In clinical trials, PRMT6 expression was associated with low miR-372-3p expression [185].

3.11. MiR-93

MiR-93 derives from the paralog (miR-106b-25) of the miR-17-92 [186] cluster. Its high expression is associated with the short survival of patients with endometrial cancer. In biological experiments conducted in vitro, miR-93-5p overexpression has been shown to promote the proliferation and migration of endometrial cancer cells. Therefore, it is very possible that miR-93-5p promotes the development of endometrial cancer [187].

Chen et al. studied miR-93, which was highly expressed in endometrial cancer tissues. Overexpression of miR-93 promoted the migration and invasion of endometrial cancer cells and decreased E-cadherin expression and increased N-cadherin expression without changing RhoC expression in the EC. MiR-93 promotes EMT, migration, and invasion in endometrial cancer cells by regulating FOXA1 [186].

3.12. MiR-125

One important family of miRNAs is the miR-125 family, which includes miR-125a, miR-125b1, and 125b2, which produce nearly identical products of different genes. The miR-125b is of particular interest. Human miR-125b is found throughout the human body and is the highest expressed in the brain and ovaries, followed by the thyroid, pituitary, epididymis, spleen, testes, prostate, uterus, placenta, and liver. MiR-125b can be upregulated, e.g., in colorectal cancer or hematopoietic tumors. However, it may be strongly reduced in breast tumors and hepatocellular carcinoma [188]. Shang et al. showed that miR-125b was downregulated by about 30% in endometrial cancer. Downregulation of miR-125b increased cell invasiveness that could be rescued by overexpression of miR-125b. The direct target for miR-125b is ERBB2. ERBB2 has been shown to modulate microRNA activity by binding to microRNA targeting sequences on the 3'UTR of target mRNAs. ERBB2, encoded as a member of the epidermal growth factor (EGF) receptor family of receptor tyrosine kinases, is associated with increased invasion as a proto-oncogene [189].

3.13. MiR-222

MiR-222 has been studied as one of the markers to detect endometrial cancer in patients. Montagnana et al. showed higher serum miR-222 levels in EC patients compared to controls [147].

Donkers et al. studied urinary miR levels and showed that miR-222 expression was significantly reduced in older women [45].

Liu and others studied miR-222-3p and showed that it targeted ER α . miR-222-3p expression is negatively correlated with ER α . Overexpression of miR-222-3p in RL95-2 cells promotes cell proliferation, increased invasiveness, and induces a G1 to S phase shift in the cell cycle. In addition, the researchers showed that miR-222-3p expression was significantly lower in ER α -positive than in ER α -negative EC tissue samples and that the miR-222-3p expression level is inversely correlated with ER α expression. The miR-222-3p expression level is lower in lower-grade tumors. In addition, miR-222-3p was positively associated with lymph node metastases [42].

3.14. Let-7

The Let-7 miRNA family was first discovered in nematodes and has as many as 13 members that are located on 9 different chromosomes. Their role is to control the time of division, differentiation, and proliferation of stem cells. They play an important role in carcinogenesis. Its reduced expression is found in the bladder, breast, colorectal, cervical, endometrial, head and neck, lung, ovarian, prostate, and kidney cancers. let-7's role is to regulate cell differentiation and proliferation as well as inhibit cancer cells by directly acting on RAS genes via LIN28. Let-7 and LIN28 both have inhibitory effects on each other. Decreased let-7 levels result in increased RAS levels leading to tumor cell proliferation [26].

Zhang et al. have shown that the activated estrogen receptor can repress BAX expression by regulating a group of microRNAs including but not limited to members of the has-let-7 family. This results in the promotion of an increased BCL2/BAX ratio as well as increased survival and proliferation in affected cells. These ER-regulated has-let-7 microRNAs can be detected in most endometrial hyperplasias and may be potentially useful indicators of estrogen overexposure [58].

Let-7 (lethal-7) has been described in the pathogenesis of ovarian germ cell tumors (GCT). Let-7 is regulated by the RNA-binding protein LIN-28 homolog A (LIN28). GST LIN28-positive tumors have been shown to be downregulated let-7 [190].

3.15. MiR-429

MiR-429 belongs to the miR-200 family and its dysregulation is involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT), progression, development, invasion, metastasis, apoptosis, and drug resistance of various cancers.

Its target is *PTEN*, which is a significant tumor suppressor gene in the EC. As reported by Yoneyama et al., overexpression of miR-429 in EC results in downregulation in EWG *PTEN*. The putative recognition site for miR-429 is the 3' untranslated *PTEN* region (3'-UTR) [129].

4. Summary

MiRNAs play an important role in carcinogenesis and have been the subject of many studies in this field. Carcinogenesis is a complex process involving the dysregulation of many genes, and, therefore, studies on the functions and targets of miRNAs will expand our understanding of the molecular mechanisms that control cancer development [168].

The role of miRNA is the subject of research, e.g., in the etiopathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS). It has been proven in the literature that in patients with metabolic syndrome a change in miRNA expression occurs. The question we are still looking for an answer to is whether these changes are the direct cause of endometrial cancer and if carcinogenesis can be prevented by changes in epigenetics. Another question is how can changes in miRNAs be observed in this group of patients since it is known that their levels can change with the aging of the body.

A large group of PCOS patients uses Metformin [191]. It is a hypoglycaemic drug that, in short, works in three ways: it reduces hepatic glucose production, increases muscle insulin sensitivity, and delays glucose absorption in the intestine [191]. It also affects changes in miRNA expression [192]. MiR-20a-5p expression was shown to be increased in women with PCOS using Metformin [193]. In contrast, the following miRNAs were decreased: miR-122, miR-29a, and miR-223 [194]. Metformin facilitates weight loss, so will it prevent the development of endometrial cancer?

Studies on the effect of exercise and physical activity on weight loss have also been conducted. A decrease in miR-423-5p expression, a drop in whole-body insulin resistance, and an increase in liver insulin sensitivity have been demonstrated [195]. Some physical exercises can alter miRNAs in skeletal muscle, heart muscle, bone, adipose tissue, liver, brain, and body fluids [196]. However, it has not been shown whether they have an effect on reducing the risk of endometrial cancer.

There is a need to develop new biomarkers for the detection of endometrial cancer and for these markers to accurately distinguish between low-grade (stage 1 and grade 2) or high-grade (stage 3) endometrioid cancer lesions. Chen et al. reported unique miRNA signatures for endometrial cancer, based on the following miRs: miR-652, miR-3170, miR-195, miR-34a, and miR-934 [197]. Such signatures were also created for the differentially expressed miRNA (DEmiR) step to help predict high-risk gynecological cancer patients and demonstrate their role in early and late disease.

MiRNAs may be promising biomarkers. They can be detected in solid tissue samples, but also in blood, serum [44], urine [45], and other body fluids [198]. Since they can be detected in urine and are stable there, urine appears to be a promising non-invasive test for the detection of EC [45,199]. To date, it has not been established which type of sample can be used to obtain the most reliable biomarker for the detection of endometrial cancer.

Author Contributions: Writing—review and editing, A.B., I.Z., N.P., T.Z., M.K. and T.K.; supervision, A.B., I.Z., N.P. and T.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#)
- Crosbie, E.J.; Kitson, S.J.; McAlpine, J.N.; Mukhopadhyay, A.; Powell, M.E.; Singh, N. Endometrial cancer. *Lancet* **2022**, *399*, 1412–1428. [\[CrossRef\]](#)
- Makker, V.; MacKay, H.; Ray-Coquard, I.; Levine, D.A.; Westin, S.N.; Aoki, D.; Oaknin, A. Endometrial cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**, *7*, 88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kandoth, C.; Schultz, N.; Cherniack, A.D.; Akbani, R.; Liu, Y.; Shen, H.; Robertson, A.G.; Pashtan, I.; Shen, R.; Benz, C.C.; et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **2013**, *497*, 67–73. [\[CrossRef\]](#)
- León-Castillo, A.; de Boer, S.M.; Powell, M.E.; Mileskin, L.R.; Mackay, H.J.; Leary, A.; Nijman, H.W.; Singh, N.; Pollock, P.M.; Bessette, P.; et al. Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 3388–3397. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stelloo, E.; Nout, R.A.; Osse, E.M.; Jürgenliemk-Schulz, I.J.; Jobsen, J.J.; Lutgens, L.C.; van der Steen-Banasik, E.M.; Nijman, H.W.; Putter, H.; Bosse, T.; et al. Improved Risk Assessment by Integrating Molecular and Clinicopathological Factors in Early-stage Endometrial Cancer-Combined Analysis of the PORTEC Cohorts. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 4215–4224. [\[CrossRef\]](#)
- Dowdy, S.C.; Glaser, G.E. Adjuvant therapy for women with high-risk endometrial carcinoma. *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 268–269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Matei, D.; Filiaci, V.; Randall, M.E.; Mutch, D.; Steinhoff, M.M.; DiSilvestro, P.A.; Moxley, K.M.; Kim, Y.M.; Powell, M.A.; O'Malley, D.M.; et al. Adjuvant Chemotherapy plus Radiation for Locally Advanced Endometrial Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 2317–2326. [\[CrossRef\]](#)
- Stasenko, M.; Feit, N.; Lee, S.S.K.; Shepherd, C.; Soslow, R.A.; Cadoo, K.A.; Alektiar, K.; Da Silva, E.M.; Martins Sebastião, A.P.; Leitao, M.M.; et al. Clinical patterns and genomic profiling of recurrent 'ultra-low risk' endometrial cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2020**, *30*, 717–723. [\[CrossRef\]](#)
- Vallone, C.; Rigon, G.; Gulia, C.; Baffa, A.; Votino, R.; Morosetti, G.; Zaami, S.; Briganti, V.; Catania, F.; Gaffi, M.; et al. Non-Coding RNAs and Endometrial Cancer. *Genes* **2018**, *9*, 187. [\[CrossRef\]](#)
- Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **1993**, *75*, 843–854. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kim, V.N. MicroRNA precursors in motion: Exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 156–159. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lin, S.; Gregory, R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 321–333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Peng, Y.; Croce, C.M. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target Ther.* **2016**, *1*, 15004. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Fabian, M.R.; Sonenberg, N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: A look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 586–593. [\[CrossRef\]](#)
- Bartel, D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **2004**, *116*, 281–297. [\[CrossRef\]](#)
- Grzywa, T.M.; Klicka, K.; Włodarski, P.K. Regulators at Every Step—How microRNAs Drive Tumor Cell Invasiveness and Metastasis. *Cancers* **2020**, *12*, 3709. [\[CrossRef\]](#)
- Chiu, H.C.; Li, C.J.; Yiang, G.T.; Tsai, A.P.; Wu, M.Y. Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Biology of Molecular Regulation in Endometrial Carcinogenesis. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 439. [\[CrossRef\]](#)
- Vincent, K.; Pichler, M.; Lee, G.W.; Ling, H. MicroRNAs, genomic instability and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 14475–14491. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Shirjang, S.; Mansoori, B.; Asghari, S.; Duijf, P.H.G.; Mohammadi, A.; Gjerstorff, M.; Baradaran, B. MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *139*, 1–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pedroza-Torres, A.; Romero-Córdoba, S.L.; Justo-Garrido, M.; Salido-Guadarrama, I.; Rodríguez-Bautista, R.; Montaña, S.; Muñoz-Mendoza, R.; Arriaga-Canon, C.; Frago-Ontiveros, V.; Álvarez-Gómez, R.M.; et al. MicroRNAs in Tumor Cell Metabolism: Roles and Therapeutic Opportunities. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1404. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, Y.; Wang, L.; Chen, C.; Chu, X. New insights into the regulatory role of microRNA in tumor angiogenesis and clinical implications. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yi, M.; Xu, L.; Jiao, Y.; Luo, S.; Li, A.; Wu, K. The role of cancer-derived microRNAs in cancer immune escape. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *13*, 25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mori, M.A.; Ludwig, R.G.; Garcia-Martin, R.; Brandão, B.B.; Kahn, C.R. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 656–673. [\[CrossRef\]](#)
- Iliopoulos, D.; Hirsch, H.A.; Struhl, K. An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* **2009**, *139*, 693–706. [\[CrossRef\]](#)
- Masood, N.; Basharat, Z.; Khan, T.; Yasmin, A. Entangling Relation of Micro RNA-let7, miRNA-200 and miRNA-125 with Various Cancers. *Pathol. Oncol. Res.* **2017**, *23*, 707–715. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Klicka, K.; Grzywa, T.M.; Klinke, A.; Mielniczuk, A.; Włodarski, P.K. The Role of miRNAs in the Regulation of Endometrial Cancer Invasiveness and Metastasis—A Systematic Review. *Cancers* **2021**, *13*, 3393. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, B.; Pan, X.; Cobb, G.P.; Anderson, T.A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* **2007**, *302*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)

29. Ciafrè, S.A.; Galardi, S.; Mangiola, A.; Ferracin, M.; Liu, C.G.; Sabatino, G.; Negrini, M.; Maira, G.; Croce, C.M.; Farace, M.G. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1351–1358. [\[CrossRef\]](#)
30. Mendiola-Soto, D.K.; Bárcenas-López, D.A.; Pérez-Amado, C.J.; Cruz-Miranda, G.M.; Mejía-Aranguré, J.M.; Ramírez-Bello, J.; Hidalgo-Miranda, A.; Jiménez-Morales, S. MiRNAs in Hematopoiesis and Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5436. [\[CrossRef\]](#)
31. Sajjadi-Dokht, M.; Merza Mohamad, T.A.; Sulaiman Rahman, H.; Suliman Maashi, M.; Danshina, S.; Shomali, N.; Solali, S.; Marofi, F.; Zeinalzadeh, E.; Akbari, M.; et al. MicroRNAs and JAK/STAT3 signaling: A new promising therapeutic axis in blood cancers. *Genes Dis.* **2022**, *9*, 849–867. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Wang, Y.; Ma, H.; Li, Y.; Su, R. MiR-192-5p-Modified Tumor-Associated Macrophages-Derived Exosome Suppressed Endometrial Cancer Progression Through Targeting IRAK1/NF- κ B Signaling. *Reprod Sci.* **2022**, *29*, 436–447. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Chen, H.X.; Xu, X.X.; Tan, B.Z.; Zhang, Z.; Zhou, X.D. MicroRNA-29b Inhibits Angiogenesis by Targeting VEGFA through the MAPK/ERK and PI3K/Akt Signaling Pathways in Endometrial Carcinoma. *Cell Physiol. Biochem.* **2017**, *41*, 933–946. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Guo, L.; Sun, B.; Wu, Q.; Yang, S.; Chen, F. miRNA-miRNA interaction implicates for potential mutual regulatory pattern. *Gene* **2012**, *511*, 187–194. [\[CrossRef\]](#)
35. Hsiao, K.Y.; Sun, H.S.; Tsai, S.J. Circular RNA—New member of noncoding RNA with novel functions. *Exp. Biol. Med.* **2017**, *242*, 1136–1141. [\[CrossRef\]](#)
36. Zheng, Q.; Bao, C.; Guo, W.; Li, S.; Chen, J.; Chen, B.; Luo, Y.; Lyu, D.; Li, Y.; Shi, G.; et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11215. [\[CrossRef\]](#)
37. Boussios, S.; Ozturk, M.A.; Moschetta, M.; Karathanasi, A.; Zakythinakis-Kyriakou, N.; Katsanos, K.H.; Christodoulou, D.K.; Pavlidis, N. The Developing Story of Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. *J. Pers. Med.* **2019**, *9*, 12. [\[CrossRef\]](#)
38. Zhao, Y.; Jin, L.J.; Zhang, X.Y. Exosomal miRNA-205 promotes breast cancer chemoresistance and tumorigenesis through E2F1. *Aging* **2021**, *13*, 18498–18514. [\[CrossRef\]](#)
39. Konoshenko, M.; Lansukhay, Y.; Krasilnikov, S.; Laktionov, P. MicroRNAs as Predictors of Lung-Cancer Resistance and Sensitivity to Cisplatin. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7594. [\[CrossRef\]](#)
40. Chen, Q.; Xia, H.W.; Ge, X.J.; Zhang, Y.C.; Tang, Q.L.; Bi, F. Serum miR-19a predicts resistance to FOLFOX chemotherapy in advanced colorectal cancer cases. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 7421–7426. [\[CrossRef\]](#)
41. Hansen, T.F.; Carlsen, A.L.; Heegaard, N.H.; Sørensen, F.B.; Jakobsen, A. Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 624–629. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Liu, B.; Che, Q.; Qiu, H.; Bao, W.; Chen, X.; Lu, W.; Li, B.; Wan, X. Elevated MiR-222-3p promotes proliferation and invasion of endometrial carcinoma via targeting ER α . *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87563. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Wang, J.; Zhang, L.; Jiang, W.; Zhang, R.; Zhang, B.; Silayiding, A.; Duan, X. MicroRNA-135a promotes proliferation, migration, invasion and induces chemoresistance of endometrial cancer cells. *Eur. J. Obs. Gynecol. Reprod Biol. X* **2020**, *5*, 100103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Kumari, P.; Sharma, I.; Saha, S.C.; Srinivasan, R.; Bhardwaj, P. Role of serum microRNAs as biomarkers for endometriosis, endometrioid carcinoma of ovary & endometrioid endometrial cancer. *Indian J. Med. Res.* **2022**, *156*, 516–523. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Donkers, H.; Hirschfeld, M.; Weiß, D.; Erbes, T.; Jäger, M.; Pijnenborg, J.; Bekkers, R.; Galaal, K. Detection of microRNA in urine to identify patients with endometrial cancer: A feasibility study. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2021**, *31*, 868–874. [\[CrossRef\]](#)
46. Donkers, H.; Hirschfeld, M.; Weiß, D.; Erbes, T.; Jaeger, M.; Pijnenborg, J.M.A.; Bekkers, R.; Galaal, K.; ENITEC-consortium. Usefulness of microRNA detection in the diagnostics of endometrial cancer. *Acta Obs. Gynecol. Scand* **2021**, *100*, 1148–1154. [\[CrossRef\]](#)
47. Liu, J.; Li, C.; Jiang, Y.; Wan, Y.; Zhou, S.; Cheng, W. Tumor-suppressor role of miR-139-5p in endometrial cancer. *Cancer Cell Int.* **2018**, *18*, 51. [\[CrossRef\]](#)
48. Wang, Q.; Xu, K.; Tong, Y.; Dai, X.; Xu, T.; He, D.; Ying, J. Novel miRNA markers for the diagnosis and prognosis of endometrial cancer. *J. Cell Mol. Med.* **2020**, *24*, 4533–4546. [\[CrossRef\]](#)
49. Witke, L.; Janikowski, T.; Gabriel, I.; Bodzek, P.; Olejek, A. Analysis of microRNA regulating cell cycle-related tumor suppressor genes in endometrial cancer patients. *Hum. Cell* **2021**, *34*, 564–569. [\[CrossRef\]](#)
50. Johansson, K.; Gagnon, J.D.; Zhou, S.; Fassett, M.S.; Schroeder, A.W.; Kageyama, R.; Bautista, R.A.; Pham, H.; Woodruff, P.G.; Ansel, K.M. An essential role for miR-15/16 in Treg suppression and restriction of proliferation. *bioRxiv* **2023**. [\[CrossRef\]](#)
51. Zhang, X.; Smith, S.M.; Wang, X.; Zhao, B.; Wu, L.; Hu, X. Three paralogous clusters of the miR-17-92 family of microRNAs restrain IL-12-mediated immune defense. *Cell Mol. Immunol.* **2021**, *18*, 1751–1760. [\[CrossRef\]](#)
52. Navarro, F.; Lieberman, J. miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0132767. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Wong, K.Y.; Yu, L.; Chim, C.S. DNA methylation of tumor suppressor miRNA genes: A lesson from the miR-34 family. *Epigenomics* **2011**, *3*, 83–92. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

54. He, S.; Zeng, S.; Zhou, Z.W.; He, Z.X.; Zhou, S.F. Hsa-microRNA-181a is a regulator of a number of cancer genes and a biomarker for endometrial carcinoma in patients: A bioinformatic and clinical study and the therapeutic implication. *Drug Des. Devel Ther.* **2015**, *9*, 1103–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gregory, P.A.; Bert, A.G.; Paterson, E.L.; Barry, S.C.; Tsykin, A.; Farshid, G.; Vadas, M.A.; Khew-Goodall, Y.; Goodall, G.J. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 593–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Li, N.; Mi, P.; Hu, Y. Construction of dysregulated long non-coding RNA-associated competing endogenous RNA network in uterine corpus endometrial carcinoma. *Transl. Cancer Res.* **2020**, *9*, 669–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Garofalo, M.; Di Leva, G.; Romano, G.; Nuovo, G.; Suh, S.S.; Ngankou, A.; Taccioli, C.; Pichiorri, F.; Alder, H.; Secchiero, P.; et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell* **2009**, *16*, 498–509. [[CrossRef](#)]
58. Zhang, R.; He, Y.; Zhang, X.; Xing, B.; Sheng, Y.; Lu, H.; Wei, Z. Estrogen receptor-regulated microRNAs contribute to the BCL2/BAX imbalance in endometrial adenocarcinoma and precancerous lesions. *Cancer Lett.* **2012**, *314*, 155–165. [[CrossRef](#)]
59. Ma, L.; Young, J.; Prabhala, H.; Pan, E.; Mestdagh, P.; Muth, D.; Teruya-Feldstein, J.; Reinhardt, F.; Onder, T.T.; Valastyan, S.; et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 247–256. [[CrossRef](#)]
60. Sheedy, P.; Medarova, Z. The fundamental role of miR-10b in metastatic cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2018**, *8*, 1674–1688.
61. Chen, H.; Fan, Y.; Xu, W.; Chen, J.; Xu, C.; Wei, X.; Fang, D.; Feng, Y. miR-10b Inhibits Apoptosis and Promotes Proliferation and Invasion of Endometrial Cancer Cells via Targeting HOXB3. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2016**, *31*, 225–231. [[CrossRef](#)]
62. Wang, C.; Li, Q.; He, Y. MicroRNA-21-5p promotes epithelial to mesenchymal transition by targeting SRY-box 17 in endometrial cancer. *Oncol. Rep.* **2020**, *43*, 1897–1905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Van Sinderen, M.; Griffiths, M.; Menkhorst, E.; Niven, K.; Dimitriadis, E. Restoration of microRNA-29c in type I endometrioid cancer reduced endometrial cancer cell growth. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 2684–2693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Griffiths, M.; Van Sinderen, M.; Rainczuk, K.; Dimitriadis, E. miR-29c overexpression and COL4A1 downregulation in infertile human endometrium reduces endometrial epithelial cell adhesive capacity in vitro implying roles in receptivity. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Corrado, G.; Laquintana, V.; Loria, R.; Carosi, M.; de Salvo, L.; Sperduti, I.; Zampa, A.; Cicchillitti, L.; Piaggio, G.; Cutillo, G.; et al. Endometrial cancer prognosis correlates with the expression of LICAM and miR34a biomarkers. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 139. [[CrossRef](#)]
66. Wang, Z.; Wang, W.; Huang, K.; Wang, Y.; Li, J.; Yang, X. MicroRNA-34a inhibits cells proliferation and invasion by downregulating Notch1 in endometrial cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 111258–111270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Du, J.; Zhang, F.; Zhang, L.; Jia, Y.; Chen, H. MicroRNA-103 regulates the progression in endometrial carcinoma through ZO-1. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2019**, *33*, 2058738419872621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Bao, W.; Zhang, Y.; Li, S.; Fan, Q.; Qiu, M.; Wang, Y.; Li, Y.; Ji, X.; Yang, Y.; Sang, Z.; et al. miR-107-5p promotes tumor proliferation and invasion by targeting estrogen receptor- α in endometrial carcinoma. *Oncol. Rep.* **2019**, *41*, 1575–1585. [[CrossRef](#)]
69. Yue, Z.; Shen, J.J.; Huang, Q.T.; Qin, Y.F.; Li, X.N.; Liu, G.B. [MiR-135b promotes proliferation of endometrial carcinoma cells by targeting FOXO1]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2016**, *36*, 675–680.
70. Chang, L.; Yuan, Z.; Shi, H.; Bian, Y.; Guo, R. miR-145 targets the. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 2305–2317.
71. Li, B.L.; Lu, W.; Qu, J.J.; Ye, L.; Du, G.Q.; Wan, X.P. Loss of exosomal miR-148b from cancer-associated fibroblasts promotes endometrial cancer cell invasion and cancer metastasis. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 2943–2953. [[CrossRef](#)]
72. Qu, J.; Zhang, L.; Li, L.; Su, Y. miR-148b Functions as a Tumor Suppressor by Targeting Endoplasmic Reticulum Metallo Protease 1 in Human Endometrial Cancer Cells. *Oncol. Res.* **2018**, *27*, 81–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Jia, J.; Li, X.; Guo, S.; Xie, X. MicroRNA-155 Suppresses the Translation of p38 and Impairs the Functioning of Dendritic Cells in Endometrial Cancer Mice. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 2993–3002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Fang, Y.Y.; Tan, M.R.; Zhou, J.; Liang, L.; Liu, X.Y.; Zhao, K.; Bao, E.C. miR-214-3p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of endometrial cancer cells by targeting TWIST1. *Oncotargets Ther.* **2019**, *12*, 9449–9458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Wang, J.; Zhao, X.; Guo, Z.; Ma, X.; Song, Y.; Guo, Y. Regulation of NEAT1/miR-214-3p on the growth, migration and invasion of endometrial carcinoma cells. *Arch. Gynecol. Obs.* **2017**, *295*, 1469–1475. [[CrossRef](#)]
76. Jeffries, J.; Zhou, W.; Hsu, A.Y.; Deng, Q. miRNA-223 at the crossroads of inflammation and cancer. *Cancer Lett.* **2019**, *451*, 136–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Zhang, H.H.; Li, R.; Li, Y.J.; Yu, X.X.; Sun, Q.N.; Li, A.Y.; Kong, Y. eIF4E-related miR-320a and miR-340-5p inhibit endometrial carcinoma cell metastatic capability by preventing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncol. Rep.* **2020**, *43*, 447–460. [[CrossRef](#)]
78. Yang, C.H.; Pfeffer, S.R.; Sims, M.; Yue, J.; Wang, Y.; Linga, V.G.; Paulus, E.; Davidoff, A.M.; Pfeffer, L.M. The oncogenic microRNA-21 inhibits the tumor suppressive activity of FBXO11 to promote tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 6037–6046. [[CrossRef](#)]
79. Zhou, W.; Fong, M.Y.; Min, Y.; Somlo, G.; Liu, L.; Palomares, M.R.; Yu, Y.; Chow, A.; O'Connor, S.T.; Chin, A.R.; et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 501–515. [[CrossRef](#)]

80. Yu, J.; Fan, Q.; Li, L. The MCM3AP-AS1/miR-126/VEGF axis regulates cancer cell invasion and migration in endometrioid carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* **2021**, *19*, 213. [CrossRef]
81. Zheng, X.; Liu, M.; Song, Y.; Feng, C. Long Noncoding RNA-ATB Impairs the Function of Tumor Suppressor miR-126-Mediated Signals in Endometrial Cancer for Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2019**, *34*, 47–55. [CrossRef]
82. Wang, J.; Gong, X.; Yang, L.; Li, L.; Gao, X.; Ni, T.; Yang, X.; Fan, Q.; Sun, X.; Wang, Y. Loss of exosomal miR-26a-5p contributes to endometrial cancer lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Clin. Transl. Med.* **2022**, *12*, e846. [CrossRef]
83. Yang, L.J.; Gao, L.; Guo, Y.N.; Liang, Z.Q.; Li, D.M.; Tang, Y.L.; Liu, Y.H.; Gao, W.J.; Zeng, J.J.; Shi, L.; et al. Upregulation of microRNA miR-141-3p and its prospective targets in endometrial carcinoma: A comprehensive study. *Bioengineered* **2021**, *12*, 2941–2956. [CrossRef]
84. Huang, Y.; Du, K.L.; Guo, P.Y.; Zhao, R.M.; Wang, B.; Zhao, X.L.; Zhang, C.Q. IL-16 regulates macrophage polarization as a target gene of miR-145-3p. *Mol. Immunol.* **2019**, *107*, 1–9. [CrossRef]
85. Kane, N.M.; Howard, L.; Descamps, B.; Meloni, M.; McClure, J.; Lu, R.; McCahill, A.; Breen, C.; Mackenzie, R.M.; Delles, C.; et al. Role of microRNAs 99b, 181a, and 181b in the differentiation of human embryonic stem cells to vascular endothelial cells. *Stem Cells* **2012**, *30*, 643–654. [CrossRef]
86. Zhuang, Y.; Peng, H.; Mastej, V.; Chen, W. MicroRNA Regulation of Endothelial Junction Proteins and Clinical Consequence. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 5078627. [CrossRef] [PubMed]
87. Zhang, H.; Wang, X.; Chen, Z.; Wang, W. MicroRNA-424 suppresses estradiol-induced cell proliferation via targeting GPER in endometrial cancer cells. *Cell. Mol. Biol.* **2015**, *61*, 96–101. [PubMed]
88. Korać, P.; Antica, M.; Matulić, M. MiR-7 in Cancer Development. *Biomedicines* **2021**, *9*, 325. [CrossRef]
89. Mitamura, T.; Watari, H.; Wang, L.; Kanno, H.; Kitagawa, M.; Hassan, M.K.; Kimura, T.; Tanino, M.; Nishihara, H.; Tanaka, S.; et al. microRNA 31 functions as an endometrial cancer oncogene by suppressing Hippo tumor suppressor pathway. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 97. [CrossRef] [PubMed]
90. Augoff, K.; Das, M.; Bialkowska, K.; McCue, B.; Plow, E.F.; Sossey-Alaoui, K. miR-31 is a broad regulator of β 1-integrin expression and function in cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **2011**, *9*, 1500–1508. [CrossRef] [PubMed]
91. Valeri, N.; Gasparini, P.; Fabbri, M.; Braconi, C.; Veronese, A.; Lovat, F.; Adair, B.; Vannini, I.; Fanini, F.; Bottoni, A.; et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6982–6987. [CrossRef] [PubMed]
92. Lin, G.; Li, J.; Cai, J.; Zhang, H.; Xin, Q.; Wang, N.; Xie, W.; Zhang, Y.; Xu, N. RNA-binding Protein MBNL2 regulates Cancer Cell Metastasis through MiR-182-MBNL2-AKT Pathway. *J. Cancer* **2021**, *12*, 6715–6726. [CrossRef] [PubMed]
93. Penma, E.; Orso, F.; Taverna, D. miR-214 as a key hub that controls cancer networks: Small player, multiple functions. *J. Invest. Dermatol.* **2015**, *135*, 960–969. [CrossRef] [PubMed]
94. Peng, Y.; Huang, D.; Ma, K.; Deng, X.; Shao, Z. MiR-19a as a prognostic indicator for cancer patients: A meta-analysis. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20182370. [CrossRef] [PubMed]
95. Hong, L.; Lai, M.; Chen, M.; Xie, C.; Liao, R.; Kang, Y.J.; Xiao, C.; Hu, W.Y.; Han, J.; Sun, P. The miR-17-92 cluster of microRNAs confers tumorigenicity by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 8547–8557. [CrossRef] [PubMed]
96. Olive, V.; Bennett, M.J.; Walker, J.C.; Ma, C.; Jiang, I.; Cordon-Cardo, C.; Li, Q.J.; Lowe, S.W.; Hannon, G.J.; He, L. miR-19 is a key oncogenic component of miR-17-92. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 2839–2849. [CrossRef] [PubMed]
97. Yamamoto, N.; Nishikawa, R.; Chiyomaru, T.; Goto, Y.; Fukumoto, I.; Usui, H.; Mitsuhashi, A.; Enokida, H.; Nakagawa, M.; Shozu, M.; et al. The tumor-suppressive microRNA-1/133a cluster targets PDE7A and inhibits cancer cell migration and invasion in endometrial cancer. *Int. J. Oncol.* **2015**, *47*, 325–334. [CrossRef]
98. Xu, Y.Y.; Wu, H.J.; Ma, H.D.; Xu, L.P.; Huo, Y.; Yin, L.R. MicroRNA-503 suppresses proliferation and cell-cycle progression of endometrioid endometrial cancer by negatively regulating cyclin D1. *FEBS J.* **2013**, *280*, 3768–3779. [CrossRef]
99. Braun, M.M.; Overbeek-Wager, E.A.; Grumbo, R.J. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Am. Fam. Physician* **2016**, *93*, 468–474.
100. Lu, K.H.; Schorge, J.O.; Rodabaugh, K.J.; Daniels, M.S.; Sun, C.C.; Soliman, P.T.; White, K.G.; Luthra, R.; Gershenson, D.M.; Broaddus, R.R. Prospective determination of prevalence of lynch syndrome in young women with endometrial cancer. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 5158–5164. [CrossRef]
101. Lee, M.; Piao, J.; Jeon, M.J. Risk Factors Associated with Endometrial Pathology in Premenopausal Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen. *Yonsei Med. J.* **2020**, *61*, 317–322. [CrossRef]
102. Piergentili, R.; Zaami, S.; Cavaliere, A.F.; Signore, F.; Scambia, G.; Mattei, A.; Marinelli, E.; Gulia, C.; Perelli, F. Non-Coding RNAs as Prognostic Markers for Endometrial Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3151. [CrossRef] [PubMed]
103. Papaioannou, S.; Tzafettas, J. Anovulation with or without PCO, hyperandrogenaemia and hyperinsulinaemia as promoters of endometrial and breast cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obs. Gynaecol.* **2010**, *24*, 19–27. [CrossRef]
104. Chen, B.; Xu, P.; Wang, J.; Zhang, C. The role of MiRNA in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gene* **2019**, *706*, 91–96. [CrossRef] [PubMed]
105. Lizneva, D.; Suturina, L.; Walker, W.; Brakta, S.; Gavrilova-Jordan, L.; Azziz, R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2016**, *106*, 6–15. [CrossRef]
106. Petrie, J.R.; Guzik, T.J.; Touyz, R.M. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can. J. Cardiol.* **2018**, *34*, 575–584. [CrossRef]

107. Udesen, P.B.; Sørensen, A.E.; Svendsen, R.; Frisk, N.L.S.; Hess, A.L.; Aziz, M.; Wissing, M.L.M.; Englund, A.L.M.; Dalgaard, L.T. Circulating miRNAs in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Longitudinal Cohort Study. *Cells* **2023**, *12*, 983. [CrossRef]
108. Che, X.; Jian, F.; Chen, C.; Liu, C.; Liu, G.; Feng, W. PCOS serum-derived exosomal miR-27a-5p stimulates endometrial cancer cells migration and invasion. *J. Mol. Endocrinol.* **2020**, *64*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
109. Cirillo, F.; Catellani, C.; Sartori, C.; Lazzaroni, P.; Amarri, S.; Street, M.E. Obesity, Insulin Resistance, and Colorectal Cancer: Could miRNA Dysregulation Play A Role? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2922. [CrossRef]
110. Sanderson, P.A.; Critchley, H.O.; Williams, A.R.; Arends, M.J.; Saunders, P.T. New concepts for an old problem: The diagnosis of endometrial hyperplasia. *Hum. Reprod Update* **2017**, *23*, 232–254. [CrossRef]
111. Armstrong, A.J.; Hurd, W.W.; Elguero, S.; Barker, N.M.; Zanotti, K.M. Diagnosis and management of endometrial hyperplasia. *J. Minim. Invasive Gynecol.* **2012**, *19*, 562–571. [CrossRef] [PubMed]
112. Wu, L.; Dai, X.; Zhan, J.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Zeng, S.; Xi, W. Profiling peripheral microRNAs in obesity and type 2 diabetes mellitus. *APMIS* **2015**, *123*, 580–585. [CrossRef]
113. Ouni, M.; Gottmann, P.; Westholm, E.; Schwerbel, K.; Jähnert, M.; Stadion, M.; Rittig, K.; Vogel, H.; Schürmann, A. MiR-205 is up-regulated in islets of diabetes-susceptible mice and targets the diabetes gene Tcf7l2. *Acta Physiol.* **2021**, *232*, e13693. [CrossRef]
114. Pescador, N.; Pérez-Barba, M.; Ibarra, J.M.; Corbatón, A.; Martínez-Larrad, M.T.; Serrano-Rios, M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77251. [CrossRef]
115. Pang, H.; Wang, J.; Wei, Q.; Liu, J.; Chu, X.; Yuan, C.; Yang, B.; Li, M.; Ma, D.; Tang, Y.; et al. miR-548ag functions as an oncogene by suppressing MOB1B in the development of obesity-related endometrial cancer. *Cancer Sci.* **2023**, *114*, 1507–1518. [CrossRef] [PubMed]
116. Kim, N.H.; Ahn, J.; Choi, Y.M.; Son, H.J.; Choi, W.H.; Cho, H.J.; Yu, J.H.; Seo, J.A.; Jang, Y.J.; Jung, C.H.; et al. Differential circulating and visceral fat microRNA expression of non-obese and obese subjects. *Clin. Nutr.* **2020**, *39*, 910–916. [CrossRef]
117. Williams, A.; Dougal, D.M.; Jenkins, W.; Greene, N.; Williams-DeVane, C.; Kimbro, K.S. Serum miR-17 levels are downregulated in obese, African American women with elevated HbA1c. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2019**, *18*, 173–179. [CrossRef]
118. Yu, F.; Chapman, S.; Pham, D.L.; Ko, M.L.; Zhou, B.; Ko, G.Y. Decreased miR-150 in obesity-associated type 2 diabetic mice increases intraocular inflammation and exacerbates retinal dysfunction. *BMJ Open Diabetes Res. Care* **2020**, *8*, e001446. [CrossRef]
119. Kirkwood, T.B. Understanding the odd science of aging. *Cell* **2005**, *120*, 437–447. [CrossRef] [PubMed]
120. Wagner, K.H.; Cameron-Smith, D.; Wessner, B.; Franzke, B. Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients* **2016**, *8*, 338. [CrossRef]
121. Kumar, S.; Vijayan, M.; Bhatti, J.S.; Reddy, P.H. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2017**, *146*, 47–94. [CrossRef] [PubMed]
122. Gerasymchuk, M.; Cherkasova, V.; Kovalchuk, O.; Kovalchuk, I. The Role of microRNAs in Organismal and Skin Aging. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5281. [CrossRef] [PubMed]
123. Noren Hooten, N.; Fitzpatrick, M.; Wood, W.H.; De, S.; Ejiogu, N.; Zhang, Y.; Mattison, J.A.; Becker, K.G.; Zonderman, A.B.; Evans, M.K. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging* **2013**, *5*, 725–740. [CrossRef]
124. Wang, S.; Sun, Y.; Yao, L.; Xing, Y.; Yang, H.; Ma, Q. The Role of microRNA-23a-3p in the Progression of Human Aging Process by Targeting FOXO3a. *Mol. Biotechnol.* **2023**. [CrossRef] [PubMed]
125. Rossi, E.C.; Kowalski, L.D.; Scalici, J.; Cantrell, L.; Schuler, K.; Hanna, R.K.; Method, M.; Ade, M.; Ivanova, A.; Boggess, J.F. A comparison of sentinel lymph node biopsy to lymphadenectomy for endometrial cancer staging (FIRES trial): A multicentre, prospective, cohort study. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 384–392. [CrossRef]
126. Wu, C.; Zhou, X.; Li, J.; Xiao, R.; Xin, H.; Dai, L.; Zhu, Y.; Bao, W. Serum miRNA-204-5p as a potential non-invasive biomarker for the diagnosis of endometrial cancer with sentinel lymph node mapping. *Oncol. Lett.* **2022**, *24*, 248. [CrossRef]
127. Abu-Rustum, N.R.; Gomez, J.D.; Alektiar, K.M.; Soslow, R.A.; Hensley, M.L.; Leitao, M.M.; Gardner, G.J.; Sonoda, Y.; Chi, D.S.; Barakat, R.R. The incidence of isolated paraaortic nodal metastasis in surgically staged endometrial cancer patients with negative pelvic lymph nodes. *Gynecol. Oncol.* **2009**, *115*, 236–238. [CrossRef]
128. Sato, K.; Miyamoto, M.; Takano, M.; Tsuda, H. MicroRNA-21 expression in cancer cells is an independent biomarker of progression-free survival of endometrioid endometrial carcinoma. *Virchows Arch.* **2021**, *479*, 883–891. [CrossRef]
129. Yoneyama, K.; Ishibashi, O.; Kawase, R.; Kurose, K.; Takeshita, T. miR-200a, miR-200b and miR-429 are onco-miRs that target the PTEN gene in endometrioid endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 1401–1410.
130. Guo, C.M.; Liu, S.Q.; Sun, M.Z. miR-429 as biomarker for diagnosis, treatment and prognosis of cancers and its potential action mechanisms: A systematic literature review. *Neoplasma* **2020**, *67*, 215–228. [CrossRef]
131. Sun, X.; Hou, L.; Qiu, C.; Kong, B. MiR-501 promotes tumor proliferation and metastasis by targeting HOXD10 in endometrial cancer. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2021**, *26*, 20. [CrossRef] [PubMed]
132. Chen, C.; Zhang, Q.; Kong, B. miRNA-576-5p promotes endometrial cancer cell growth and metastasis by targeting ZBTB4. *Clin. Transl. Oncol.* **2023**, *25*, 706–720. [CrossRef] [PubMed]
133. Delangle, R.; De Foucher, T.; Larsen, A.K.; Sabbah, M.; Azais, H.; Bendifallah, S.; Darai, E.; Ballester, M.; Mehats, C.; Uzan, C.; et al. The Use of microRNAs in the Management of Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Cancers* **2019**, *11*, 832. [CrossRef]
134. Fu, K.; Li, Y.; Song, J.; Cai, W.; Wu, W.; Ye, X.; Xu, J. Identification of a MicroRNA Signature Associated With Lymph Node Metastasis in Endometrial Endometrioid Cancer. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 650102. [CrossRef]

135. Chen, S.; Sun, K.X.; Liu, B.L.; Zong, Z.H.; Zhao, Y. MicroRNA-505 functions as a tumor suppressor in endometrial cancer by targeting TGF- α . *Mol. Cancer* **2016**, *15*, 11. [CrossRef]
136. Constantine, G.D.; Kessler, G.; Graham, S.; Goldstein, S.R. Increased Incidence of Endometrial Cancer Following the Women's Health Initiative: An Assessment of Risk Factors. *J. Women's Health* **2019**, *28*, 237–243. [CrossRef] [PubMed]
137. Miller, D.S.; Filiaci, V.L.; Mannel, R.S.; Cohn, D.E.; Matsumoto, T.; Tewari, K.S.; DiSilvestro, P.; Pearl, M.L.; Argenta, P.A.; Powell, M.A.; et al. Carboplatin and Paclitaxel for Advanced Endometrial Cancer: Final Overall Survival and Adverse Event Analysis of a Phase III Trial (NRG Oncology/GOG0209). *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 3841–3850. [CrossRef]
138. Makker, V.; Taylor, M.H.; Aghajanian, C.; Oaknin, A.; Mier, J.; Cohn, A.L.; Romeo, M.; Bratos, R.; Brose, M.S.; DiSimone, C.; et al. Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced Endometrial Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 2981–2992. [CrossRef]
139. Kong, J.; He, X.; Wang, Y.; Li, J. Effect of microRNA-29b on proliferation, migration, and invasion of endometrial cancer cells. *J. Int. Med. Res.* **2019**, *47*, 3803–3817. [CrossRef]
140. Tsuruta, T.; Kozaki, K.; Uesugi, A.; Furuta, M.; Hirasawa, A.; Imoto, I.; Susumu, N.; Aoki, D.; Inazawa, J. miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 6450–6462. [CrossRef]
141. Xie, D.; Liang, Y.; Su, Y.; An, Y.; Qu, P. miR-152 inhibits proliferation of human endometrial cancer cells via inducing G2/M phase arrest by suppressing CDC25B expression. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *99*, 299–305. [CrossRef]
142. Karaayvaz, M.; Zhang, C.; Liang, S.; Shroyer, K.R.; Ju, J. Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35158. [CrossRef] [PubMed]
143. Zhou, L.; Wang, W.; Wang, F.; Yang, S.; Hu, J.; Lu, B.; Pan, Z.; Ma, Y.; Zheng, M.; Lei, S.; et al. Plasma-derived exosomal miR-15a-5p as a promising diagnostic biomarker for early detection of endometrial carcinoma. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 57. [CrossRef]
144. Fan, X.; Zou, X.; Liu, C.; Cheng, W.; Zhang, S.; Geng, X.; Zhu, W. MicroRNA expression profile in serum reveals novel diagnostic biomarkers for endometrial cancer. *Biosci. Rep.* **2021**, *41*, BSR20210111. [CrossRef]
145. Ghazala, R.A.; El-Attar, E.A.; Abouzeid, Z.S. Circulating miRNA 27a and miRNA150-5p; a noninvasive approach to endometrial carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 4351–4360. [CrossRef] [PubMed]
146. Rüzner, T.L. Discovery of biomarkers for endometrial cancer: Current status and prospects. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2016**, *16*, 1315–1336. [CrossRef] [PubMed]
147. Montagnana, M.; Benati, M.; Danese, E.; Giudici, S.; Perfranceschi, M.; Ruzzenente, O.; Salvagno, G.L.; Bassi, A.; Gelati, M.; Paviati, E.; et al. Aberrant MicroRNA Expression in Patients With Endometrial Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2017**, *27*, 459–466. [CrossRef]
148. Jiang, Y.; Wang, N.; Yin, D.; Li, Y.K.; Guo, L.; Shi, L.P.; Huang, X. Changes in the Expression of Serum MiR-887-5p in Patients With Endometrial Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2016**, *26*, 1143–1147. [CrossRef]
149. Torres, A.; Torres, K.; Pesci, A.; Ceccaroni, M.; Paszkowski, T.; Cassandrini, P.; Zamboni, G.; Maciejewski, R. Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 1633–1645. [CrossRef]
150. Chen, C.Y.; Chen, J.; He, L.; Stiles, B.L. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 338. [CrossRef]
151. Mutter, G.L.; Lin, M.C.; Fitzgerald, J.T.; Kum, J.B.; Baak, J.P.; Lees, J.A.; Weng, L.P.; Eng, C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 924–930. [CrossRef]
152. Mutter, G.L. Pten, a protean tumor suppressor. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158*, 1895–1898. [CrossRef] [PubMed]
153. Zhang, G.; Hou, X.; Li, Y.; Zhao, M. MiR-205 inhibits cell apoptosis by targeting phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten in endometrial cancer Ishikawa cells. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 440. [CrossRef] [PubMed]
154. Jin, C.; Liang, R. miR-205 promotes epithelial-mesenchymal transition by targeting AKT signaling in endometrial cancer cells. *J. Obs. Gynaecol. Res.* **2015**, *41*, 1653–1660. [CrossRef] [PubMed]
155. Hermeking, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 193–199. [CrossRef]
156. Li, F.; Chen, H.; Huang, Y.; Zhang, Q.; Xue, J.; Liu, Z.; Zheng, F. miR-34c plays a role of tumor suppressor in HEC-1-B cells by targeting E2F3 protein. *Oncol. Rep.* **2015**, *33*, 3069–3074. [CrossRef] [PubMed]
157. Hiroki, E.; Akahira, J.; Suzuki, F.; Nagase, S.; Ito, K.; Suzuki, T.; Sasano, H.; Yaegashi, N. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 241–249. [CrossRef]
158. Maroof, H.; Salajegheh, A.; Smith, R.A.; Lam, A.K. Role of microRNA-34 family in cancer with particular reference to cancer angiogenesis. *Exp. Mol. Pathol.* **2014**, *97*, 298–304. [CrossRef]
159. Tu, J.; Tan, X.; Chen, Y.; Li, Z.; Zhang, Y.; Chen, X.; Yang, H.; Chen, H.; Yu, Z. Growth arrest-specific transcript 5 represses endometrial cancer development by promoting antitumor function of tumor-associated macrophages. *Cancer Sci.* **2022**, *113*, 2496–2512. [CrossRef]
160. Wang, J.; Zhao, Y.; Tang, Y.; Li, F.; Chen, X. The role of lncRNA-MEG/miR-21-5p/PDCD4 axis in spinal cord injury. *Am. J. Transl. Res.* **2021**, *13*, 646–658.
161. Liu, C.; Zhang, Y.H.; Deng, Q.; Li, Y.; Huang, T.; Zhou, S.; Cai, Y.D. Cancer-Related Triplets of mRNA-lncRNA-miRNA Revealed by Integrative Network in Uterine Corpus Endometrial Carcinoma. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 3859582. [CrossRef] [PubMed]

162. Xiao, L.; He, Y.; Peng, F.; Yang, J.; Yuan, C. Endometrial Cancer Cells Promote M2-Like Macrophage Polarization by Delivering Exosomal miRNA-21 under Hypoxia Condition. *J. Immunol. Res.* **2020**, *2020*, 9731049. [CrossRef] [PubMed]
163. Wu, W.; Zhou, J.; Wu, Y.; Tang, X.; Zhu, W. Overexpression of circRNA circFAT1 in Endometrial Cancer Cells Increases Their Stemness by Upregulating miR-21 Through Methylation. *Cancer. Biother. Radiopharm.* **2022**, *37*, 843–849. [CrossRef] [PubMed]
164. Guo, Y.; Liao, Y.; Jia, C.; Ren, J.; Wang, J.; Li, T. MicroRNA-182 promotes tumor cell growth by targeting transcription elongation factor A-like 7 in endometrial carcinoma. *Cell. Physiol. Biochem.* **2013**, *32*, 581–590. [CrossRef] [PubMed]
165. Devor, E.J.; Schickling, B.M.; Reyes, H.D.; Warriar, A.; Lindsay, B.; Goodheart, M.J.; Santillan, D.A.; Leslie, K.K. Cullin-5, a ubiquitin ligase scaffold protein, is significantly underexpressed in endometrial adenocarcinomas and is a target of miR-182. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 2461–2465. [CrossRef] [PubMed]
166. Myatt, S.S.; Wang, J.; Monteiro, L.J.; Christian, M.; Ho, K.K.; Fusi, L.; Dina, R.E.; Brosens, J.J.; Ghaem-Maghami, S.; Lam, E.W. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 367–377. [CrossRef]
167. Hurteau, G.J.; Carlson, J.A.; Roos, E.; Brock, G.J. Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2064–2069. [CrossRef]
168. Dai, Y.; Xia, W.; Song, T.; Su, X.; Li, J.; Li, S.; Chen, Y.; Wang, W.; Ding, H.; Liu, X.; et al. MicroRNA-200b is overexpressed in endometrial adenocarcinomas and enhances MMP2 activity by downregulating TIMP2 in human endometrial cancer cell line HEC-1A cells. *Nucleic Acid. Ther.* **2013**, *23*, 29–34. [CrossRef]
169. Yu, D.; Zhou, H.; Xun, Q.; Xu, X.; Ling, J.; Hu, Y. microRNA-103 regulates the growth and invasion of endometrial cancer cells through the downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Oncol. Lett.* **2012**, *3*, 1221–1226. [CrossRef]
170. Guo, C.; Song, W.Q.; Sun, P.; Jin, L.; Dai, H.Y. LncRNA-GA55 induces PTEN expression through inhibiting miR-103 in endometrial cancer cells. *J. Biomed. Sci.* **2015**, *22*, 100. [CrossRef]
171. Li, J.; Zhang, Z.; Chen, F.; Hu, T.; Peng, W.; Gu, Q.; Sun, Y. The Diverse Oncogenic and Tumor Suppressor Roles of microRNA-105 in Cancer. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 518. [CrossRef]
172. Li, Y.; Liu, J.; Piao, J.; Ou, J.; Zhu, X. Circ_0109046 promotes the malignancy of endometrial carcinoma cells through the microRNA-105/SOX9/Wnt/ β -catenin axis. *IJBBM Life* **2021**, *73*, 159–176. [CrossRef] [PubMed]
173. Yan, M.; Li, X.; Tong, D.; Han, C.; Zhao, R.; He, Y.; Jin, X. miR-136 suppresses tumor invasion and metastasis by targeting RASAL2 in triple-negative breast cancer. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 65–71. [CrossRef] [PubMed]
174. Ren, H.; Qi, Y.; Yin, X.; Gao, J. miR-136 targets MIEN1 and involves the metastasis of colon cancer by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotargets Ther.* **2018**, *11*, 67–74. [CrossRef]
175. Shen, S.; Yue, H.; Li, Y.; Qin, J.; Li, K.; Liu, Y.; Wang, J. Upregulation of miR-136 in human non-small cell lung cancer cells promotes Erk1/2 activation by targeting PPP2R2A. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 631–640. [CrossRef] [PubMed]
176. Zong, Z.H.; Liu, Y.; Chen, S.; Zhao, Y. Circ_PUM1 promotes the development of endometrial cancer by targeting the miR-136/NOTCH3 pathway. *J. Cell Mol. Med.* **2020**, *24*, 4127–4135. [CrossRef]
177. Shi, Y.; Jia, L.; Wen, H. Circ_0109046 Promotes the Progression of Endometrial Cancer via Regulating miR-136/HMGA2 Axis. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 10993–11003. [CrossRef]
178. Ma, J.; Li, D.; Kong, F.F.; Yang, D.; Yang, H.; Ma, X.X. miR-302a-5p/367-3p-HMGA2 axis regulates malignant processes during endometrial cancer development. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 19. [CrossRef]
179. Li, Q.; Kong, F.; Cong, R.; Ma, J.; Wang, C.; Ma, X. PVT1/miR-136/Sox2/UPP1 axis regulates the malignant phenotypes of endometrial cancer stem cells. *Cell Death Dis.* **2023**, *14*, 177. [CrossRef]
180. Yamamoto, H.; Imai, K. Microsatellite instability: An update. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 899–921. [CrossRef]
181. Tafe, L.J.; Riggs, E.R.; Tsongalis, G.J. Lynch syndrome presenting as endometrial cancer. *Clin. Chem.* **2014**, *60*, 111–121. [CrossRef] [PubMed]
182. Hermyt, E.; Zmarzły, N.; Grabarek, B.; Kruszewska-Rajs, C.; Gola, J.; Jęda-Golonka, A.; Szczepanek, K.; Mazurek, U.; Witek, A. Interplay between miRNAs and Genes Associated with Cell Proliferation in Endometrial Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6011. [CrossRef]
183. Choi, C.H.; Park, Y.A.; Choi, J.J.; Song, T.; Song, S.Y.; Lee, Y.Y.; Lee, J.W.; Kim, T.J.; Kim, B.G.; Bae, D.S. Angiotensin II type I receptor and miR-155 in endometrial cancers: Synergistic antiproliferative effects of anti-miR-155 and losartan on endometrial cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **2012**, *126*, 124–131. [CrossRef] [PubMed]
184. Liu, B.L.; Sun, K.X.; Zong, Z.H.; Chen, S.; Zhao, Y. MicroRNA-372 inhibits endometrial carcinoma development by targeting the expression of the Ras homolog gene family member C (RhoC). *Oncotarget* **2016**, *7*, 6649–6664. [CrossRef] [PubMed]
185. Jiang, N.; Li, Q.L.; Pan, W.; Li, J.; Zhang, M.F.; Cao, T.; Su, S.G.; Shen, H. PRMT6 promotes endometrial cancer via AKT/mTOR signaling and indicates poor prognosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2020**, *120*, 105681. [CrossRef]
186. Chen, S.; Chen, X.; Sun, K.X.; Xiu, Y.L.; Liu, B.L.; Feng, M.X.; Sang, X.B.; Zhao, Y. MicroRNA-93 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition of Endometrial Carcinoma Cells. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165776. [CrossRef]
187. Xu, J.B. MicroRNA-93-5p/IFNAR1 axis accelerates metastasis of endometrial carcinoma by activating the STAT3 pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 5657–5666. [CrossRef]
188. Banzhaf-Strathmann, J.; Edbauer, D. Good guy or bad guy: The opposing roles of microRNA 125b in cancer. *Cell Commun. Signal* **2014**, *12*, 30. [CrossRef]

189. Shang, C.; Lu, Y.M.; Meng, L.R. Erratum: MicroRNA-125b Down-Regulation Mediates Endometrial Cancer Invasion by Targeting ERBB2. *Med. Sci. Monit.* **2020**, *26*, e929638. [[CrossRef](#)]
190. Cheung, A.; Shah, S.; Parker, J.; Soor, P.; Limbu, A.; Sheriff, M.; Boussios, S. Non-Epithelial Ovarian Cancers: How Much Do We Really Know? *Int. J. Env. Res. Public Health* **2022**, *19*, 1106. [[CrossRef](#)]
191. LaMoia, T.E.; Shulman, G.I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocr. Rev.* **2021**, *42*, 77–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Liu, J.; Zhao, Y.; Chen, L.; Li, R.; Ning, Y.; Zhu, X. Role of metformin in functional endometrial hyperplasia and polycystic ovary syndrome involves the regulation of MEG3/miR-223/GLUT4 and SNHG20/miR-4486/GLUT4 signaling. *Mol. Med. Rep.* **2022**, *26*, 218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Noren Hooten, N.; Martin-Montalvo, A.; Dluzen, D.F.; Zhang, Y.; Bernier, M.; Zonderman, A.B.; Becker, K.G.; Gorospe, M.; de Cabo, R.; Evans, M.K. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence. *Aging Cell* **2016**, *15*, 572–581. [[CrossRef](#)]
194. Udesen, P.B.; Glinborg, D.; Sorensen, A.E.; Svendsen, R.; Nielsen, N.L.S.; Wissing, M.L.M.; Andersen, M.S.; Englund, A.L.M.; Dalgaard, L.T. Metformin decreases miR-122, miR-223 and miR-29a in women with polycystic ovary syndrome. *Endocr. Connect.* **2020**, *9*, 1075–1084. [[CrossRef](#)]
195. Zhang, Y.; Wan, J.; Liu, S.; Hua, T.; Sun, Q. Corrigendum to “Exercise induced improvements in insulin sensitivity are concurrent with reduced NFE2/miR-432-5p and increased FAM3A” [*Life Sci.* 207 (2018) 23–29]. *Life Sci.* **2020**, *260*, 118515. [[CrossRef](#)]
196. Dos Santos, J.A.C.; Veras, A.S.C.; Batista, V.R.G.; Tavares, M.E.A.; Correia, R.R.; Suggett, C.B.; Teixeira, G.R. Physical exercise and the functions of microRNAs. *Life Sci.* **2022**, *304*, 120723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Chen, Z.; Huang, X.; Lv, Y.; Fang, Y.; Pan, L.; Gan, Z.; Huang, Z.; Wei, W. A Five-microRNA Signature as Risk Stratification System in Uterine Corpus Endometrial Carcinoma. *Comb. Chem. High Throughput. Screen* **2021**, *24*, 187–194. [[CrossRef](#)]
198. Lan, H.; Lu, H.; Wang, X.; Jin, H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: Opportunities and challenges. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 125094. [[CrossRef](#)]
199. Mall, C.; Rocke, D.M.; Durbin-Johnson, B.; Weiss, R.H. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomark. Med.* **2013**, *7*, 623–631. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Wzrastająca liczba nowych zachorowań na EC i wzrost liczby zgonów z powodu tego nowotworu zmusza do poszukiwania przyczyn tego zjawiska i nowych markerów zaawansowania nowotworu lub skłonności do przerzutów. MikroRNA mogą działać jako czynniki prognostyczne. Celem artykułu było przeprowadzenie szczegółowej analizy roli mikroRNA w kancerogenezie raka endometrium. Artykuł obejmuje szeroki zakres zagadnień, począwszy od roli mikroRNA w różnych etapach procesu nowotworzenia, poprzez zmiany ekspresji mikroRNA w zależności od różnych czynników ryzyka, kończąc na szczegółowym omówieniu wybranych mikroRNA. Pierwsza część artykułu opisuje mechanizm powstawania mikroRNA oraz jego rolę w nowotworach u człowieka. W następnym rozdziale zawarty jest szczegółowy opis kolejnych stadiów progresji raka, tj.: wzrost guza pierwotnego, migracja i miejscowa inwazja, transendotelialna migracja komórek nowotworowych do naczyń, przeżycie w układzie krążenia, wynacznienie, tworzenie niszy przedprzerzutowej. Na każdym z tych etapów zwraca uwagę rola różnych mikroRNA. W kolejnym rozdziale opisane są zmiany miRNA w zależności od występowania różnych czynników ryzyka, jak i czynników prognostycznych EC. MikroRNA badano u pacjentek z zespołem PCOS [110]. W tej grupie kobiet stwierdzono wiele nieprawidłowości i nadmierną ekspresję licznych mikroRNA. Odkryto, że zmiany ekspresji mikroRNA występujące w PCOS są często związane również z zespołem metabolicznym, który obejmuje nadciśnienie, dyslipidemię, otyłość centralną i upośledzoną tolerancję glukozy, czyli innymi czynnikami EC [111]. PCOS zwiększa ryzyko zachorowania na raka endometrium 2,7 razy. Wykazano, że u kobiet z PCOS zmienia się również poziom ekspresji miRNA, np. miR-27a-5p, który ulega nadekspresji, badanie przeprowadzono na egzosomach pochodzących z surowicy. MiR-27a-5p odgrywa znaczącą rolę w migracji i inwazji komórek EC poprzez regulację SMAD4 [112].

Na zmiany ekspresji mikroRNA ma również wpływ starzenie się organizmu [113]. U osób długożyjących obserwuje się obniżony poziom niektórych mikroRNA, takich jak let-7, miR-17 czy miR-34, określanych jako „miRNA długowieczności”. Czynniki te są uważane za ochronne i mogą przyczyniać się do wydłużenia życia. Z drugiej strony zmiany ekspresji mikroRNA są również związane z chorobami wieku podeszłego, w tym z chorobami nowotworowymi [114]. Przykładowo, ekspresja miR-151a-3p, miR-181a-5p i miR-1248 ulega obniżeniu wraz z wiekiem [115, 116]. Z kolei ekspresja miR-21 i miR-23a wzrasta u ludzi w średnim wieku, a obniża się w wieku podeszłym

[117]. Dalsza część artykułu koncentruje się na mikroRNA, których ekspresja ma udowodniony wpływ na wystąpienie przerzutów w węzłach chłonnych, przeżycie i nawrót choroby u pacjentek z EC.

5.2. Publikacja oryginalna: „Absolute Quantification of Selected microRNAs Expression in Endometrial Cancer by Digital PCR”



Article

Absolute Quantification of Selected microRNAs Expression in Endometrial Cancer by Digital PCR

Anna Bogaczyk ¹, Natalia Potocka ², Sylwia Paszek ^{2,3}, Marzena Skrzypa ², Alina Zuchowska ³, Michał Kośny ⁴, Marta Kluz ⁵, Izabela Zawlik ^{2,3,*} and Tomasz Kluz ^{1,3,†}

¹ Department of Gynecology, Gynecology Oncology and Obstetrics, Fryderyk Chopin University Hospital, 35-055 Rzeszów, Poland; annabogaczyk@interia.pl (A.B.); jtkluz@interia.pl (T.K.)

² Laboratory of Molecular Biology, Centre for Innovative Research in Medical and Natural Sciences, Medical College of Rzeszów University, 35-959 Rzeszów, Poland; npotocka@ur.edu.pl (N.P.); spaszek@ur.edu.pl (S.P.); mskrzypa@ur.edu.pl (M.S.)

³ Institute of Medical Sciences, Medical College of Rzeszów University, 35-959 Rzeszów, Poland; aowskiak@ur.edu.pl

⁴ Department of Hematology, Medical University of Łódź, 90-419 Łódź, Poland; mkosny1@gmail.com

⁵ Department of Pathology, Fryderyk Chopin University Hospital, 35-055 Rzeszów, Poland; marta.kluz@interia.pl

* Correspondence: izawlik@ur.edu.pl

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: MicroRNAs (miRNA) are involved in the process of carcinogenesis, including the development of endometrial cancer (EC). This study aimed to investigate the association between the expression of three miRNAs (miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p) in endometrial cancer tissues. In addition, the stability of expression of SNORD48 and U6, which were initially planned to be used as reference miRNAs for normalization, was investigated. Endometrial tissue was obtained from 111 patients with EC during hysterectomy and from 19 patients undergoing surgery for uterine fibroids or pelvic organ prolapse as a control group without neoplastic changes. Our study was based on calculations made with a digital PCR method (Qiagen, Hilden, Germany) to measure the absolute expression. In the endometrial cancer tissue, miR-205-5p was upregulated, while miR-222-3p and SNORD48 were downregulated compared to the control group. We detected statistically significant correlation of miR-205-5p, U6, and SNORD48 expression with different histological grades; the expression of miR-205-5p increases with the histopathological grade advancement (intraepithelial neoplasia-EIN = 1590, G1 = 3367.2, G2 = 8067 and G3 = 20,360), while U6 and SNORD48 expression decreases from EIN to G2 and increases again in the G3 grade (U6: EIN = 19,032, G1 = 16,482.4, G2 = 13,642.4, G3 = 133,008; SNORD48: EIN = 97,088, G1 = 59,520, G2 = 43,544, G3 = 227,200). Our study suggests that upregulation of miR-205-5p and downregulation of miR-222-3p and SNORD48 may influence development of endometrial cancer. Moreover, miR-205-5p, U6, and SNORD48 expression changes may be associated with progression of endometrial cancer. The results also indicate that SNORD48 and U6, commonly used as internal references, may influence endometrial cancer development and progression; therefore, they should not be used as references. However, it is important to note that further research is required to understand their role in endometrial cancer.

Keywords: miRNA; endometrial cancer; miR-21-5p; miR-205-5p; miR-222-3p; reference gene; SNORD48; U6



Citation: Bogaczyk, A.; Potocka, N.; Paszek, S.; Skrzypa, M.; Zuchowska, A.; Kośny, M.; Kluz, M.; Zawlik, I.; Kluz, T. Absolute Quantification of Selected microRNAs Expression in Endometrial Cancer by Digital PCR. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 3286. <https://doi.org/10.3390/ijms25063286>

Academic Editor: Elena Levantini

Received: 29 January 2024

Revised: 3 March 2024

Accepted: 12 March 2024

Published: 14 March 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

1.1. Endometrial Cancer

Endometrial cancer is one of the most common malignant tumors in women in developed countries and ranks fifth in morbidity after breast cancer, colorectal cancer, lung cancer, and thyroid cancer [1]. The cancer occurred in 319,600 cases of global incidence

in 2012 and is on the rise [2]. In 2018, there were 382,069 new cases of endometrial cancer and 89,929 deaths [3]. In 2020, there were 417,367 new cases and 97,370 deaths due to endometrial cancer worldwide [1]. The presented figures show a clear upward trend in both morbidity and mortality due to endometrial cancer.

From the clinicopathological point of view, the endometrial cancer is divided into two types: type I and type II (according to Bokhman's dualistic theory).

Type I is the endometrioid type (EEC) characterized by a state of hyperestrogenism and occurs mainly in obese women with polycystic ovary syndrome (PCOS), and anovulatory cycles. It can also occur in women with a genetic predisposition (e.g., Lynch syndrome). Type I EC has a favorable prognosis and accounts for 80–90% of endometrial cancers. Type II ECs include serous, clear cell, and undifferentiated carcinomas, and are associated with higher patient age, and high stage and grade, and have a poor prognosis [4].

In 2013, a new molecular classification of endometrial cancer was introduced by The Cancer Genome Atlas (TCGA), which indicates a paradigm shift from morphological to molecular classification. The TCGA identified four molecular subgroups characterized by:

- *POLE* mutation (POLEmut group) (Polymerase Epsilon) (7%);
- Microsatellite instability (MSI group) which results from mismatch repair deficiency (MMRd) (28%);
- High somatic copy number changes (driven by the *TP53* mutation, also called the p53abn group) (26%);
- Low copy number without defined molecular profile, no specific molecular profile (NSMP group) (39%) [5].

Each of these groups has a different prognosis. Tumors with the *POLE* mutation have an extremely favorable prognosis, while the group with a high copy number due to the *TP53* mutation has a poor prognosis. The prognosis for tumors with mismatch repair deficiency (MMRd) and no specific molecular profile (NSMP) is relatively favorable. Common mutations in the MSI group include *ARID5B*, *PTEN*, and mutations of the phosphatidylinositol-3 kinase family genes, including *PIK3CA* and *PIK3RI* [6].

The most common genetic mutation in endometrial cancer is the mutation of the *PTEN* suppressor gene (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome-10). Functional inactivation of *PTEN* is associated with the initiation and progression of endometrial cancer. Studies have shown a 34–55% frequency of somatic mutations of the *PTEN* gene with a 50–83% frequency of loss or a decline of the *PTEN* protein [7–9]. Khatami et al. showed that the reduction in *PTEN* gene expression in endometrial cancer tissues is caused by hypermethylation of its promoter. *PTEN* promoter methylation was observed by researchers in 52.0% of cancer tissues [10]. Another important gene in EC carcinogenesis is *SOX17*, which acts as a tumor suppressor gene, and its inactivation is important in endometrial cancer progression through EMT (epithelial–mesenchymal transition) regulation [11]. According to the recommendations of the Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO), endometrial cancer can also be divided into three grades depending on the degree of histological differentiation [G1–G3]. G1 is characterized by having $\leq 5\%$ solid growth pattern, G2 has from 6 to 50% solid growth pattern, while G3 has $>50\%$ solid growth pattern.

As we wrote at the beginning of the introduction, the increasing number of new cases of EC and the increase in the number of deaths due to this cancer forces us to look for the causes of this phenomenon and new markers for the advancement of the cancer or the tendency to metastasize. MicroRNAs may act as prognostic factors. Therefore, in our study we focus on changes in the expression of three microRNAs (miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p) in endometrial cells in patients with various degrees of histopathological differentiation. We hope that determining changes in the expression of our microRNAs will be the basis for improving the prognosis of patients with EC and extending the life of patients.

1.2. MicroRNA in Control of Gene Expression

According to the NIH Roadmap Epigenomics Project, the term epigenetics refers to both inherited changes in gene activity and expression (in the progeny of cells or individuals) and stable, long-term changes in the transcriptional potential of the cell. Epigenetic modifications are defined as arbitrary modifications in genomic DNA that result in transcriptional silencing and can be both beneficial and disadvantageous. For instance, in cancer, epigenetic modifications can cause high levels of activation of genes, so-called oncogenes, but can also have adverse effects by silencing tumor suppressor genes. Three different types of mechanisms are known to cause gene silencing: DNA methylation, histone modifications, and RNA-related silencing [12].

MiRNAs are particularly interesting molecules that contribute to the regulation of epigenetic gene expression. They were discovered in 1993 and are non-coding, single-stranded, small RNA molecules about 21–25 nucleotides long [13]. MiRNAs are important post-transcriptional regulators, and may act as oncogenes or tumor suppressors in the development of endometrial cancer [14,15]. In this study, we used digital PCR to analyze absolute expression of the following microRNAs: miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p. Initially, SNORD48 and U6 were used as references for normalization. However, our results showed that they were unstable in endometrial cancer tissue. The miRNAs that were analyzed in the study are described below.

MiR-21 acts by directly targeting the 3'-UTR of *PTEN* (the phosphatase and tensin homolog) mRNA, which is a tumor suppressor gene. Functional inactivation of *PTEN* is associated with the initiation and progression of endometrial cancer [16].

Qin et al. found that miR-21 expression could be correlated with advanced clinical stages, deep myometrial invasion, and high histological grade [16].

Wang et al. showed that miR-21-5p promoted EMT (epithelial to mesenchymal transition), while miR-21-5p silencing had the opposite effect in endometrial cancer cells. EMT promotion by miR-21-5p may be mediated by targeting *SOX17* (SRY-box 17), and is correlated with poor survival in endometrial cancer patients. *SOX17* encodes a 414 amino acid protein member of the HMG-box (SOX) superfamily of transcription factors related to SRY. It should be mentioned that the epithelial to mesenchymal transition is an important process by which epithelial cells lose their character, e.g., they lose epithelial markers such as E-cadherin, and acquire mesenchymal characteristics, e.g., by an increase in mesenchymal markers such as fibronectin, which leads to tumor metastasis [11].

Tian et al. also studied miR-21-5p, and also confirmed its inhibitory effect on *PTEN*. In addition, researchers showed that miR-21-5p was a potential target of NBTA1 (Long noncoding RNA neuroblastoma-associated transcript 1), and was confirmed by a reporter assay of luciferase activity. The study confirmed through cellular experiments that NBTA1 was targeted to bind to miR-21-5p, and overexpression of miR-21-5p not only promoted EC proliferation and invasion but also inhibited apoptosis. It also had the effect of blocking NBTA1 on EC cells [17]. MiR-21-5p has also been studied in other tumors, e.g., peritoneal cancer [18], lung cancer [19], colorectal cancer [20], breast cancer [21], and ovarian cancer [22].

Studying the role and mechanisms of miR-21-5p in EC is important from both a scientific and medical point of view. Stopping cancer metastasis plays an important role in treating patients and extending their lives. It seems that miR-21-5p gives us such possibilities.

The mechanism of action of miR-205-5p regulates EMT by silencing *ZEB2* and *ZEB1* (homeobox 1, 2 binding the E-box to the zinc finger) [23]. MiR-205-5p has been shown to be overexpressed in head and neck cancer cell lines [24], cervical cancer [25], kidney and bladder cancer [26], non-small cell carcinoma lung cancer [27], and breast cancer [23], compared to normal tissues. Karaayvaz et al. indicated that miR-205-5p expression levels were significantly associated with endometrial cancer patient survival. Patients with low miR-205-5p expression tended to have better survival than patients with high miR-205-5p levels. This supported the observations that elevated levels of miR-205-5p in tumor tissues could lead to poorer survival rates in endometrial cancer patients [28].

Zhuo and Yu observed that miR-205-5p is more highly expressed in Ishikawa-PR cells compared to Ishikawa cells. In addition, the researchers observed that miR-205-5p inhibitor treatment significantly inhibited the growth of Ishikawa cells and PR tumor cells. These observations show that miR-205-5p may be involved in progesterone resistance in the EC, although the mechanism of progesterone resistance in the EC remains unclear. Researchers also showed a new perspective on the regulatory mechanism of miR-205-5p on the *PTEN* gene in PR-ECs, where *PTEN* levels were significantly reduced in Ishikawa's PR cells, and the miR-205-5p inhibitor increased *PTEN* expression in these cells. These findings show us that miR-205-5p plays an important role in the loss of *PTEN* expression and PR development in EC cells [29]. It should be mentioned that *PTEN* is the most frequently modified gene in the EC, and is located on human chromosome 10 and encodes a tyrosine kinase. It is estimated that 34–83% of ECs and precancerous lesions show reduced expression of *PTEN* [30]. *PTEN* is a tumor suppressor, promotes apoptosis, and its deletion or mutation results in tumor development [29].

The expression of miR-205-5p was studied in gastric cancer and found to be decreased [31].

Lu et al. studied the effect of miR-205-5p on Paclitaxel resistance; they found that miR-205-5p was upregulated in EC tissues and targeted *FOXO1* (*FOXO1* is a transcription factor widely distributed in the heart, brain, lung, and other tissues and organs). MiR-205-5p induced an increase in Paclitaxel resistance, and contributed to EC cell neoplasia by affecting *FOXO1*. Knocking down miR-205-5p increased the sensitivity of EC cells to Paclitaxel, resulting in reduced cell proliferation and increased apoptosis. Researchers have shown a new possible direction for treating EC patients by regulating miR-205-5p [32].

It should also be mentioned that lncRNAs also have an effect on endometrial cancer by modulating the miR-205-5p-*PTEN* axis. Such an example was presented by Xin et al. describing the effect of lncRNA, i.e., LA16c-313D11.11, on the miR-205-5p-*PTEN* axis, where LA16c-313D11.11 can inhibit the development and progression of EC by acting like a miR-205-5p sponge, and thus thereby indirectly increasing *PTEN* expression [33]. Xin et al. reported that as many as 13 lncRNAs can be associated with the miR-205-5p-*PTEN* network and they are LINC00657, RP11-395G23.3, HNRNPU-AS1, MCM3AP-AS1, SNHG5, SNHG16, LA16c-313D11.11, THAP9-AS1, RP11-379K17.11, RP11-38P22.2, RP11-349A22.5, UBXN8, and ERVK3-1. Researchers concluded that these 13 lncRNAs could act as endogenous spongy RNAs to interact with and suppress miR-205-5p [34].

The role of miR-205-5p in EC still requires additional research and a better understanding of its impact on the mechanism of EC carcinogenesis.

MiR-222-3p has been studied in many types of cancer, including endometrial cancer. Liu et al. showed that miR-222-3p was upregulated in ER α -negative EC tissues. It has been also shown that overexpression of miR-222-3p was correlated with higher grades, later stages, and more nodal metastasis. Moreover, it has been found that, in vivo, miR-222-3p suppression could significantly inhibit tumor growth [35]. However, the role of the clinical significance of miR-222-3p in EC is still not fully understood and therefore it was selected for our analyses.

Fu et al. studied miR-222-3p expression in epithelial ovarian cancer (EOC) patients in mouse models and cell lines. They found it to be a suppressor, and higher expression of miR-222-3p was associated with better overall survival in EOC patients. In addition, they showed that its level was negatively correlated with tumor growth in vivo. Experiments conducted by the researchers in vitro showed that miR-222-3p inhibited the proliferation and migration of EOC cells and reduced AKT phosphorylation. *GNAI2* (G protein alpha inhibiting activity polypeptide 2, Galpha2, G α 2) has been identified as a target of miR-222-3p, and it promotes EOC cell proliferation and is an activator of the PI3K/AKT pathway [36].

The situation is different in non-small cell lung cancer. Chen and Li showed that the expression of miR-222-3p was significantly upregulated in these cancer tissues and cell lines, and that the miR-222-3p inhibitor reduced the activity of non-small cell lung cancer, i.e., reduced cell proliferation and increased cell apoptosis. Overexpression of miR-222-3p

in non-small cell lung cancer cells promoted cell proliferation and reduced their apoptosis. Researchers demonstrated Bcl-2-binding component 3, which was the target gene of miR-222-3p, and its knockdown attenuated the regulatory effect of the miR-222-3p inhibitor on cell proliferation and apoptosis in non-small cell lung cancer cells [37].

SNORD48 (Small Nucleolar RNA, C/D Box 48) (RNU48) is one of many small nuclear RNAs designated as members of the SNORDs family whose expression is stable (at a constant level) in many tissues. Therefore, it is often used as a reference miRNA in research on miRNA expression level (apart from, e.g., U6, SNORD 44). Reference genes were studied by Torres et al., who analyzed the stability of reference genes in patients with endometrial cancer. They showed that RNU48 was one of the most stable genes in EC. Researchers using both NormFinder and geNorm (<https://norm.btm.umed.pl>) indicated that SNORD48 was optimal for normalizing qPCR data in EC tissues. SNORD48 was also expressed equally between normal and tumor samples [38]. In contrast, Bignotti et al. studied the stability of SNORD48 in ovarian cancer and showed that SNORD48 is stable between malignant and normal tissues in ovarian cancer patients. The investigators supported the use of SNORD48 as the best reference for relative quantification in expression studies in ovarian cancer [39]. However, Egidi et al. studied gene stability in urine sediment from prostate cancer patients and showed that the SNORD48 value exceeded the limit of acceptability [40]. Additionally, Lawror et al. studied endogenous SNORD48 in patients irradiated for prostate cancer. The researchers showed that expression levels were associated with a low coefficient of variation after irradiation (6 Gy). Scientists have noticed the effect of radiation on changes in endogenous SNORD48 [41].

Jurcevic et al., using NormFinder, showed that using the five most stable genes including U6 provided the best normalization [42]. In contrast, Lou et al. showed that U6 is unstable in various tumor tissues. The study focused on breast cancer tissues, in which U6 expression was higher compared to healthy tissue, and U6 expression was similarly higher in cancer cells than in mesenchymal cells. High U6 expression levels were higher in liver and intrahepatic bile duct cancer tissues compared with adjacent normal tissues. Researchers have shown that U6 expression and distribution show high variability among several human cell types [43].

The absolute concentration of the studied miRNAs was determined using digital PCR (dPCR). This method offers increased sensitivity and a better limit of detection (LOD) due to the small reaction volume, which increases the effective concentration of the target miRNA. Therefore, the LOD is less restrictive for dPCR than for quantitative PCR (qPCR). Furthermore, digital PCR allows for the absolute quantification of the target nucleic acid in the sample, as opposed to real-time PCR which only provides relative quantification. This leads to more precise and accurate quantification, especially for low-abundance targets.

1.3. The Aim of Study

The aim of this study was to investigate the association between the expression of three miRNAs (miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p) in endometrial cancer tissues. We examined miRNA changes in relation to histopathological differentiation and comorbidities in patients with endometrial cancer. Furthermore, we investigated the stability of SNORD48 and U6 expression in endometrial cancer tissues.

2. Results

The characteristics of the study group, including the clinical features and lifestyle of patients with endometrial cancer, are presented in Table 1. Quantitative variables were compared and analyzed using the U Mann–Whitney test due to the relatively small control group and the presence of deviating data distributions from normal. No statistical significance was obtained for the following factors: age at menarche (first period), vaginal births, caesarean sections, miscarriages, and hyperthyroidism. Statistically significant factors are menopausal status (last menstrual period), hypertension, diabetes (DM), hypothyroidism, and BMI. A statistically significant difference was also obtained in the age of the study

and control groups. This results from the inability to select patients in the appropriate age group, because the material was obtained from endometrial tissue collected during hysterectomy. Therefore, patients undergoing surgery for uterine prolapse or with fibroids were included in the study as a control group.

Table 1. Characteristics and clinical data of the study and control groups.

	Study Group, N = 111 ¹	Control Group, N = 19 ¹	p-Value ²
Age	61 (39–88)	48 (42–92)	<0.001
First period	13 (10–18)	14 (11–17)	0.4
Last menstrual period	51 (37–60)	48 (42–61)	0.043
Birth	2 (0–7)	2 (0–3)	0.2
Cesarean section	0 (0–3)	0 (0–3)	0.5
Miscarriages	0 (0–3)	0 (0–4)	0.2
BMI	29.50 (21.30–50.20)	25.39 (20.08–34.19)	<0.001
Hypertension			0.002
No	48 (43%)	16 (84%)	
Yes	63 (57%)	3 (16%)	
DM			0.042
No	90 (81%)	19 (100%)	
Yes	21 (19%)	0 (0%)	
Hypothyroidism			0.024
No	88 (79%)	19 (100%)	
Yes	23 (21%)	0 (0%)	
Hyperthyroidism			>0.9
No	108 (97%)	19 (100%)	
Yes	3 (2.7%)	0 (0%)	

¹ Median (Range); ² U Mann–Whitney Test, Chi² test with Fisher’s exact test depending on variable. Statistical significance was demonstrated in the following cases: patient’s age, menopausal status (last menstrual period), hypertension, diabetes (DM), hypothyroidism and BMI.

In the above patients, the absolute expression of the following miRNAs was tested: miR-21-5p, miR-205-5p, miR-222-3p, U6, and SNORD48 in endometrial tissues. Statistically significant results were obtained for miR-205-5p ($p < 0.001$), miR-222-3p ($p = 0.013$), and SNORD48 ($p < 0.001$) expression. Table 2 shows the absolute expression of the tested miRNAs in copies per μL .

Table 2. Absolute expression of miR-21-5p, miR-205-5p, miR-222-3p, U6, and SNORD48 in the endometrial cancer study group and in the control group.

Absolute Expression (Copies/ μL)	Study Group N = 111 ¹	Control Group N = 19 ¹	p-Value ²
miR-21-5p	698,576 (56,96–2,858,160)	938,736 (118,688–3,424,496)	0.2
miR-205-5p	4009.2 (64.08–611,824)	181.52 (32.5–7336.80)	<0.001
miR-222-3p	69,752 (819.2–315,144)	112,168 (35,104–421,912)	0.013

Table 2. Cont.

Absolute Expression (Copies/ μ L)	Study Group N = 111 ¹	Control Group N = 19 ¹	p-Value ²
U6	19,390.4 (1034.72–3,321,321)	47,264 (9926.4–119,536)	0.074
SNORD48	79,760 (665.6–581,552)	214,400 (37,168–394,592)	<0.001

¹ Median (Range); ² U Mann–Whitney Test. Statistically significant results were obtained for the expression of miR-205-5p ($p < 0.001$), miR-222-3p ($p = 0.013$) and SNORD48 ($p < 0.001$). The absolute expression of the tested miRNAs is presented in copies per μ L.

In the miRNA expression data used for further analysis, a logarithmic transformation was performed to obtain a normal distribution of the data quantified by digital PCR. The mean logarithmic miRNA expression values were used to determine the fold change (FC). Furthermore, both univariate and multivariate random regression analyses were conducted.

The expression level miRNA in the tested endometrial cancer tissue and in the control group as logarithmic data are presented in Figure 1 and Table 3. The analyses revealed that out of the three miRNAs tested, miR-205-5p (FC 1.4, $p < 0.001$) was upregulated, while miR-222-3p (FC 0.94, $p = 0.013$) was downregulated. In addition, SNORD48 (FC 0.92, $p < 0.001$) showed statistically significant changes in expression. After adjusting the p-value using the Benjamin–Hochberg method, differences in miRNA concentration between the study group and control group for miR-205-5p and SNORD48 remained $p < 0.001$; however, for miR-222-3p, adjusted $p = 0.022$ (U6 and miR-21-5p remained statistically insignificant).

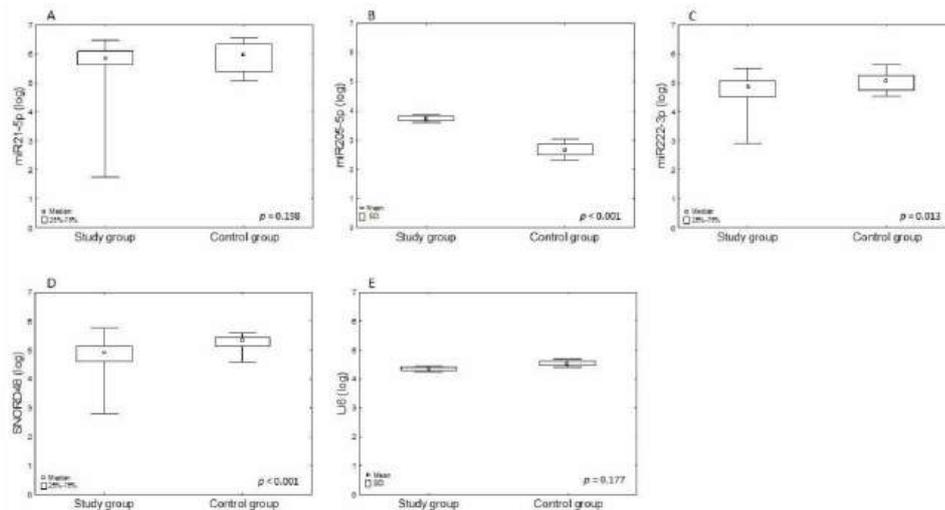


Figure 1. The graphs show logarithmically transformed miR-21-5p (A), miR-205-5p (B), miR-222-3p (C), U6 (D), and SNORD48 (E) expression in endometrial cancer tissues quantified by dPCR, where it was shown that the expression of miR-205-5p in endometrial cancer tissue increased compared to the control group, and the expression of miR-222-3p decreased.

Table 3. Expression of miRNAs in endometrial cancer tissue (N = 111).

miRNA	Study Group Mean \pm SD	Control Group Mean \pm SD	Fold Change	log2FC	p-Value ¹
miR-21-5	5.73 \pm 0.72	5.92 \pm 0.49	0.97	-0.05	0.198
miR-205-5p	3.74 \pm 0.78	2.68 \pm 0.71	1.4	0.48	<0.001
miR-222-3p	4.74 \pm 0.45	5.03 \pm 0.32	0.94	-0.09	0.022
U6	4.35 \pm 0.59	4.54 \pm 0.33	0.96	-0.06	0.177
SNORD48	4.85 \pm 0.44	5.3 \pm 0.25	0.92	-0.12	<0.001

¹ The comparisons were performed using independent *t*-test and U Mann–Whitney test depending on distribution adjusted *p* value using the Benjamin–Hochberg method. The expression level of miRNA in the tested endometrial cancer tissue is presented in the form of logarithmic data. It was shown that miR-205-5p was upregulated, while miR-222-3p was downregulated. SNORD48 showed statistically significant changes in expression.

In view of the fact that our study group differed significantly from the control group and both groups differed in age and comorbidities, the remaining analyses were performed by dividing the study group according to the degree of histopathological differentiation.

To investigate potential factors associated with the occurrence of EC, we performed a univariate logistic regression analysis of clinical variables and miRNA expression levels. It was found that age (OR 1.12, 95% CI: 1.06–1.20, *p* < 0.001), BMI, and hypertension were significant clinical factors associated with the development of EC. Among the miRNAs tested, two showed significant associations with endometrial cancer: miR-205-5p (OR 7.27, 95% CI: 2.96–22.4, *p* < 0.001) and miR-222-3p (OR 0.12, 95% CI: 0.02–0.53, *p* = 0.011). Additionally, the study yielded statistically significant results for SNORD48 (OR 0.04, 95% CI: 0.008 to 0.24, *p* < 0.001) (Table 4).

Table 4. Univariate logistic regression analysis of factors and miRNAs affecting endometrial cancer (N = 111).

	OR (Odds Ratio)	95% CI Lower	95% CI Upper	p-Value
Age	1.12	1.06	1.20	<0.001
First period	0.88	0.65	1.19	0.405
Last menstrual period	1.12	0.995	1.26	0.061
Number of Births	1.36	0.92	2.09	0.140
At least one birth	1.37	0.41	3.996	0.585
More than one birth	1.598	0.59	4.29	0.349
More than two births	3.29	0.87	21.54	0.125
Number of Cesarean sections	0.76	0.41	1.59	0.41
At least one CS	0.68	0.21	2.596	0.532
More than one CS	0.57	0.13	4.05	0.508
Number of miscarriages	0.61	0.31	1.24	0.14
At least one miscarriage	0.51	0.17	1.73	0.244
BMI	1.23	1.096	1.42	0.001
Normal BMI (20–25)	0.16	0.05	0.47	<0.001
Obesity (BMI \geq 30)	5.05	1.57	22.597	0.0137
Hypertension	7	2.18	31.33	0.003
Smoking	0.24	0.04	1.89	0.128
miR-21-5p	0.48	0.11	1.28	0.263
miR-205-5p	7.27	2.96	22.4	<0.001
miR-222-3p	0.12	0.02	0.53	0.011

Table 4. Cont.

	OR (Odds Ratio)	95% CI Lower	95% CI Upper	p-Value
U6	0.56	0.24	1.31	0.178
SNORD48	0.04	0.008	0.24	<0.001

Important clinical factors associated with the development of EC are age, BMI, and hypertension. Among the tested miRNAs, two showed a significant association with endometrial cancer: miR-205-5p (OR 7.27, 95% CI: 2.96–22.4, $p < 0.001$) and miR-222-3p (OR 0.12, 95% CI: 0.02–0.53, $p = 0.011$). The study yielded statistically significant results for SNORD48 (OR 0.04, 95% CI: 0.008–0.24, $p < 0.001$).

In the multivariate logistic regression analysis, only miR-205-5p (OR 6.05, 95%CI: 0.38–19.59, $p = 0.003$) was found to be associated with endometrial cancer. This association also persisted for SNORD48 (OR 0.01, 95%CI: 0.0003–0.47, $p = 0.018$) (Table 5).

Table 5. Multivariate logistic regression analysis of factors and miRNAs associated endometrial cancer (N = 111).

	OR (Odds Ratio)	95% CI Lower	95% CI Upper	p-Value
Age	1.01	0.93	1.1	0.739
Last menstrual period	0.98	0.78	1.22	0.836
BMI	1.16	0.97	1.4	0.11
Hypertension	2.76	0.38	20.05	0.314
miR-205-5 (log)	6.05	1.87	19.59	0.003
miR-222-3 (log)	2.76	0.38	20.05	0.264
SNORD48 (log)	0.01	0.0003	0.47	0.018

It has been shown that miR-205-5p (OR 6.05, 95% CI: 0.38–19.59, $p = 0.003$) is associated with endometrial cancer. This association also held for SNORD48 (OR 0.01, 95% CI: 0.0003–0.47, $p = 0.018$).

In addition, an analysis was performed in which the degree of histological differentiation (grading) according to FIGO of endometrial cancer was considered and divided into three groups:

- G1—highly differentiated cancer (<5% of solid tissue)—30 patients;
- G2—moderately differentiated cancer (6–50% of the solid part)—47 patients;
- G3—poorly differentiated cancer (>50% of the solid tissue)—12 patients.

The division also included EIN (intraepithelial neoplasia)—22 patients.

In the next stage, the expression level of miRNAs was determined in individual degrees of differentiation (G1, G2 and G3) and in EIN (Table 6).

The Kruskal–Wallis test was conducted to assess differences in the expression level of miRNAs and was determined in individual degrees of differentiation (G1, G2 and G3), EIN, and control group. The analysis revealed a significant overall difference in concentration of U6, SNORD48, and miR-205-5 between groups. Subsequent post hoc analyses were performed to investigate pairwise group differences. Results indicated that those pairs differed significantly: for U6, three out of ten pairs: G1 vs. G3 ($p = 0.001$), G2 vs. G3 ($p = 0.002$), and G3 vs. EIN ($p = 0.022$); for SNORD48, two pairs out of ten: G1 vs. control group ($p < 0.001$) and G2 vs. control group ($p < 0.001$); and for miR-205-5, five pairs out of ten: G1 vs. control group ($p = 0.001$), G2 vs. EIN ($p = 0.006$), G2 vs. control group ($p < 0.001$), G3 vs. EIN ($p = 0.013$), and G3 vs. control group ($p < 0.001$). For 222-3p, no statistical difference was seen in post hoc tests.

A univariate logistic regression analysis was conducted to examine the effect of the studied miRNAs on individual degrees of differentiation in endometrial cancer. No significant results were obtained for G1 and G2. The results of univariate logistic regression analysis for EIN and G3 are presented in Tables 7 and 8. Statistical significance was achieved for miR-205-5p (OR 0.48) in EIN (Table 7) and miR-21-5p (OR 0.49), miR-205-5p (OR 3.05), U6 (OR 9.67), and SNORD48 (OR 0.48) for G3 (Table 8).

Table 6. Absolute expression of miR-21-5p, miR-205-5p, miR-222-3p, U6, and SNORD48 in individual degrees of EC differentiation and EIN.

Absolute Expression (Copies/ μ L)	Control Group N = 19 ¹	EIN N = 22 ¹	G1 N = 30 ¹	G2 N = 47 ¹	G3 N = 12 ¹	p-Value ²
miR-21-5p	938,736 (118,688–3,424,496)	559,560 (177,664–2,858,160)	630,336 (39,392–2,333,184)	711,920 (115.04–2,591,056)	860,536 (56.96–2,264,720)	0.522
miR-205-5p	399.8 (32.5–7337)	1590 (155.5–45,008)	3367.2 (246.72–99,696)	8067 (64.1–113,472)	20,360 (1858.6–94,824)	<0.001
miR-222-3p	112,168 (35,104–421,912)	74,548 (7464–224,816)	83,720 (819.2–261,680)	63,376 (4096.8–315,144)	43,648 (13,256–117,560)	0.058
U6	47,264 (9926.4–119,536)	19,032 (3761.6–113,680)	16,482.4 (1283.84–134,320)	16,656 (1034.72–3,321,312)	133,008 (14,384–590,000)	<0.001
SNORD48	214,400 (37,168–394,592)	97,088 (18,800–304,272)	59,520 (665.6–493,216)	49,520 (11,449.6–459,344)	227,200 (9840–581,552)	<0.001

¹ Median (Range); ² Kruskal–Wallis rank sum test. Analysis using the Kruskal–Wallis test showed a significant overall difference in the concentration of U6, SNORD48, and miR-205-5, between the groups. Statistical significance was demonstrated for miR-205-5p ($p < 0.001$), miR-222-3p ($p = 0.058$), U6 ($p < 0.001$), and SNORD48 ($p < 0.001$).

Table 7. Univariate logistic regression analysis of factors and miRNAs affecting EIN (N = 22).

miRNA	OR	95% CI Lower	95% CI Upper	p-Value
miR-21-5	0.48	0.11	1.28	0.263
miR-205-5p	0.48	0.25	0.86	0.018
miR-222-3p	1.74	0.59	6.12	0.35
U6	0.8	0.34	1.8	0.594
SNORD48	1.48	0.51	4.76	0.492

Statistical significance in EIN was achieved for miR-205-5p (OR 0.48).

Table 8. Univariate logistic regression analysis of factors and miRNAs affecting G3 histological grade (N = 12).

miRNA	OR	95% CI Lower	95% CI Upper	p-Value
miR-21-5p	0.49	0.26	0.91	0.019
miR-205-5p	3.04	1.14	9.73	0.037
miR-222-3p	0.49	0.15	1.84	0.26
U6	9.67	2.96	41.97	<0.001
SNORD48	5.69	1.09	38.01	0.053

Statistical significance in G3 was achieved for miR-21-5p (OR 0.49), miR-205-5p (OR 3.05), U6 (OR 9.67), and SNORD48 (OR 0.48).

Since age was found to be statistically significant ($p < 0.001$), the expression of individual miRNAs in the endometrial cancer study group was determined depending on age (< and >50 years of age). We obtained a statistically significant result in the case of miR-205-5p ($p = 0.041$) (Table 9).

Table 9. Expression of miR-21-5p, miR-205-5p, miR-222-3p, U6, and SNORD48 depending on age only in the study group.

Absolute Expression (Copies/ μ L)	Age < 50, N = 17 ¹	Age > 50, N = 94 ¹	p-Value ²
miR-21-5p	764,944 (177,664–2,061,856)	698,576 (56.96–2,858,160)	0.509

Table 9. Cont.

Absolute Expression (Copies/ μ L)	Age < 50, N = 17 ¹	Age > 50, N = 94 ¹	p-Value ²
miR-205-5p	1590 (155.5–113,472)	5057.6 (64.08–611,824)	0.041
miR-222-3p	42,850.7 (7464–223,040)	78,764 (819.2–315,144)	0.063
U6	26,192 (3761.6–107,856)	19,167.2 (1034.72–3,321,312)	>0.9
SNORD48	77,744 (14,462.4–184,144)	80,904 (665.6–581,552)	0.6

¹ Median (Range); ² U Mann–Whitney Test. We obtained a statistically significant result in the case of miR-205-5p ($p = 0.041$).

The study revealed a 1.23-fold increase in the risk of endometrial cancer with increasing body mass index (BMI), as determined by univariate logistic regression analysis ($p = 0.001$) (Table 4). Therefore, in patients with endometrial cancer, we analyzed the relationship between individual miRNA expression and BMI. Patients were grouped by BMI (Table 10):

- 18.5–24.9—normal weight (14 patients);
- 25–29.9—overweight (43 patients);
- 30 and above means obesity (54 patients).

Table 10. Division of patients depending on body mass index (BMI).

BMI	Study Group N = 111 ¹	Control Group N = 19 ¹	p-Value ²
Normal	14 (13%)	9 (47%)	<0.001
Overweight	43 (39%)	7 (37%)	
Obesity	54 (49%)	3 (16%)	

¹ n (%); ² Chi² test.

In the study group, only 13% had normal body weight, and as many as 49% of patients were obese.

The study group was divided depending on the differentiation of the tumor (Table 11). In the EIN group, 86% of patients had abnormal body weight; in the G1 group, 90%; in the G2 group, 89.3%; and in the G3 group, 81.8%.

Table 11. Division of patients examined in various degrees of differentiation depending on BMI.

BMI	EIN N = 22 ¹	G1 N = 30 ¹	G2 N = 47 ¹	G3 N = 12 ¹	p-Value ²
Normal	3 (14%)	3 (10%)	5 (10.6%)	3 (18.2%)	0.72
Overweight	10 (45%)	11 (37%)	16 (34%)	6 (54.5%)	
Obesity	9 (41%)	16 (53%)	26 (55.3%)	3 (27.3%)	

¹ n (%); ² Chi² test.

Then, the absolute expression of individual miRNAs was determined depending on BMI in the study group. However, we did not obtain statistically significant results (Table 12).

Then, the expression of individual miRNAs was determined in the endometrial cancer study group depending on the presence of comorbidities such as hypertension (Table 13), diabetes (Table 14), and hypothyroidism (Table 15). No statistically significant results were obtained.

Table 12. Expression of miR-21-5p, miR-205-5p, miR-222-3p, U6, and SNORD48 depending on BMI only in the study group.

Absolute Expression (Copies/ μ L)	Normal N = 14 ¹	Overweight N = 43 ¹	Obesity N = 54 ¹	p-Value ²
miR-21-5p	1,092,576 (197,296–2,264,720)	694,496 (56,96–2,858,160)	631,112 (114,08–2,591,056)	0.088
miR-205-5p	6002 (259.5–96,128)	4009.2 (155.52–113,472)	4209.6 (64.08–611,824)	0.869
miR-222-3p	69,112 (4460.8–315,144)	69,752 (7088.8–261,680)	66,988 (819.2–233,960)	0.728
U6	30,168 (5124.8–314,608)	18,704 (1283.84–3,321,312)	18,936 (1034.72–388,256)	0.421
SNORD48	94,232 (26,272–354,656)	91,632 (665.6–581,552)	64,048 (6481.6–519,488)	0.473

¹ Median (Range); ² Kruskal–Wallis test. No statistically significant results were obtained.**Table 13.** Expression of miR-21-5p, miR-205-5p, miR-222-3p, U6, and SNORD48 depending on hypertension (HA) only in the study group.

Absolute Expression (Copies/ μ L)	HA–, N = 48 ¹	HA+, N = 63 ¹	p-Value ²
miR-21-5p	747,056 (115.04–2,858,160)	697,472 (56.96–2,591,056)	0.875
miR-205-5p	3674.8 (64.08–113,472)	4,379.6 (0–611,824)	0.421
miR-222-3p	73,768 (4460.8–223,040)	63,240 (819.2–315,144)	0.554
U6	19,104 (1283.84–590,000)	19,390.4 (1034.72–3,321,312)	0.52
SNORD48	83,224 (665.6–354,656)	77,488 (6481.6–581,552)	0.882

¹ Median (Range); ² U Mann–Whitney test. No statistically significant results were obtained.**Table 14.** Expression of miR-21-5p, miR-205-5p, miR-222-3p, U6, and SNORD48 depending on diabetes (DM) only in the study group.

Absolute Expression (Copies/ μ L)	DM–, N = 90 ¹	DM+, N = 21 ¹	p-Value ²
miR-21-5p	631,728 (56.96–2,858,160)	799,984 (161,648–2,210,368)	0.579
miR-205-5p	3855.2 (64.08–611,824)	8424 (692.24–92,712)	0.164
miR-222-3p	71,460 (4096.8–315,144)	59,248 (819.2–261,680)	0.44
U6	18,816 (1034.72–3,321,312)	24,624 (3926.4–134,320)	0.472
SNORD48	86,920 (665.6–581,552)	58,704 (6481.6–493,216)	0.401

¹ Median (Range); ² U Mann–Whitney test. No statistically significant results were obtained.

Table 15. Expression of miR-21-5p, miR-205-5p, miR-222-3p, U6, and SNORD48 depending on hypothyroidism only in the study group.

Absolute Expression (Copies/ μ L)	Hypothyroidism $-$, N = 88 ¹	Hypothyroidism $+$, N = 23 ¹	p-Value ²
miR-21-5p	680,912 (56,96–2,858,160)	740,480 (166,528–2,210,368)	0.746
miR-205-5p	3894.8 (64.08–108,664)	4549.6 (692.24–611,824)	0.16
miR-222-3p	78,140 (4096.8–315,144)	49,504 (819.2–224,816)	0.192
U6	20,520 (1034.72–3,321,312)	18,704 (1964.8–134,320)	0.859
SNORD48	83,056 (665.6–581,552)	62,112 (6481.6–493,216)	0.178

¹ Median (Range); ² U Mann–Whitney test. No statistically significant results were obtained.

The study also assessed miRNA stability analysis (reference miRs U6 and SNORD48) using NormiRazor. NormiRazor is a tool that implements three different existing normalization algorithms—geNorm, NormFinder, and BestKeeper. The originally estimated U6 and SNORD48 were found to be unstable. Stability analysis was performed on single miRNAs and a combination of two miRNAs (U6 and SNORD48). However, none of the miRNAs tested, used singly or in combination, are stable enough in endometrial cancer tissue to be applied as a reference miRNA (Table 16). These results show that both U6 and SNORD48 are not good reference miRNAs for endometrial cancer.

Table 16. Single miRNA stability analysis.

miRNA	GeNorm Stability	NormFinder Stability	BestKeeper Stability	Average Stability
U6	0.29	0.07	0.27	0.21
SNORD48	0.29	0.05	0.17	0.17
U6+SNORD48	0.17	0.04	0.11	0.33

The study assessed miRNA stability analysis: miR U6 and SNORD48 using NormiRazor. U6 and SNORD48 were found to be unstable. Stability analysis was performed on single miRNAs and a combination of two miRNAs (U6 and SNORD48). However, none of the miRNAs tested, used alone or in combination, are sufficiently stable in endometrial cancer tissue to be used as a reference miRNA.

3. Discussion

Our study included 130 patients, with 111 in the study group and 19 in the control group. All patients had endometrial material collected during hysterectomy. Our control group consisted of endometrial tissues collected from patients undergoing surgery due to pelvic organ prolapse or uterine fibroids.

This study observed changes in miRNA expression levels in endometrial cancer tissue. In particular, miR-205-5p was upregulated, while miR-222-3p was downregulated, in comparison to the control group. In contrast, altered miR-21-5p expression was only significant in histological group G3.

In the study we observed increased expression of miR-205-5p in the endometrial cancer study group compared to the control group (FC 1.4, $p < 0.001$). Furthermore, we confirmed the association of elevated miR-205-5p expression in patients with endometrial cancer through univariate (OR 7.72, $p = 0.037$) and multivariate (OR 6.05, $p = 0.003$) logistic regression analyses. The levels of miRNAs were analyzed in different histopathological differentiation groups (EIN, G1, G2, and G3). It was observed that miR-205-5p is overexpressed in patients diagnosed with EIN ($p = 0.018$) and in stage G3 endometrial cancer ($p = 0.037$). This observation is very important because we know that miR-205-5p causes a decrease in the expression of *PTEN*, which is a tumor suppressor gene and thus may influ-

ence carcinogenesis [29]. MiR-205-5p can also increase cancer cell proliferation and reduce apoptosis by affecting *FOXO1*. Understanding these mechanisms in more detail may have an impact on inhibiting carcinogenesis in EC through the use of miR-205-5p inhibitors [32].

Additionally, Xin W. et al. demonstrated a significant increase in miR-205-5p expression in endometrial cancer tissues. This study was based on endometrial tissue material obtained from 60 patients (30 patients constituted the study group and 30 patients constituted the control group). The control group included, similarly to our study, women treated for diseases not related to endometrial tissue, i.e., uterine fibroids and pelvic organ prolapse. In our study, the tissue material was obtained by hysterectomy or curettage of the uterine cavity only during hysterectomy [34]. Kulinczak et al. demonstrated higher expression of miR-205-5p not only in EC tissue, but also in tissue adjacent to the tumor. This study was based on a 49-person study group and a 25-person control group [44].

Most studies suggest that miR-222-3p has oncogenic effects on cancer cells [35,37,45]. The selection and inclusion of miR-222-3p in the study was due to its potential impact on EC development [35]. Previous studies show that miR-222-3p has an oncogenic effect by regulating MMP2 (matrix metalloproteinase), MMP9, *TRPS1* (trichorhinophalangeal syndrome type 1), and *CDKN1C/p57* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C) [35,46,47]. Our observations do not confirm the oncogenic role of miR-222-3p and put this microRNA in a new light. Our study revealed that miR-222-3p was downregulated in endometrial cancer tissues (FC 4.74, $p = 0.013$). In contrast, significant changes in miR-222-3p expression levels were not demonstrated among the different histopathological classification groups. However, it is interesting to note that the levels of miR-222-3p tend to decrease across all groups, with the lowest expression observed in G3. Our study suggests a rather suppressive role of miR-222-3p and offers new therapeutic possibilities. By inducing an increase in the expression of miR-222-3p, we may be able to inhibit the proliferation of EC cells.

Another study on endometrial cancer showed an increase in miR-222-3p expression, but in ER α -negative tissues, while miR-222-3p expression was significantly lower in ER α -positive tissues. In this study, the expression level of miR-222-3p was inversely correlated with the expression of ER α , and the expression level of miR-222-3p was lower in lower grade tumors. The study was conducted on a group of 75 patients [35].

However, a completely different role of miR-222-3p was demonstrated by Fu et al. in a study conducted on a group of 74 patients with ovarian cancer. In this study, miR-222-3p acts as a suppressor of ovarian cancer. Researchers found longer survival in ovarian cancer patients with high levels of miR-222-3p, compared to a group of patients with low levels of miR-222-3p. This study shows that miR-222-3p may be a better prognostic indicator for ovarian cancer patients [36].

MiR-21-5p is a well-described PTEN inhibitor [16]; researchers have also described its promoting effect on EMT [11], which is why we decided to choose this oncogenic microRNA for our studies. However, no significant differences in miR-21-5p expression were observed in the EC study group compared to the control group.

Additionally, there were no statistically significant changes in miR-21-5p expression levels for any degree of histopathological differentiation compared to the control group. However, when analyzing the individual histopathological groups, a statistically significant increase in miR-21-5p expression was observed in histopathological differentiation G3 compared to the other classification groups (OR = 0.49, $p = 0.019$).

Although this miRNA is one of the most consistently expressed miRNAs in almost all types of human cancer, and may be a useful clinical biomarker and therapeutic target [18,19,22], it also increases in endometrial cancer. Sato et al. described high miR-21-5p expression in EC cells, and it was associated with greater disease progression and lymph node metastases [48].

Bouziyane et al. demonstrated the high diagnostic efficacy of miR-21-5p in their research. This study included a large group of 71 endometrial cancer tissues, 53 adjacent tissues, and 54 benign lesions [49].

In our study, we did not obtain a significant miR-21-5p result in EIN using univariate logistic regression, but a statistically significant result appeared in G3 ($p = 0.019$). Similar observations were reported by Sato et al. Sato et al. examined the relationship between miR-21-5p expression and clinicopathological characteristics. The study was conducted on a large number of patients with uterine corpus cancer; the entire group consisted of 230 patients, and there were 176 endometrioid carcinomas (G1 = 77, G2 = 51, G3 = 48). Researchers showed high expression of miR-21-5p in cancer cells with a higher histological grade (G3 vs. G1, G2) in the case of endometrial cancer, $p < 0.0001$. However, they did not show any relationship between miR-21-5p expression and patient age (<60 vs. ≥ 60) or FIGO stage (stage I/II vs. III/IV) in their study [39].

Comorbidities are well-known risk factors for endometrial cancer and have been described previously [48,50–53]. The above data were analyzed using univariate logistic regression. As a result of this analysis, we confirmed that the patients' age, BMI, and hypertension influence the incidence of endometrial cancer. The study group with endometrial cancer was divided according to the presence of comorbidities or without comorbid diseases. A statistically significant result was obtained in the group divided by patient age ($p = 0.041$). In this group, the expression of miR-205-5p was upregulated in the group >50 years of age. We did not obtain statistically significant results in the groups with hypertension, diabetes, or hypothyroidism.

In the knowledge that obesity is a significant risk factor for endometrial cancer [54], we also included this parameter in our study. As a result of our analysis, we confirmed that BMI is a risk factor for endometrial cancer ($p < 0.001$). It was concluded that there is a positive correlation between an increase in BMI and the risk of endometrial cancer (OR 1.23, $p = 0.001$). Furthermore, we analyzed the impact of BMI on the expression of the studied miRNAs in patients with endometrial cancer. However, we did not find any significant differences in miRNA expression between EC patients with a normal BMI and those who were overweight or obese. In EC patients with a higher-than-normal BMI, there was a trend for decreased miR-21-5p expression, although this result did not reach statistical significance. However, obesity and changes in miRNAs were described in previous works as a cancer risk factor [55]. Rodrigues et al. also showed increased miR-21-5p expression in obese individuals with hepatocarcinogenesis [56].

Our research shows that SNORD48 is not stable and its expression differs significantly in tissues from patients and in tissues from healthy people. This study showed that SNORD48 expression was downregulated in endometrial cancer tissue compared to the control group (FC 0.92, $p < 0.001$). Furthermore, SNORD48 was identified as a factor in the development of endometrial cancer in both univariate (OR 0.04, $p < 0.01$) and multivariate (OR 0.01, $p = 0.018$) logistic regression analyses. Furthermore, an analysis of the study group divided into histopathological grades revealed changes in SNORD48 expression. There was a higher expression of SNORD48 in the G3 group compared to the other histopathology groups, including EIN. The relationship was statistically significant ($p < 0.001$). Furthermore, we demonstrated the instability using the NormiRazor tool.

To date, the data on the effects of SNORD48 on endometrial cancer are limited. However, some studies suggest a potential link between SNORD48 and cancer. Egidi et al. studied urinary miRNAs in prostate cancer patients and SNORD48 exceeded the limits of acceptability [40].

Shen et al. examined SNORDs in colorectal cancer patients and observed upregulation of SNORDs 48 [57]. Rapti et al. used SNORD48 as a reference gene in colorectal cancer [58]. Bignotti et al. used SNORD48 in a study of serous undifferentiated ovarian cancer and it emerged as the best reference gene [39]. Mase et al. assessed the stability of five reference genes (U6, SNORD48, SNORD44, miR-16, and 5S) in atrial tissues of 18 cardiac surgery patients in sinus rhythm and atrial fibrillation. All quantitative stability methods ranked SNORD48 as the best reference gene [59].

In conclusion, our studies suggest that SNORD48 may influence the development of endometrial cancer. However, further research is needed to better understand the role of SNORD48 in the development of endometrial cancers.

The second miRNA that we planned to use as a reference is U6 (RNU6-1). It is recommended to use this miRNA as a control for endometrial cancer. Jurcevic et al. examining endogenous control genes in a rat model of endometrial cancer, and detected significant differences in U6 expression between malignant and non-malignant samples ($p < 0.05$) [42].

In this study, no statistically significant changes in U6 expression were observed between the study and control groups. However, the differences in U6 expression in different degrees of histological differentiation were unexpected, indicating its instability. The expression of this miRNA decreased in the early phases (EIN, G1, and G2), whereas it increased in G3 compared to the control group ($p < 0.001$). Furthermore, we assessed the stability of U6 in endometrial cancer tissue using the NormiRazor tool. The analysis confirmed the low stability of this miRNA. Therefore, we could not use U6 as a reference gene. The explanation of U6 expression changes in different histological grades requires further research.

4. Materials and Methods

4.1. Tissues Samples

The study involved 111 patients diagnosed with endometrial cancer. All diagnoses were confirmed by previous histopathological tests. These patients came to the Department of Gynecology, Gynecology Oncology and Obstetrics of the Fryderyk Chopin University Hospital in Rzeszów between 03/2021 and 09/2022 to start oncological treatment. The study also included 19 healthy women (without endometrial cancer) operated on in the local clinic due to pelvic organ prolapse or uterine fibroids, and they formed a control group. All women consented to the use of tissues for genetic testing. Consent of the Bioethics Committee of the District Medical Chamber of 21 May 2020, resolution No. 54/B/2020. None of the patients received hormonal therapy, radiotherapy, or chemotherapy before sample collection.

4.2. MiRNA Isolation from Tissue Samples

The endometrial cancer tissue samples were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stored in RNAlater Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Germany). Isolation of total RNA, including miRNA, from cancer tissue was performed using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Initially, tissues thawed on ice were transferred to tubes containing 700 μL of QIAzol Lysis Reagent and then homogenized by sonication. After the addition of chloroform and centrifugation (15 min at $12,000\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), the upper aqueous phase containing total RNA, including miRNA, was mixed in new tubes with ethanol and then transferred to an RNeasy MiniElute Spin Column and washed. The RWT washing buffer was diluted in isopropanol. During the purification procedure, DNA digestion was performed using the RNase-free DNase kit (Qiagen, Hilden, Germany). A quantity of 30 μL of RNase-free water was used to elute the RNA. The RNA concentration was measured using the NanoDropTM 2000c Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), diluted to the final RNA concentration of 5 ng/ μL , and then used. The quality of the isolated RNA was also assessed by electrophoretic separation on a 1% agarose gel. The RNA was reverse transcribed immediately after isolation.

4.3. Reverse Transcriptase Reaction and dPCR Method

MiRNAs were polyadenylated using poly(A) polymerase and reverse transcribed into cDNA using oligo-dT primers, which have a degenerate 3' anchor that allows miRNA amplification in a real-time PCR reaction. Polyadenylation and reverse transcription were conducted in parallel in the same tube. cDNA was synthesized according to the manufacturer's guidelines using the miRCURY LNA Reverse Transcription Kit (Qiagen,

Hilden, Germany). The reactions were performed in a final volume of 10 μL , using 10 ng of RNA. The RT reaction was incubated at 42 $^{\circ}\text{C}$ for 60 min and inactivated at 95 $^{\circ}\text{C}$ using a T100™ 96-well thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The cDNA was stored at -20°C until further use.

The study used dPCR to quantify absolute expression of selected miRNAs expression by combining the limiting dilution, PCR endpoint, and Poisson statistics. QIAcuity System dPCR (Qiagen, Hilden, Germany) was used to determine the absolute expression of the miRNAs tested. The digital PCR (dPCR) technique uses microfluidic nanoplate technology. This method allows the quantification of nucleic acids based on measuring the fluorescence endpoint of each partition. The absolute expression for the miRNAs was determined: hsa-miR-21-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-222-3p, U6 snRNA (hsa, mmu), SNORD48 (hsa) using miRCURY LNA miRNA PCR Assay applying a Nanoplate 8.5 K 96-well (Qiagen, Hilden, Germany). An optimization was performed before the assays to select an appropriate concentration of cDNA and avoid partition overload. The optimization was conducted separately for each miRNA by analyzing a range of dilutions from 10-fold to 100-fold relative to the starting material. For dPCR reactions, miR-205-5p and miR-222-3p were used at a 20 \times dilution, while miR-21-5p, SNORD48, and U6 were used at a 40 \times dilution. A 12 μL reaction mixture was prepared, consisting of 4 μL Eva Green Master Mix (3 \times), 1.2 μL miRCURY LNA PCR primers (10 \times), and 3 μL of diluted cDNA. The samples were loaded into the wells of a 96-well PCR nanoplate, which was then sealed with an QIAcuity nanoplate seal. Thermal cycling conditions were as follows: 95 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, then 45 cycles of 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s and 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and three final steps at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The plate was read in the green channel using the parameters of an exposure time of 500 ms and a gain of 6. In our study, the lowest detectable values were for miR-205-5p, 32.5 copies/ μL ; miR-222-3p, 819.2 copies/ μL ; miR-21-5p, 56.96 copies/ μL ; SNORD48, 665.6 copies/ μL ; and U6, 1034.72 copies/ μL . Initially, snRNAs U6 and SNORD48 were selected as potential reference genes. Due to the lack of stability in the SNORD48 and U6 reference gene samples, we present the results only as absolute expression (copies/ μL). The calculations were performed using QIAcuity software version 2.1.8 (Qiagen, Hilden, Germany).

Figure 2 shows the workflow for the experiment and analysis of the data.

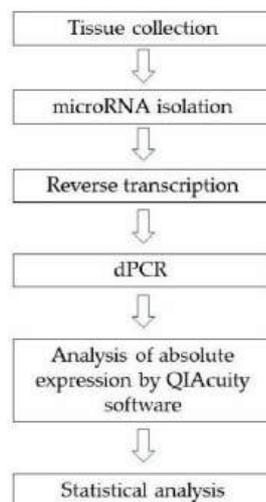


Figure 2. Diagram showing the steps in our research.

4.4. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed for the following subgroups: tissue, tissue (study group only), tissue (control group only).

MiRNA expression quantified by dPCR was logarithmically transformed to obtain a normal distribution of the data. MiRNA stability analysis was then assessed using NormiRazor. NormiRazor is a tool that implements three different existing normalization algorithms—geNorm, NormFinder, and BestKeeper. The originally estimated U6 and SNORD48 snRNAs were found to be unstable; therefore, the data were not normalized by these miRNAs. This approach results in higher log values for higher miRNA expression, allowing simple interpretation of biomarkers. Patient data and differential expression analysis for quantitative variables was performed using the independent *t* test, Welch's *t* test, and Mann–Whitney U or Kruskal–Wallis test depending on the distribution of variables and equality of variances tested by the Shapiro–Wilk test and Levene's test, respectively. For qualitative variables, the chi2 test was used with Yate's correction and Fisher's exact test when needed, depending on sample size. Univariate logistic regression analysis was used to assess the impact of individual factors on the occurrence of endometrial cancer. Subsequently, statistically significant variables identified in the univariate analysis were included in a multivariate logistic regression model. Nominal variables are presented as numbers and percentages or as median (range or interquartile range) and mean (SD), depending on the normality of their distribution. Statistical analysis was performed using Statistica 13.1 (Tibco, Palo Alto, CA, USA) and R version 4.2.1. *p*-values less than 0.05 were considered significant.

5. Conclusions

Our study was based on calculations performed by digital PCR to determine the expression of the studied miRNAs in patients with endometrial cancer. Expression changes in endometrial cancer tissue were observed for miR-205-5p, miR-222-3p, and SNORD48. In the endometrial cancer tissue, miR-205-5p was upregulated compared to the control group, while miR-222-3p and SNORD48 were downregulated. We also observed an association between miR-205-5p, U6, and SNORD48 expression levels and histological grades. The expression level of U6 varied in different stages of EC, suggesting its lack of stability. We found no association between the expression of the miRNAs studied and body mass index or other comorbidities in patients with endometrial cancer.

In this study, SNORD48 and U6 did not meet the expectations of a reference miRNA because they may also influence the development of endometrial cancer, suggesting that they should not be used as reference miRNAs in endometrial cancer. However, further research is needed to better understand the role of SNORD48 and U6 in the development of endometrial cancers.

Our research requires confirmation in a larger group of patients and an increase in the number of miRNAs tested. It creates new diagnostic possibilities and, through new targeted therapies, it gives us new treatment possibilities.

Limitations

Our study had some limitations. The first was the control group, which consisted of only 19 patients.

There was also an uneven distribution of patients in particular groups of histopathological differentiation—the EIN group consisted of 22 patients, the G1 group consisted of 30 patients, the G2 group consisted of 47 patients, while the G3 group consisted of only 12 patients.

Author Contributions: Conceptualization, A.B., N.P., I.Z. and T.K.; methodology, N.P., S.P., M.S., A.B. and A.Z.; software, M.K. (Michał Kośny) and N.P.; validation, I.Z. and T.K.; formal analysis, M.K. (Michał Kośny); investigation, A.B., N.P., S.P. and M.S.; resources, A.B., M.K. (Marta Kluz) and T.K.; data curation, N.P., A.B. and S.P.; writing—original draft preparation, A.B.; N.P., S.P.

and M.S.; writing—review and editing, A.B., N.P., I.Z. and T.K.; visualization, A.B., N.P. and M.K. (Michał Kośny); supervision, I.Z. and T.K.; project administration, A.B., N.P., S.P. and M.S.; funding acquisition, T.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of the Regional Medical Chamber in Rzeszow, protocol code 54/B/2020 and date 21 May 2020.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors on request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#)
- Torre, L.A.; Bray, F.; Siegel, R.L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 87–108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Makker, V.; MacKay, H.; Ray-Coquard, I.; Levine, D.A.; Westin, S.N.; Aoki, D.; Oaknin, A. Endometrial cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**, *7*, 88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yen, T.T.; Wang, T.L.; Fader, A.N.; Shih, I.M.; Gaillard, S. Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2020**, *39*, 26–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kandath, C.; Schultz, N.; Cherniack, A.D.; Akbani, R.; Liu, Y.; Shen, H.; Robertson, A.G.; Pashtan, I.; Shen, R.; Benz, C.C.; et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **2013**, *497*, 67–73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stavropoulos, A.; Varras, M.; Vasilakaki, T.; Varra, V.K.; Tsavari, A.; Varra, F.N.; Nonni, A.; Kavantzias, N.; Lazaris, A.C. Expression of p53 and PTEN in human primary endometrial carcinomas: Clinicopathological and immunohistochemical analysis and study of their concomitant expression. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 4575–4589. [\[CrossRef\]](#)
- Konopka, B.; Paszko, Z.; Janiec-Jankowska, A.; Goluda, M. Assessment of the quality and frequency of mutations occurrence in PTEN gene in endometrial carcinomas and hyperplasias. *Cancer Lett.* **2002**, *178*, 43–51. [\[CrossRef\]](#)
- Gbelcová, H.; Gergely, L.; Šišovský, V.; Straka, L.; Böhmer, D.; Pastoráková, A.; Sušenková, K.; Repiská, V.; Korbel, M.; Danihel, L.; et al. PTEN mutations as predictive marker for the high-grade endometrial cancer development in slovak women. *Physiol. Res.* **2022**, *71*, S125–S135. [\[CrossRef\]](#)
- Khatami, F.; Shahriari, S.; Aminimoghaddam, S.; Klashami, Z.N.; Farahani, M.S.; Teimoori-Toolabi, L.; Amoli, M.M.; Asadi, M.; Rashidi, B.H. PTEN promoter methylation and expression in endometrial cancer tissues. *Epigenomics* **2023**, *15*, 507–516. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, C.; Li, Q.; He, Y. MicroRNA-21-5p promotes epithelial to mesenchymal transition by targeting SRY-box 17 in endometrial cancer. *Oncol. Rep.* **2020**, *43*, 1897–1905. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stampoliou, A.; Arapantoni-Dadioti, P.; Pavlakis, K. Epigenetic mechanisms in endometrial cancer. *J. BUON* **2016**, *21*, 301–306. [\[PubMed\]](#)
- Favier, A.; Rocher, G.; Larsen, A.K.; Delangle, R.; Uzan, C.; Sabbah, M.; Castela, M.; Duval, A.; Mehats, C.; Canlorbe, G. MicroRNA as Epigenetic Modifiers in Endometrial Cancer: A Systematic Review. *Cancers* **2021**, *13*, 1137. [\[CrossRef\]](#)
- Lu, J.; Getz, G.; Miska, E.A.; Alvarez-Saavedra, E.; Lamb, J.; Peck, D.; Sweet-Cordero, A.; Ebert, B.L.; Mak, R.H.; Ferrando, A.A.; et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **2005**, *435*, 834–838. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lee, Y.S.; Dutta, A. MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **2009**, *4*, 199–227. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Qin, X.; Yan, L.; Zhao, X.; Li, C.; Fu, Y. microRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer. *Oncol. Lett.* **2012**, *4*, 1290–1296. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tian, C.; Su, J.; Ma, Z.; Wu, Y.; Ma, H. lncRNA NBATI Inhibits Cell Metastasis and Promotes Apoptosis in Endometrial Cancer by Sponging miR-21-5p to Regulate PTEN. *Comput. Math. Methods Med.* **2022**, *2022*, 9304392. [\[CrossRef\]](#)
- Li, Q.; Li, B.; Wei, S.; He, Z.; Huang, X.; Wang, L.; Xia, Y.; Xu, Z.; Li, Z.; Wang, W.; et al. Exosomal miR-21-5p derived from gastric cancer promotes peritoneal metastasis via mesothelial-to-mesenchymal transition. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 854. [\[CrossRef\]](#)
- Tang, J.; Li, X.; Cheng, T.; Wu, J. miR-21-5p/SMAD7 axis promotes the progress of lung cancer. *Thorac. Cancer* **2021**, *12*, 2307–2313. [\[CrossRef\]](#)
- He, Q.; Ye, A.; Ye, W.; Liao, X.; Qin, G.; Xu, Y.; Yin, Y.; Luo, H.; Yi, M.; Xian, L.; et al. Cancer-secreted exosomal miR-21-5p induces angiogenesis and vascular permeability by targeting KRIT1. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 576. [\[CrossRef\]](#)
- Liu, M.; Mo, F.; Song, X.; He, Y.; Yuan, Y.; Yan, J.; Yang, Y.; Huang, J.; Zhang, S. Exosomal hsa-miR-21-5p is a biomarker for breast cancer diagnosis. *PeerJ* **2021**, *9*, e12147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

22. Cao, J.; Zhang, Y.; Mu, J.; Yang, D.; Gu, X.; Zhang, J. Exosomal miR-21-5p contributes to ovarian cancer progression by regulating CDK6. *Hum. Cell* **2021**, *34*, 1185–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Greene, S.B.; Gunaratne, P.H.; Hammond, S.M.; Rosen, J.M. A putative role for microRNA-205 in mammary epithelial cell progenitors. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 606–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Jiang, J.; Lee, E.J.; Gusev, Y.; Schmittgen, T.D. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5394–5403. [[CrossRef](#)]
25. Wang, X.; Tang, S.; Le, S.Y.; Lu, R.; Rader, J.S.; Meyers, C.; Zheng, Z.M. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gottardo, F.; Liu, C.G.; Ferracin, M.; Calin, G.A.; Fassan, M.; Bassi, P.; Seignani, C.; Byrne, D.; Negrini, M.; Pagano, F.; et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol. Oncol.* **2007**, *25*, 387–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Markou, A.; Tsaroucha, E.G.; Kaklamanis, L.; Fotinou, M.; Georgoulas, V.; Liamidou, E.S. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 1696–1704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Karaayvaz, M.; Zhang, C.; Liang, S.; Shroyer, K.R.; Ju, J. Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35158. [[CrossRef](#)]
29. Zhuo, Z.; Yu, H. miR-205 inhibits cell growth by targeting AKT-mTOR signaling in progesterone-resistant endometrial cancer Ishikawa cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 28042–28051. [[CrossRef](#)]
30. Mutter, G.L. PTEN, a protean tumor suppressor. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158*, 1895–1898. [[CrossRef](#)]
31. Chen, X.; Zhang, L.; Geng, J.; Chen, Z.; Cui, X. MiR-205-5p Functions as a Tumor Suppressor in Gastric Cancer Cells through Downregulating FAM84B. *J. Oncol.* **2022**, *2022*, 8267891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lu, Z.; Xu, Y.; Yao, Y.; Jiang, S. miR-205-5p contributes to paclitaxel resistance and progression of endometrial cancer by downregulating FOXO1. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* **2019**, *5*, 43–57. [[CrossRef](#)]
33. Xin, W.; Zhao, S.; Han, X.; Zhao, P.; Yu, H.; Gao, X.; Li, P.; Wu, Q.; Ding, J.; Hua, K. lncRNA LA16c-313D11.11 modulates the development of endometrial cancer by binding to and inhibiting microRNA-205-5p function and indirectly increasing PTEN activity. *Int. J. Oncol.* **2020**, *57*, 355–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Xin, W.; Liu, X.; Ding, J.; Zhao, J.; Zhou, Y.; Wu, Q.; Hua, K. Long non-coding RNA derived miR-205-5p modulates human endometrial cancer by targeting PTEN. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 2433–2441. [[PubMed](#)]
35. Liu, B.; Che, Q.; Qiu, H.; Bao, W.; Chen, X.; Lu, W.; Li, B.; Wan, X. Elevated MiR-222-3p promotes proliferation and invasion of endometrial carcinoma via targeting ERα. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Fu, X.; Li, Y.; Alvero, A.; Li, J.; Wu, Q.; Xiao, Q.; Peng, Y.; Hu, Y.; Li, X.; Yan, W.; et al. MicroRNA-222-3p/GNAI2/AKT axis inhibits epithelial ovarian cancer cell growth and associates with good overall survival. *Oncotarget* **2016**, *7*, 80633–80654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chen, W.; Li, X. MiR-222-3p Promotes Cell Proliferation and Inhibits Apoptosis by Targeting PUMA (BBC3) in Non-Small Cell Lung Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2020**, *19*, 1533033820922558. [[CrossRef](#)]
38. Torres, A.; Torres, K.; Wdowiak, P.; Paszkowski, T.; Maciejewski, R. Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecol. Oncol.* **2013**, *130*, 588–594. [[CrossRef](#)]
39. Bignotti, E.; Calza, S.; Tassi, R.A.; Zanotti, L.; Bandiera, E.; Sartori, E.; Odicino, F.E.; Ravaggi, A.; Todeschini, P.; Romani, C. Identification of stably expressed reference small non-coding RNAs for microRNA quantification in high-grade serous ovarian carcinoma tissues. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20*, 2341–2348. [[CrossRef](#)]
40. Egidi, M.G.; Cochetti, G.; Guelfi, G.; Zampini, D.; Diverio, S.; Poli, G.; Mearini, E. Stability Assessment of Candidate Reference Genes in Urine Sediment of Prostate Cancer Patients for miRNA Applications. *Dis. Markers* **2015**, *2015*, 973597. [[CrossRef](#)]
41. Lawlor, H.; Meunier, A.; McDermott, N.; Lynch, T.H.; Marignol, L. Identification of suitable endogenous controls for gene and miRNA expression studies in irradiated prostate cancer cells. *Tumour Biol.* **2015**, *36*, 6019–6028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jurcevic, S.; Olsson, B.; Klinga-Levan, K. Validation of suitable endogenous control genes for quantitative PCR analysis of microRNA gene expression in a rat model of endometrial cancer. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lou, G.; Ma, N.; Xu, Y.; Jiang, L.; Yang, J.; Wang, C.; Jiao, Y.; Gao, X. Differential distribution of U6 (RNU6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microRNA quantification. *Int. J. Mol. Med.* **2015**, *36*, 1400–1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kulinczak, M.; Sromek, M.; Panek, G.; Zakrzewska, K.; Lotocka, R.; Szafron, L.M.; Chechlinska, M.; Siwicki, J.K. Endometrial Cancer-Adjacent Tissues Express Higher Levels of Cancer-Promoting Genes than the Matched Tumors. *Genes* **2022**, *13*, 1611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhang, C.; Zhang, J.; Hao, J.; Shi, Z.; Wang, Y.; Han, L.; Yu, S.; You, Y.; Jiang, T.; Wang, J.; et al. High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Stinson, S.; Lackner, M.R.; Adai, A.T.; Yu, N.; Kim, H.J.; O'Brien, C.; Spoerke, J.; Jhunjhunwala, S.; Boyd, Z.; Januario, T.; et al. TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci. Signal.* **2011**, *4*, ra41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sun, K.; Zeng, J.J.; Wang, W.; Wu, C.T.; Lei, S.T.; Li, G.X. MicroRNA-221 controls CDKN1C/P57 expression in human colorectal carcinoma. *Chin. J. Gastrointest. Surg.* **2011**, *14*, 279–283.

48. Sato, K.; Miyamoto, M.; Takano, M.; Tsuda, H. MicroRNA-21 expression in cancer cells is an independent biomarker of progression-free survival of endometrioid endometrial carcinoma. *Virchows Arch.* **2021**, *479*, 883–891. [[CrossRef](#)]
49. Bouziyane, A.; Lamsisi, M.; Benaguida, H.; Benhessou, M.; El Kerroumi, M.; Ennaji, M.M. Diagnostic Value of MicroRNA 21 in Endometrial Cancer and Benign Lesions and its Differential Expression with Clinicopathological Parameters. *Microrna* **2021**, *10*, 146–152. [[CrossRef](#)]
50. Braun, M.M.; Overbeek-Wager, E.A.; Grumbo, R.J. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Am. Fam. Phys.* **2016**, *93*, 468–474.
51. Kumar, S.; Vijayan, M.; Bhatti, J.S.; Reddy, P.H. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2017**, *146*, 47–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Van Arsdale, A.; Miller, D.T.; Kuo, D.Y.; Isani, S.; Sanchez, L.; Nevadunsky, N.S. Association of obesity with survival in patients with endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* **2019**, *154*, 156–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Purdie, D.M.; Green, A.C. Epidemiology of endometrial cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2001**, *15*, 341–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Donkers, H.; Hirschfeld, M.; Weiß, D.; Erbes, T.; Jaeger, M.; Pijnenborg, J.M.A.; Bekkers, R.; Galaal, K.; ENITEC-Consortium. Usefulness of microRNA detection in the diagnostics of endometrial cancer. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2021**, *100*, 1148–1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cirillo, F.; Catellani, C.; Sartori, C.; Lazzeroni, P.; Amarri, S.; Street, M.E. Obesity, Insulin Resistance, and Colorectal Cancer: Could miRNA Dysregulation Play A Role? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Rodrigues, P.M.; Afonso, M.B.; Simão, A.L.; Islam, T.; Gaspar, M.M.; O'Rourke, C.J.; Lewinska, M.; Andersen, J.B.; Arretxe, E.; Alonso, C.; et al. miR-21-5p promotes NASH-related hepatocarcinogenesis. *Liver Int.* **2023**, *43*, 2256–2274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Shen, L.; Lu, W.; Huang, Y.; He, J.; Wang, Q.; Zheng, X.; Wang, Z. SNORD15B and SNORA5C: Novel Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Colorectal Cancer. *BioMed Res. Int.* **2022**, *2022*, 8260900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Rapti, S.M.; Kontos, C.K.; Papadopoulos, I.N.; Scorilas, A. High miR-96 levels in colorectal adenocarcinoma predict poor prognosis, particularly in patients without distant metastasis at the time of initial diagnosis. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 11815–11824. [[CrossRef](#)]
59. Masè, M.; Grasso, M.; Avogaro, L.; D'Amato, E.; Tessarolo, F.; Graffigna, A.; Denti, M.A.; Ravelli, F. Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41127. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

W przeprowadzonym badaniu dokonano szczegółowej analizy zmian ekspresji trzech mikroRNA: miR-21-5p, miR-205-5p oraz miR-222-3p w tkance endometrium pacjentek z rakiem endometrium. Łącznie w badaniu uczestniczyło 130 kobiet – 111 pacjentek z rozpoznaniem EC (grupa badana) oraz 19 zdrowych kobiet (grupa kontrolna). U wszystkich uczestniczek materiał endometrium został pobrany podczas operacji histerektomii.

W badaniu zaobserwowano istotne zmiany poziomów ekspresji analizowanych mikroRNA w tkance nowotworowej. Szczególnie zauważalna była nadekspresja miR-205-5p w grupie badanej (4009.2 copies/ μ l) w porównaniu do grupy kontrolnej (181.52 copies/ μ l). Z kolei ekspresja miR-222-3p była istotnie obniżona w tkance raka endometrium (69 752 copies/ μ l) względem grupy kontrolnej (112 168 copies/ μ l). W przypadku miR-21-5p, istotna różnica w ekspresji została odnotowana jedynie w podgrupie pacjentek z nowotworem o wysokim stopniu złośliwości histologicznej (G3), gdzie poziom ekspresji wynosił 860 536 copies/ μ l w porównaniu do 938 736 copies/ μ l w grupie kontrolnej.

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano istotną nadekspresję miR-205-5p w grupie pacjentek z rakiem endometrium w porównaniu z grupą kontrolną (FC 1.4; $p < 0.001$). Związek ten został dodatkowo potwierdzony za pomocą analizy regresji logistycznej zarówno jednowymiarowej (OR 7.72; $p = 0.037$), jak i wielowymiarowej (OR 6.05; $p = 0.003$). Poziomy miRNA analizowano także w różnych grupach zróżnicowania histopatologicznego (EIN, G1, G2 i G3). Zaobserwowano istotną nadekspresję miR-205-5p u pacjentek ze zdiagnozowanym EIN ($p = 0.018$), jak i w grupie chorych o wysokim stopniu rozwoju raka endometrium G3 ($p = 0.037$). Odnotowane zmiany mają istotne znaczenie biologiczne, ponieważ wiadomym jest, że miR-205-5p powoduje obniżenie ekspresji *PTEN* i w ten sposób może wpływać na kancerogenezę [77]. Dodatkowo miR-205-5p może również nasilać proliferację komórek nowotworowych i hamować apoptozę poprzez wpływ na *FOXO1*. Lepsze zrozumienie tych mechanizmów może oddziaływać na hamowanie kancerogenezy w EC poprzez zastosowanie inhibitorów miR-205-5p [78].

Xin W. i wsp. również wykazali istotny wzrost ekspresji miR-205-5p w tkankach raka endometrium. Badanie to zostało oparte na materiale tkanki endometrium pobranym od 60 pacjentek (30 stanowiło grupę badawczą, a 30 grupę kontrolną). Grupę kontrolną,

podobnie jak w naszym badaniu, stanowiły kobiety leczone z powodu chorób niezwiązanych z tkanką endometrium, tj. mięśniaków macicy i wypadania narządów miednicy mniejszej i materiał tkankowy pobrano poprzez histerektomię lub łyżeczkowanie jamy macicy [80]. Ponadto Kulinczak i wsp. wykazali nadekspresję miR-205-5p nie tylko w tkance EC, ale również w tkance sąsiadującej z guzem. Badanie to zostało oparte na 49-osobowej grupie badawczej i 25-osobowej grupie kontrolnej [118].

Większość badań sugeruje, że miR-222-3p ma onkogenne działanie na komórki nowotworowe [59, 84, 119]. Wybór i włączenie miR-222-3p do badania wynikało z jego potencjalnego wpływu na rozwój EC [59]. Poprzednie badania pokazują, że miR-222-3p ma onkogenne działanie poprzez regulację *MMP2*, *MMP9* (ang. matrix metalloproteinase 2, 9), *TRPS1* (ang. transcriptional repressor GATA binding 1) i *CDKN1C/p57* (ang. cyclin dependent kinase inhibitor 1C) [59, 120]. Wyniki uzyskane w omawianym badaniu nie potwierdzają onkogennej roli miR-222-3p, sugerując jednocześnie, że mikroRNA to może pełnić funkcję supresora nowotworowego. Stawia to miR-222-3p w nowym świetle i otwiera możliwości dalszych badań nad jego potencjalnym znaczeniem terapeutycznym. Badanie wykazało, że ekspresja miR-222-3p uległa obniżeniu w tkankach raka endometrium w porównaniu z grupą kontrolną (FC 0.94; $p = 0.013$). Natomiast nie wykazano istotnych zmian w poziomach ekspresji miR-222-3p pomiędzy poszczególnymi grupami zróżnicowania histopatologicznego. Interesujące jest jednak to, że poziomy miR-222-3p mają tendencję do zmniejszania się we wszystkich grupach, przy czym najniższą ekspresję zaobserwowano w G3 (grupa kontrola 112 168 copies/ μ l; EIN 74 548 copies/ μ l; G1 83 720 copies/ μ l; G2 63 376 copies/ μ l; G3 43 648 copies/ μ l). Uzyskane wyniki sugerują raczej supresyjną rolę miR-222-3p w rozwoju raka endometrium. Możliwość indukowania wzrostu jego ekspresji może mieć potencjał terapeutyczny – poprzez hamowanie proliferacji komórek nowotworowych w EC.

Inne badanie dotyczące raka endometrium wykazało nadekspresję miR-222-3p w tkankach ER α -ujemnych, podczas gdy ekspresja tego mikroRNA była istotnie niższa w tkankach ER α -dodatnich. W tym badaniu poziom ekspresji miR-222-3p był odwrotnie skorelowany z ekspresją ER α , a poziom ekspresji miR-222-3p był niższy w nowotworach o niższym stopniu złośliwości. Badanie przeprowadzono na grupie 75 pacjentów [59].

Zupełnie inną rolę miR-222-3p wykazali Fu i wsp. w badaniu przeprowadzonym na grupie 74 pacjentek z rakiem jajnika. W tym badaniu miR-222-3p działa jako supresor raka jajnika. Naukowcy odnotowali dłuższe przeżycie u pacjentek z rakiem jajnika z nadekspresją miR-222-3p w porównaniu z grupą o obniżonym poziomie ekspresji miR-222-3p. Badanie to pokazuje, że miR-222-3p może być lepszym wskaźnikiem prognostycznym dla pacjentek z rakiem jajnika [83].

Jako onkogen w raku endometrium uznawany jest miR-21-5p, jest on dobrze opisanym inhibitorem *PTEN* [92]. Badacze wskazali również jego rolę w promowaniu EMT [24], co stanowiło podstawę do włączenia go do badania. W analizie grupy pacjentek z EC nie zaobserwowano jednak istotnych statystycznie różnic w poziomach ekspresji miR-21-5p w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto brak było statystycznie istotnych zmian w poziomach ekspresji miR-21-5p w poszczególnych stopniach zróżnicowania histopatologicznego względem grupy kontrolnej. Warto jednak zauważyć, że w analizie poszczególnych grup histopatologicznych zaobserwowano statystycznie istotny wzrost ekspresji miR-21-5p w zróżnicowaniu histopatologicznym G3 w porównaniu z innymi grupami klasyfikacyjnymi (OR = 0.49; $p = 0.019$).

MiR-21-5p jest jednym z najbardziej konsekwentnie wyrażanych miRNA w niemal wszystkich typach ludzkich nowotworów i może być użytecznym klinicznie biomarkerem i celem terapeutycznym [99, 100, 103], zwiększa się on również w raku endometrium. Sato i wsp. opisali nadekspresję miR-21-5p w komórkach EC i była ona związana z większym postępem choroby i przerzutami do węzłów chłonnych [91].

Bouziyane i wsp. wykazali wysoką skuteczność diagnostyczną miR-21-5p w swoich badaniach, które dotyczyły grupy 71 próbek tkanek raka endometrium, 53 próbek tkanek sąsiadujących oraz 54 przypadków łagodnych zmian [121].

W naszym badaniu nie uzyskaliśmy istotnego wyniku dotyczącego zmian ekspresji miR-21-5p w grupie EIN przy użyciu jednowymiarowej regresji logistycznej, jednak statystycznie istotny wynik zaobserwowano w grupie pacjentek z rakiem endometrium o wysokim stopniu zróżnicowania histopatologicznego G3 ($p = 0.019$). Podobne obserwacje zgłosili Sato i wsp., którzy zbadali związek między ekspresją miR-21-5p a cechami kliniczno-patologicznymi. Badanie przeprowadzono na dużej liczbie pacjentek z rakiem trzonu macicy. Cała grupa liczyła 230 pacjentek, w tym 176 z rakiem

endometroidalnym (G1 = 77, G2 = 51, G3 = 48). Naukowcy wykazali nadekspresję miR-21-5p w komórkach nowotworowych o wyższym zróżnicowaniu histologicznym (G3 vs. G1, G2, $p < 0.0001$) w przypadku raka endometrium, natomiast nie wykazano żadnego związku pomiędzy ekspresją miR-21-5p a wiekiem pacjentki (<60 vs. ≥ 60), jak również pomiędzy stopniami zaawansowania choroby według klasyfikacji FIGO (stopień I/II vs. III/IV) [91].

Choroby współistniejące są znanymi czynnikami ryzyka raka endometrium i zostały opisane w literaturze [91, 113, 122–124]. Uzyskane w badaniu dane zostały przeanalizowane przy użyciu jednowymiarowej regresji logistycznej. W wyniku tej analizy potwierdzono, że wiek pacjentek, BMI i nadciśnienie wpływają na częstość występowania raka endometrium. Grupa badawcza z rakiem endometrium została podzielona według obecności chorób współistniejących lub braku chorób współistniejących. Statystycznie istotny wynik uzyskano w grupie podzielonej według wieku pacjentek ($p = 0.041$). W grupie pacjentek >50 lat poziom miR-205-5p uległ nadekspresji. Natomiast w podgrupach pacjentek z nadciśnieniem, cukrzycą lub niedoczynnością tarczycy nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji analizowanych mikroRNA.

Ze względu na to, że otyłość jest istotnym czynnikiem ryzyka raka endometrium [123], parametr ten został włączony do badania. W wyniku analizy potwierdzono, że BMI jest czynnikiem ryzyka raka endometrium ($p < 0.001$). Zaobserwowano dodatnią korelację między wzrostem BMI a ryzykiem rozwoju raka endometrium (OR 1.23; $p = 0.001$). Ponadto przeanalizowano wpływ BMI na ekspresję badanych miRNA u pacjentek z rakiem endometrium. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w ekspresji miRNA między pacjentkami EC z prawidłowym BMI a tymi z nadwagą lub otyłością. U pacjentek EC z wyższym niż prawidłowy BMI wystąpiła tendencja do obniżonej ekspresji miR-21-5p, chociaż wynik ten nie osiągnął istotności statystycznej. Warto zaznaczyć, że otyłość i zmiany w ekspresji mikroRNA zostały opisane w innych pracach jako czynnik ryzyka nowotworów [125]. Rodrigues i wsp. wykazali również zwiększoną ekspresję miR-21-5p u osób otyłych z hepatokancerogenezą [126].

Początkowo do badania wybrano snRNA U6 i SNORD48 jako potencjalne geny referencyjne. Ze względu na brak stabilności zarówno SNORD48, jak i U6 w analizowanych próbkach, zdecydowano się na prezentację wyników ekspresji miRNA

w postaci bezwzględnych wartości (kopie/ μ l). Takie podejście pozwala na uniknięcie błędów związanych z nieodpowiednią normalizacją i umożliwia wiarygodną ocenę poziomu ekspresji miRNA w badanych grupach.

SNORD48 (Small Nucleolar RNA, C/D Box 48; RNU48) jest jednym z wielu małych jądrowych RNA wyznaczonych jako członkowie rodziny SNORD, których ekspresja jest na stałym poziomie w wielu tkankach. Dlatego też jest często używany jako referencyjny w badaniach nad poziomem ekspresji miRNA obok takich genów jak np. U6, SNORD44. Geny referencyjne badali Torres i wsp., którzy analizowali ich stabilność u pacjentek z rakiem endometrium. Wykazali, że RNU48 był jednym z najbardziej stabilnych genów w EC. Naukowcy wykorzystujący zarówno NormFinder, jak i geNorm (<https://norm.btm.umed.pl>) wskazali, że SNORD48 był optymalny do normalizacji danych qPCR w tkankach EC, był również wyrażany w równym stopniu między próbkami normalnymi i próbkami guza [127]. Podobne obserwacje poczynili Bignotti i wsp., którzy analizowali stabilność SNORD48 w raku jajnika i wykazali, że jest on stabilny między tkankami złośliwymi i prawidłowymi u pacjentek z rakiem jajnika. Poparto wykorzystanie SNORD48 jako najlepszego odniesienia do względnej kwantyfikacji w badaniach ekspresji w raku jajnika [128]. Z kolei inne badania wskazują, że stabilność SNORD48 może być zależna od typu materiału biologicznego i warunków środowiskowych. Egidi i wsp. badali stabilność genu w osadzie moczu u pacjentów z rakiem prostaty i wykazali, że wartość SNORD48 przekroczyła granicę akceptowalności [129]. Lawlor i wsp. badali endogenne SNORD48 u pacjentów napromieniowanych z powodu raka prostaty. Naukowcy wykazali, że poziomy ekspresji były związane z niskim współczynnikiem zmienności po napromieniowaniu (6 Gy). Zauważyli wpływ promieniowania na zmiany w endogennym SNORD48 [130]. W badaniach nad rakiem jelita grubego Shen i wsp. zaobserwowali wzrost ekspresji SNORD48 w tkankach nowotworowych [131], natomiast Rapti i wsp. także użyli SNORD48 jako genu referencyjnego w tym typie nowotworu [132]. Masè i wsp. ocenili stabilność pięciu genów referencyjnych: U6, SNORD48, SNORD44, miR-16 i 5S w tkankach przedsionków serca 18 pacjentów poddanych operacji kardiochirurgicznej z rytmem zatokowym i migotaniem przedsionków. Wszystkie ilościowe metody oceny stabilności dowiodły, że SNORD48 to najlepszy gen referencyjny [133].

Natomiast wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wskazują, że SNORD48 nie jest stabilny, a jego ekspresja różni się znacząco w tkankach EC i w tkankach od zdrowych osób. Badanie to wykazało, że ekspresja SNORD48 uległa obniżeniu w tkance raka endometrium w porównaniu z grupą kontrolną (FC 0.92; $p < 0.001$). Ponadto SNORD48 został zidentyfikowany jako czynnik rozwoju raka endometrium w analizie regresji logistycznej zarówno jednowymiarowej (OR 0.04; $p < 0.001$), jak i wielowymiarowej (OR 0.01; $p = 0.018$). Ponadto analiza grupy badanej podzielonej na stopnie histopatologiczne ujawniła zmiany w ekspresji SNORD48. W grupie G3 stwierdzono nadekspresję SNORD48 w porównaniu z innymi grupami histopatologicznymi, w tym EIN. Zależność była statystycznie istotna ($p < 0,001$). Dodatkowo niestabilność SNORD48 potwierdzono za pomocą narzędzia NormiRazor, co podważa zasadność jego zastosowania jako genu referencyjnego w badaniach ekspresji miRNA w raku endometrium.

Podsumowując, badanie sugeruje, że SNORD48 może wpływać na rozwój raka endometrium. Jednak konieczne są dalsze badania, aby lepiej zrozumieć jego rolę w rozwoju tego nowotworu.

Drugim analizowanym RNA, planowanym jako gen referencyjny, był U6 (RNU6-1). U6 jest często stosowany jako endogenny gen kontrolny w badaniach ekspresji miRNA, w tym również w raku endometrium. Jurcevic i wsp., badając endogenne geny kontrolne w szczyrim modelu raka endometrium, wykryli istotne różnice w ekspresji U6 między próbkami złośliwymi i niezłośliwymi ($p < 0.05$). Jednocześnie przy użyciu algorytmu NormFinder stwierdzono, że zastosowanie zestawu pięciu najbardziej stabilnych genów, w tym U6, zapewniło najlepszą normalizację [134]. Z kolei badania przeprowadzone przez Lou i wsp. wykazały, że U6 może być niestabilny w różnych typach tkanek nowotworowych. Badanie to skupiło się na tkankach raka piersi, w których ekspresja U6 była wyższa w porównaniu ze zdrową tkanką. Wysokie poziomy ekspresji U6 były wyższe w tkankach raka wątroby i wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych w porównaniu z sąsiadującymi normalnymi tkankami. Naukowcy wykazali, że ekspresja i dystrybucja U6 wykazują dużą zmienność wśród kilku typów komórek ludzkich [135].

W niniejszym badaniu nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w ekspresji U6 między grupą badaną i kontrolną. Jednakże szczegółowa analiza poszczególnych grup histologicznych ujawniła nieoczekiwane zmiany ekspresji U6, co wskazuje na jego

niestabilność. Poziom ekspresji tego snRNA zmniejszył się we wczesnych fazach (EIN, G1 i G2), podczas gdy wzrósł w G3 w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.001$). Ponadto oceniliśmy stabilność U6 w tkance raka endometrium za pomocą narzędzia NormiRazor. Analiza potwierdziła niską stabilność tego snRNA. Dlatego U6 nie mógł zostać wykorzystany jako gen referencyjny. Wyjaśnienie zmian ekspresji U6 w różnych stopniach histologicznych wymaga dalszych badań.

5.3. Publikacja oryginalna: „MiR-205-5p and MiR-222-3p as Potential Biomarkers of Endometrial Cancer”

Article

MiR-205-5p and MiR-222-3p as Potential Biomarkers of Endometrial Cancer

Anna Bogaczyk ^{1,†}, Natalia Potocka ^{2,†}, Sylwia Paszek ³, Marzena Skrzypa ², Alina Zuchowska ³, Michał Kośny ⁴, Marta Kluz-Barłowska ⁵, Andrzej Wróbel ⁶, Jan Wróbel ⁷, Izabela Zawlik ^{2,3,*} and Tomasz Kluz ^{1,3,‡}

¹ Department of Gynecology, Gynecology Oncology and Obstetrics, Fryderyk Chopin University Hospital, 35-055 Rzeszów, Poland; annabogaczyk@interia.pl (A.B.); jtkluz@interia.pl (T.K.)

² Laboratory of Molecular Biology, Centre for Innovative Research in Medical and Natural Sciences, Faculty of Medicine, Collegium Medicum, University of Rzeszów, 35-959 Rzeszów, Poland; npotocka@ur.edu.pl (N.P.); mskrzypa@ur.edu.pl (M.S.)

³ Faculty of Medicine, Collegium Medicum, University of Rzeszów, 35-959 Rzeszów, Poland; spaszek@ur.edu.pl (S.P.); aowskiak@ur.edu.pl (A.Z.)

⁴ Department of Hematology, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland; mkosny1@gmail.com

⁵ Department of Pathology, Fryderyk Chopin University Hospital, 35-055 Rzeszów, Poland; marta.kluz@interia.pl

⁶ Second Department of Gynecology, Medical University of Lublin, Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin, Poland; wrobelandrzej@yahoo.com

⁷ Medical Faculty, Medical University of Lublin, 20-090 Lublin, Poland; wrobeljan@onet.eu

* Correspondence: izazawlik@gmail.com

† These authors contributed equally to this manuscript.

‡ These authors also contributed equally to this manuscript.

Abstract: Endometrial cancer is the fourth most common cancer in women in Europe. Its carcinogenesis is a complex process and requires further research. In our study, we focus on finding new and easy-to-diagnose markers for detecting endometrial cancer. For this purpose, we compared the levels of miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p in endometrial cancer tissues with the levels of these miRs in the serum of patients using the dPCR method. Our study is preliminary and consists of comparing the changes in miRNA expression in serum to the changes in miRNA in tissue of patients with endometrial cancer. The study included 18 patients with EC and 19 patients undergoing surgery for pelvic organ prolapse or uterine fibroids as a control group without neoplastic lesions. Endometrial tissue and serum were collected from all patients. The analyses showed an increased expression of miR-205-5p in endometrial cancer tissue and decreased expression of miR-222-3p in tissue and serum samples. These results suggest that miR-205-5p and miR-222-3p may be potential endometrial cancer biomarkers. Only miR-222-3p confirmed its decreased expression in serum, making it a potential and easily accessible marker in the diagnosis of endometrial cancer. This pilot study requires further investigation in a larger group of patients. Its advantages include the possibility of a comparison between miRNA expression in tissue and serum, as well as conducting the study using dPCR.

Keywords: microRNA; miR-21-5p; miR-205-5p; miR-222-3p; endometrium cancer; EC; dPCR; digitalPCR; biomarkers

1. Introduction

Endometrial cancer is the fourth most common female cancer in Europe. Its incidence is 12.9–20.2 per 100,000 women and its mortality is 2.0–3.7 per 100,000 women [1,2]. The



Academic Editor: Evgeny Imyanitov

Received: 17 February 2025

Revised: 10 March 2025

Accepted: 12 March 2025

Published: 14 March 2025

Citation: Bogaczyk, A.; Potocka, N.; Paszek, S.; Skrzypa, M.; Zuchowska, A.; Kośny, M.; Kluz-Barłowska, M.; Wróbel, A.; Wróbel, J.; Zawlik, I.; et al. MiR-205-5p and MiR-222-3p as Potential Biomarkers of Endometrial Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 2615. <https://doi.org/10.3390/ijms26062615>

Copyright © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

most commonly used divisions of EC are morphological and molecular profiling. In the morphological division, according to Bokhman, EC is divided into type I, endometrioid carcinoma, which is associated with excess estrogens. It develops as a result of endometrial hyperplasia. This type occurs more often and has a good prognosis. The second type, non-endometrioid, is not associated with estrogen stimulation and has a poor prognosis [3]. A newer division is molecular profiling, which was introduced in 2013 by The Cancer Genome Atlas (TCGA). According to this division, EC is divided into four molecular subgroups:

- POLEmut group, which is characterized by POLE mutation, and accounts for 7%;
- Microsatellite instability (MSI group), resulting from MMR-deficient repair deficiency. It accounts for 28% and has a relatively favourable prognosis. The most common mutations in the MSI group include mutations in the ARID5B, PTEN, and phosphatidylinositol-3 kinase families, including PIK3CA and PIK3R1;
- High somatic copy number changes (serous group, driven by a TP53 mutation, also called the p53abn group), constitute 26%;
- A low copy number group without a specific driver mutation (NSMP group), constitutes 39% [4].

POLE-mutated tumours have a good prognosis, while the high-copy group driven by the TP53 mutation has a poor prognosis. The prognosis of mismatch repair-deficient tumours and those without a defined molecular profile (NSMP) is relatively favourable [4–6]. Molecular staging of endometrial cancer is useful because of its prognostic value and potential to predict the benefits of adjuvant therapy [2].

The stage of endometrial cancer has been assessed so far in surgical and pathological stages based on the FIGO classification from 2009 (Table 1) [7]. Due to the introduction of the new molecular classification, the ESGO/ESTRO/ESP guidelines were developed, which added new subclassifications to the previous grading system, and introduced the new FIGO 2023 classification (Table 2) [8].

Table 1. FIGO 2009 classification of endometrial cancer.

FIGO 2009	
Stage I	Confirmed to the corpus uteri
IA	No or less than half myometrial invasion
IB	Invasion equal to more than half of the myometrial
IC	
Stage II	Invasion of cervical stroma without extrauterine extension
IIA	
IIB	
IIC	
Stage III	Local and/or regional spread of the tumour
IIIA	Tumour invades the serosa of the corpus uteri and/or adnexa
IIIB	Vaginal involvement and/or parametrial involvement
IIC	Metastases to pelvic and/or para-aortic lymph nodes
	IIC1 Positive pelvic nodes
	IIC2 Positive paraaortic nodes with or without positive pelvic lymph nodes
Stage IV	Tumour invades bladder and/or bowel mucosa, and/or distant metastases

Table 2. New FIGO 2023 classification of endometrial cancer.

FIGO 2023	
Stage I	Limited to the uterine body and ovary
IA	Tumour occurring only in the endometrium OR non-aggressive histological type (low-grade EC, with invasion of less than half of the uterine muscle, with negative LVSI or with focal LVSI involvement OR tumour with good prognosis
	IA1 Non-aggressive histological type occurring in a polyp in the endometrium OR confined to the uterine mucosa
	IA2 Non-aggressive histological types involving less than half of the myometrium with negative or positive focal LVSI
	IA3 Low-grade EC limited to the uterus and ovaries
IB	Non-aggressive types of EC with invasion of half or most of the myometrium and with or without focal LVSI
IC	Aggressive histological types occurring in polyps or confined to the uterine mucosa
Stage II	Invasion of cervical stroma without extrauterine extension OR with substantial LVSI OR aggressive histological types with myometrial invasion
IIA	Non-aggressive histological types of EC involving the stroma of the cervix
IIB	Non-aggressive histological types including substantial LVSI
IIC	Aggressive histological types with any myometrial involvement
Stage III	Local and/or regional EC infiltration of any histological subtype
IIIA	Invasion of uterine serosa, adnexa, or both by direct extension or metastasis
	IIIA1 Invasion of ovary or fallopian tube (outside of grade IA3 criteria) IIIA2 Invasion of uterine serosa or extension through uterine serosa
IIIB	Invaginal and/or parametrial or pelvic peritoneal EC
	IIIB1 Invaginal and/or parametrial EC IIIB2 Metastases to pelvic peritoneum
IIIC	Metastasis to the pelvic or para-aortic lymph nodes or both
	IIIC1 Metastasis to the pelvic lymph nodes IIIC1i Micrometastasis IIIC1ii Macrometastasis IIIC2 Metastases to para-aortic lymph nodes up to renal vessels, with or without metastases to pelvic lymph nodes IIIC2i Micrometastasis IIIC2ii Macrometastasis
Stage IV	Tumour invasion of the bladder mucosa and/or intestinal mucosa and/or distant metastases
	IVA Invasion of the bladder mucosa and/or the intestinal/bowel mucosa
	IVB Abdominal peritoneal metastasis beyond the pelvis
	IVC Distant metastasis, including metastasis to any extra- or intra-abdominal lymph nodes above the renal vessels, lungs, liver, brain, or bone

Despite the knowledge on various genetic mutations in endometrial cancer (microsatellite instability and mutations in PTEN, K-ras, beta-catenin, p53, HER-2/neu, p16 and E-cadherin genes) and distinguishing different genetic types of this cancer, we still lack knowledge of the regulatory mechanisms occurring in this cancer [9–11]. Therefore, in our study, we focus on miRNA and changes in its expression both in EC tissues and serum in patients with endometrial cancer.

MiRNAs are non-coding, single-stranded, small RNA molecules with a length of approximately 19–25 nucleotides. They were discovered in 1993 and described by Lee et al. as the first to describe small RNA molecules encoded by the gene regulating the expression of the *lin-14* protein in *Caenorhabditis elegans* [12].

MiRNAs are formed from primary miRNAs (pri-miRNAs) in the cell nucleus with the participation of RNA polymerase II, the Drosha protein complex and DGCR8. Subsequently, in the cytoplasm, precursor miRNAs (pre-miRNAs) are cleaved by Dicer to generate mature miRNAs [13]. MiRNAs are remarkably stable in various body fluids, including saliva [14], urine [15], breast milk [16,17], and blood [18]. To maintain stability outside the cell, they must be protected against degradation and the action of endonucleases. MiRNAs are packaged into exosomes or microvesicles. Alternatively, they can be attached to high-density lipoproteins (HDL) or bound by the AGO2 protein outside the vesicles. These protective mechanisms ensure the stability of extracellular miRNAs [19–21].

MiRNAs have been extensively studied as potential biomarkers in the serum of patients with endometrial cancer. Below, some selected examples have been discussed.

Tan et al. reported that hsa-miR-155 might be a good diagnostic marker. Its serum level was increased in patients with endometrial cancer and increased with the stage of EC, as well as with lymph node metastasis [22].

Several miRNAs, such as miR-15a-5p, miR-106b-5p, and miR-107, were significantly upregulated in exosomes isolated from the plasma of EC patients compared to healthy individuals. Notably, plasma-derived miR-15a-5p appears to be a promising and effective diagnostic biomarker for the early detection of endometrial cancer, particularly in differentiating stage I patients from healthy controls [23].

Additionally, serum levels of miR-204-5p were found to be decreased in EC patients compared to those with benign lesions. This reduction was particularly pronounced in patients with lymph node metastases, highlighting its potential as an early diagnostic biomarker [18].

MiR-27a-5p, another miRNA of interest, was significantly increased in serum exosomes of patients with polycystic ovary syndrome (PCOS), and may play a role in the development of EC in this patient population [24].

Similarly, miR-887-5p expression was elevated in the serum of EC patients compared to healthy individuals, indicating its potential diagnostic value [25].

Kumari et al. observed the dysregulated expression of several miRNAs in the serum of EC patients: miR-16, miR-99b, miR-125, and miR-145 were downregulated, while miR-143 was upregulated [26].

In another study, four miRNAs, miR-222, miR-223, miR-186, and miR-204, were significantly increased in the serum of EC patients compared to controls, further supporting their potential as biomarkers for this cancer [27].

Ghazala et al. studied miR-27a and miR-150-5p in the serum of EC patients and both miRNAs may be promising EC biomarkers [28].

Also, miR-203 expression levels were higher in the serum of EC patients, but its levels were not correlated with promoter methylation status [29].

The miRNAs used in our study (miR-21-5p, miR-205-5p and miR-222-3p) have been studied in various other cancers and are involved in carcinogenesis, which is why they were selected for testing in EC.

MiR-21-5p has been extensively studied in various cancers, for example, in colorectal cancer where it showed strong expression in serum samples from patients, while its levels were significantly downregulated in postoperative patients. Its high expression was correlated with TNM testing and lymph node metastasis [30]. MiR-21-5p has also been utilized as a biomarker for the detection and prognosis of pancreatic cancer [31], and non-small

cell lung cancer (NSCLC) [32]. High levels of miR-21-5p in serum were also observed in oropharyngeal cancer associated with Epstein–Barr virus infection [33].

In breast cancer, however, miR-21-5p showed reduced expression and limited diagnostic value for early-stage disease. Nonetheless, its reduced expression may serve as a biomarker in the diagnosis of breast cancer metastases [34].

MiR-21 is one of the most consistently expressed miRNAs in almost all types of human cancer [35]. Its expression level is also altered in EC cells, as shown by Sato et al. They assessed miR-21 expression in EC tumour cells and stroma separately. Upregulation of miR-21 in EC cells was significantly associated with higher histological grade and lymph node metastasis. It was also significantly associated with poor progression-free survival [36]. Bouziyane et al. also confirmed the diagnostic value of miR-21 in EC tissue. The investigators suggest that tests with blood, serum, or urine should be performed [37].

The next miR under investigation was miR-205-5p, where its levels in serum were significantly higher in patients with non-small cell lung cancer compared to controls [38]. Jiang et al. observed similar changes in miR-205-5p levels in non-small cell lung cancer [39]. MiR-205-5p was also tested in serum to differentiate benign from malignant thyroid tumours. Serum levels were the highest in patients with malignant thyroid tumours, followed by those with benign tumours, and were the lowest in the control group. Additionally, its expression correlated with tumour size, stage, lymph node metastases, tumour capsule invasion, and the *BRAF* mutation status were reported. A positive correlation between miR-205-5p expression and TSHR mRNA levels was identified in thyroid cancer patients [40].

MiR-205 expression was also examined in EC tissue. Karaayvaz et al. confirmed increased miR-205 expression in EC cells. The increased expression was not associated with disease stage or tumour type. The investigators found that higher miR-205 expression was significantly associated with overall shorter patient survival [41]. Jin et al. also showed that miR-205 played an important role in the migration and invasion of endometrial cancer [42]. Other researchers also confirmed the oncogenic effect of miR-205 on EC cells. However, in all cases the material studied was endometrial cancer tissue [43,44]. MiR-205 expression also plays a role in the treatment of endometrial cancer. The researchers showed that silencing of miR-205-5p increased the sensitivity of EC cells to paclitaxel (PTX), which resulted in reduced cell proliferation and increased apoptosis. In contrast, increased expression of miR-205-5p increased PTX resistance and contributed to EC cell tumourigenesis [45].

The third miR that took part in the study was miR-222-3p. It was detected in serum exosomes from ovarian cancer patients, and its levels were associated with epithelial ovarian cancer (EOC). Exosomal miR-222-3p is an effective regulator of tumour-promoting M2 macrophage polarization [46].

In another study, exosomal miR-222-3p was tested in patients with papillary thyroid cancer and was significantly increased in patients with lymph node metastasis [47].

This miR has also been studied in EC. Liu et al. studied miR-222 in women with endometrial cancer and confirmed its effect on tumourigenesis. Only EC tissue was used in this study [48].

Furthermore, serum expression levels of four miRNAs, including miR-21-5p and miR-222-3p, were investigated in NSCLC patients and demonstrated good diagnostic value, particularly in early-stage disease [49].

Many studies have been conducted to identify various miRNAs associated with EC cells. However, further understanding of the factors regulating carcinogenesis is needed to identify markers that facilitate their detection and to discover targets that could serve as therapeutic targets.

In this study, we focused on comparing the levels of three miRNAs (miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p) in endometrial cancer tissues with the levels of the same

miRNAs in the serum of patients using dPCR. We believe that the use of serum testing in potential endometrial cancer patients is a better method than tissue testing, due to the ease of obtaining the material for testing and a lower risk of complications.

2. Results

The clinical characteristics and lifestyle data of patients with endometrial cancer are presented in Table 3. Due to the relatively small size of the control group and the presence of non-normal data distributions, the Mann–Whitney U test was used to analyze quantitative variables. No statistical significance was obtained for the following factors: age of first and last menstrual period, births, BMI, and hypertension. However, statistically significant differences were identified for patient age, diabetes mellitus (DM), and hypothyroidism. Table 4 presents the patients' clinicopathological data, including numerical and percentage distribution depending on the stage (FIGO), and differentiation.

Table 3. Characteristics and clinical data of the study and control groups.

Characteristic	Overall, n = 37 ¹	Study Group, n = 18 ¹	Control Group, n = 19 ¹	p-Value ²
Age	53 (42–92)	60 (48–82)	48 (42–92)	0.002
First period	14 (11–17)	13 (11–16)	14 (11–17)	0.2
Last menstrual period	50 (40–61)	50 (40–58)	48 (42–61)	0.2
Births	2 (0–4)	2 (0–4)	2 (0–3)	0.6
BMI	26.4 (20.08–50.2)	27.25 (22.1–50.2)	25.39 (20.08–34.19)	0.058
Hypertension				0.2
No	27 (73%)	11 (61%)	16 (84%)	
Yes	10 (27%)	7 (39%)	3 (16%)	
DM				0.046
No	33 (89%)	14 (78%)	19 (100%)	
Yes	4 (11%)	4 (22%)	0 (0%)	
Hypothyroidism				0.020
No	32 (86%)	13 (72%)	19 (100%)	
Yes	5 (14%)	5 (28%)	0 (0%)	

¹ Median (Range); ² U Mann–Whitney Test, Chi 2test with Fisher's exact test depending on variable. Statistical significance was demonstrated in the following cases: patient's age, diabetes (DM), and hypothyroidism. The p-values for statistically significant results are in bold.

Table 4. Clinicopathological data of the study group including patients with EC.

Degree of Differentiation:	Number of Patients Examined:	Percentage of Female Patients Surveyed
G1	0	0
G2	12	67%
G3	6	33%
FIGO stage:		
FIGO I	14	78%
FIGO II	2	11%
FIGO III	2	11%

The absolute expression of miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p was measured in endometrial cancer tissue and compared with absolute expression research miRNAs in the control group. Statistically significant differences were observed for miR-205-5p ($p < 0.001$) and miR-222-3p ($p = 0.003$), as shown in Table 5. Reference genes U6 and SNORD48 were included in the study but were found to be unstable, and, therefore, not included in the analyses, as described in our 2024 paper [50].

Table 5. Absolute expression of miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p in the tissue of the endometrial cancer study group and in the control group.

Absolute Expression (Copies/ μ L)	Study Group, N = 18 ¹	Control Group, N = 19 ¹	<i>p</i> -Value ²
miR-21-5p	655,024 (161,648–2,061,856)	938,736 (118,688–3,424,496)	0.3
miR-205-5p	10,164 (381.52–113,472)	181.52 (0.0–7336.8)	<0.001
miR-222-3p	50,132 (10,192–145,704)	112,168 (35,104–421,912)	0.003

¹ Median (Range); ² U Mann–Whitney Test. Statistically significant results were obtained for the expression of miR-205-5p ($p < 0.001$), and miR-222-3p ($p = 0.003$). The absolute expression of the tested miRNAs is presented in copies per μ L. The *p*-values for statistically significant results are in bold.

The data were further processed using logarithmic transformation to normalize the distribution. Mean logarithmic values were used to calculate fold change (FC). In addition, both univariate and multivariate random regression analyses were performed.

Table 6 presents the expression levels of microRNAs in the studied endometrial cancer tissue and control group as logarithmic data. The statistical analyses indicated that, amongst the three microRNAs that were examined, microRNA-205-5p exhibited significant upregulation ($p < 0.001$), whereas microRNA-222-3p demonstrated significant downregulation ($p < 0.001$). Following the application of the Benjamini–Hochberg correction, the disparities in the concentration of miRNAs between the study and control groups for miR-205-5 persisted at a significance level of $p < 0.001$, while for miR-222-3p, the adjusted *p*-value was 0.002. However, the expression of miR-21-5p remained non-significant.

Table 6. Expression of miRNAs in endometrial cancer tissue (N = 18).

miRNA	Study Group		Control Group		Fold Change	\log_2 FC	<i>p</i> -Value ¹	Benjamini–Hochberg Adjusted <i>p</i> Value ²
	Mean	SD	Mean	SD				
miR-21-5p	5.79	0.35	5.92	0.49	0.98	−0.03	0.36	0.576
miR-205-5p	3.93	0.7	2.68	0.71	1.47	0.55	<0.001	<0.001
miR-222-3p	4.63	0.36	5.03	0.32	0.92	−0.12	<0.001	0.002

¹ The comparisons were performed using independent *t*-test and Mann–Whitney U-test depending on the distribution. The expression level of miRNAs in the endometrial cancer tissue studied was presented as logarithmic data. MiR-205-5p was shown to be upregulated, while miR-222-3p was downregulated; ² The Benjamini–Hochberg correction was used to account for multiple comparisons. The *p*-values for statistically significant results are in bold.

Subsequently, the absolute levels of miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p in serum were analyzed in the aforementioned group of patients with endometrial cancer and compared to their absolute expression in the control group. A statistically significant difference was observed for miR-222-3p expression ($p = 0.019$). The external control, cel-

miR-39-3p, exhibited comparable levels in both groups. Table 7 presents the absolute serum expression of the analyzed miRNAs in copies per μL .

Table 7. Absolute expression of miR-21-5p, miR-205-5p, and miR-222-3p in serum of the study group with endometrial cancer and the control group.

Absolute Expression (Copies/ μL)	Study Group, N = 18 ¹	Control Group, N = 19 ¹	p-Value ²
cel-miR-39-3p	16,200 (2825.6–22,320)	17,664 (4682.4–49,608)	0.408
miR-21-5p	36,768 (4920.8–231,216)	38,832 (5545.6–157,976)	0.599
miR-205-5p	203.88 (17.9–3722)	260.8 (26.66–492.8)	0.799
miR-222-3p	964.2 (74.86–7570)	2366 (301–10,114)	0.019

¹ Median (Range); ² U Mann–Whitney Test. Statistically significant results were obtained for the expression of miR-222-3p ($p = 0.019$). The absolute expression of the tested miRNAs are presented in copies per μL . The p -values for statistically significant results are in bold.

The raw data obtained from the dPCR for serum have been processed in the same way as the data obtained for tissue. Univariate and multivariate random regression analyses were carried out, incorporating logarithmic transformation to normalize the data distribution. The expression levels of microRNAs in the serum of patients with endometrial cancer and the control group, presented as logarithmic values, are shown in Table 8. Among the three analyzed miRNAs, only miR-222-3p exhibited statistically significant downregulation ($p = 0.011$). After implementing a Benjamini–Hochberg correction, an adjusted p -value of 0.022 was obtained, thus confirming the observed difference between the study and control groups. In contrast, no statistically significant differences were found for miR-21-5p and miR-205-5p.

Table 8. Serum miRNA expression in patients with endometrial cancer (N = 18).

miRNA	Study Group		Control Group		Fold Change	log ₂ FC	p-Value ¹	Benjamini–Hochberg Adjusted p Value ²
	Mean	SD	Mean	SD				
miR-39-3p	4.14	0.21	4.20	0.28	0.99	−0.02	0.403	0.576
miR-21-5p	4.54	0.50	4.60	0.34	0.99	−0.02	0.664	0.778
miR-205-5p	2.35	0.67	2.28	0.36	1.03	0.04	0.700	0.778
miR-222-3p	3.00	0.54	3.39	0.32	0.89	−0.18	0.011	0.022

¹ Comparisons were performed using independent t -test and Mann–Whitney U test depending on the distribution. The expression level of miRNAs in the tested endometrial cancer serum is presented as logarithmic data. MiR-222-3p was shown to be downregulated; ² Benjamini–Hochberg correction was used to account for multiple comparisons. The p -values for statistically significant results are in bold.

We performed a univariate logistic regression analysis of clinical variables and miRNA expression levels to investigate potential factors associated with the occurrence of EC.

Age is regarded as an important clinical factor associated with the development of EC (OR 1.09, 95%CI: 1.01–1.17, $p = 0.029$). BMI showed borderline significance. Among the tested miRNAs, two showed significant associations with endometrial cancer in tissue: miR-205-5p (OR 10.91, 95%CI: 2.27–52.48 $p = 0.003$) and miR-222-3p (OR 0.02, 95%CI: 0.002–0.35, $p = 0.006$). In serum, statistical significance was obtained for miR-222-3p (OR 0.12, 95%CI: 0.02–0.74, $p = 0.022$) (Table 9).

Table 9. Univariate logistic regression analysis of factors and miRNAs affecting endometrial cancer (N = 18).

Endometrial Cancer	OR (Odds Ratio)	Lower 95% Confidence Interval	Upper 95% Confidence Interval	p-Value
Age	1.09	1.01	1.17	0.029
First period	0.73	0.47	1.12	0.150
Last menstrual period	1.08	0.94	1.25	0.285
Number of Births	1.28	0.66	2.46	0.465
At least one birth	1.79	0.36	8.90	0.479
Number of Caesarean sections (CS)	0.58	0.18	1.86	0.362
At least one CS	0.75	0.14	3.94	0.734
At least one miscarriage	1.08	0.25	4.60	0.920
BMI	1.14	0.99	1.30	0.060
Good BMI (20–25)	0.22	0.05	1.03	0.054
Overweight (BMI => 25)	4.50	0.97	20.83	0.054
Obesity (BMI >= 30)	2.67	0.55	12.88	0.222
Hypertension	3.39	0.72	16.07	0.124
Tissue miR-21-5p (log)	0.47	0.10	2.27	0.349
Tissue miR-205-5p (log)	10.91	2.27	52.48	0.003
Tissue miR-222-3p	0.02	0.002	0.35	0.006
Serum miR-39-9p	0.39	0.03	5.94	0.495
Serum miR-21-5p	0.70	0.15	3.36	0.654
Serum miR-205-5p	1.29	0.37	4.50	0.691
Serum miR-222-3p	0.12	0.02	0.74	0.022

Age was only important clinical factors associated with the development of EC. Among the miRNAs examined in tissue, two showed a significant association with endometrial cancer: tissue miR-205-5p and tissue miR-222-3p. Among the serum miRNAs examined, only serum miR-222-3p showed a significant association with endometrial cancer. The p-values for statistically significant results are in bold.

We have presented below the results of paired *t*-test analysis for tissue and serum in the study and control groups. Figure 1 shows logarithmic data illustrating the differences in expression levels of the tested miRNAs between tissue and serum in the study group compared to the control group.

The correlation between miRNA concentration in serum and tissue was established using Spearman's correlation test, but statistical significance was not obtained (Table 10).

Table 10. Correlation between serum and tissue miRNA concentration—Spearman correlation test.

miRNA	N	R Coefficient	p-Value
miR-21-5p	37	−0.23	0.176
miR-205-5p	37	0.02	0.896
miR-222-3p	37	−0.02	0.885

The table shows the correlation between miRNA concentration in serum and tissue using Spearman test. Statistical significance was not achieved.

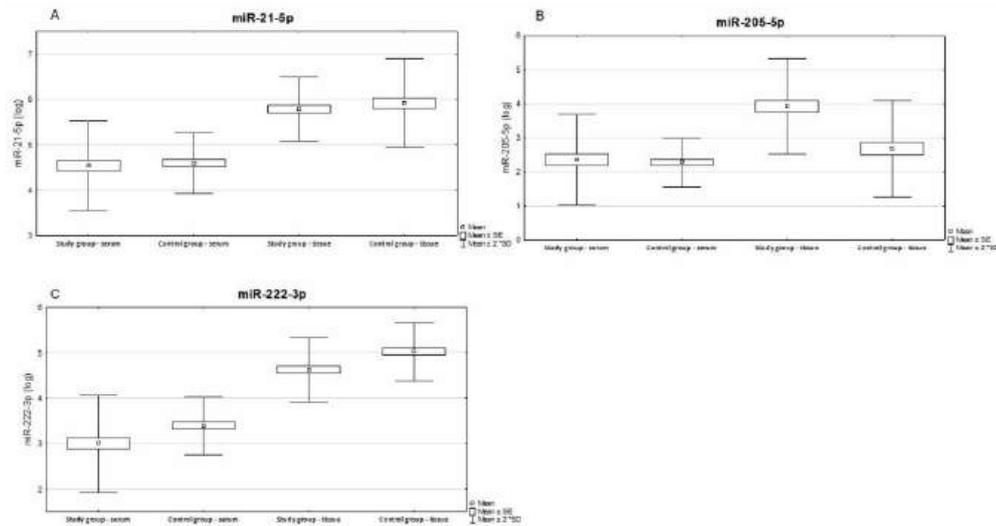


Figure 1. Illustrates the differences in expression levels between tissue and serum in the study and control groups. Results of paired serum-tissue *t*-tests for the control and study groups. Results expression miR-21-5p (A), miR-205-5p (B), miR-222-3p (C).

We also performed multivariate logistic regression for the occurrence of endometrial cancer, but the results were not statistically significant (Table 11).

Table 11. Multivariate logistic regression analysis of miRNAs associated with endometrial cancer (N = 18).

Endometrial Cancer	OR (Odds Ratio)	Lower 95% Confidence Interval	Upper 95% Confidence Interval	<i>p</i> -Value
Age	1.08	0.94	1.24	0.301
Tissue miR-205-5p	24.3	0.5	1170.34	0.107
Tissue miR-222-3p	0.002	0.000001	3.07	0.095
Serum miR-222-3p	0.002	0.000000	18.91	0.179

The obtained results showed no statistical significance.

Regarding the stage of advancement, 16% of patients had FIGO => 2. We performed a complete set of logistic regressions for FIGO < 2, or => 2—none of the results reached statistical significance. Therefore, we evaluated the differences in concentrations in the given groups, in serum miR-205-5p was initially statistically significant ($p = 0.017$), but lost significance with the Benjamini–Hochberg correction for multiple comparisons ($p = 0.17$) (Table 12).

Among patients with endometrial cancer, 33% were patients with the G3 differentiation stage. We evaluated the differences in concentrations in the G3 and non-G3 groups.

No statistically significant differences in miRNA expression between the groups were observed in tissue. However, in serum, the concentration of miR-205-5p was initially significant ($p = 0.024$) but lost significance after applying the Benjamini–Hochberg correction ($p = 0.12$) (Table 13).

Table 12. Evaluation of differences in concentrations in FIGO < 2 and FIGO => 2 groups in patients with endometrial cancer.

	FIGO < 2 (N = 14)		FIGO => 2 (N = 4)		p-Value	Benjamini–Hochberg Adjusted p Value ³
	Mean	SD	Mean	SD		
Serum miR-39-3p ¹	4.11	0.23	4.24	0.09	0.222	0.7
Serum miR-21-5p ²	4.62	0.53	4.25	0.23	0.203	0.444
Tissue miR-21-5p ²	5.73	0.34	6	0.36	0.189	0.444
Tissue miR-205-5p ²	3.94	0.68	3.87	0.9	0.857	0.857
Tissue miR-222-3p ²	4.64	0.38	4.6	0.33	0.843	0.857
Serum miR-205-5p ²	2.54	0.62	1.68	0.32	0.017	0.17
Serum miR-222-3p ²	3.05	0.6	2.82	0.2	0.464	0.7

Assessment of differences in miRNA concentrations in two groups depending on FIGO < 2 and FIGO => 2. Serum miR-205-5p was initially statistically significant, but lost its significance after the Benjamini–Hochberg correction. ¹ U Mann–Whitney test; ² T-test; ³ Benjamini–Hochberg method. The p-value for a statistically significant result is in bold.

Table 13. Evaluation of concentration differences in G3 and non-G3 groups in patients with endometrial cancer.

	Non G3 (N = 12)		G3 (N = 6)		p-Value	Benjamini–Hochberg Adjusted p Value ³
	Mean	SD	Mean	SD		
Serum miR-39-3p ¹	4.12	0.25	4.19	0.42	0.543	0.776
Tissue miR-21-5p ²	5.78	0.36	5.80	0.37	0.894	0.99
Tissue miR-205-5p ²	3.82	0.78	4.13	0.53	0.389	0.776
Tissue miR-222-3p ²	4.71	0.38	4.46	0.24	0.152	0.507
Serum miR-21-5p ²	4.53	0.55	4.55	0.42	0.935	0.99
Serum miR-205-5p ²	2.59	0.66	1.86	0.38	0.024	0.12
Serum miR-222-3p ²	2.93	0.56	3.15	0.5	0.441	0.776

Evaluation of different concentrations in G3 and non-G3 groups. Serum miR-205-5p concentration was initially statistically significant, but the result lost significance after Benjamin Hochberg correction. ¹ U Mann–Whitney test; ² T-test; ³ The Benjamini–Hochberg correction was used to account for multiple comparisons. The p-value for a statistically significant result is in bold.

3. Discussion

Our study is preliminary as it is conducted on a small group of patients and requires the study group to be expanded. The major advantage is the use of dPCR measurements, and the application of this method distinguishes our study from other similar studies cited

below. An important aspect of our study is that we used free-circulating microRNA rather than the isolated one from exosomes. Serum is a material that can be collected from the patient in a minimally invasive manner, and the direct isolation of microRNA is easy to perform in routine studies. However, the difficulty is that we cannot directly compare the results of free-circulating miRNA expression with those studies where the isolated miRNA was from exosomes.

When examining endometrial cancer tissue, we obtained statistically significant results for absolute miR-205-5p expression ($p < 0.001$), which did not change after Benjamini–Hochberg correction.

These findings align with previous studies, such as Karaayvaz et al., who highlighted the prognostic potential of miR-205 in endometrial cancer and demonstrated its upregulation [41]. Lu et al. and others also reported similar findings, underscoring the oncogenic role of this miRNA in endometrial cancer. Lu et al. also detected upregulation of miR-205-5p [42–45]. However, in our study, miR-205-5p expression was not statistically significant in serum. This discrepancy may result in differences in miRNA stability or regulatory mechanisms between tissue and serum. In contrast to our results, its established role had been previously described in other cancers, such as ovarian cancer, non-small cell lung cancer or breast cancer [38,51,52]. The researchers investigated the changes in miR-205 expression in serum of patients with non-small cell lung cancer, and in serum of patients with breast cancer, only in the case of ovarian cancer, exosome-derived miRNAs were used in the studies. The role of miR-205 was also described in animal serum [53].

Using univariate logistic regression, we confirmed the significant role of miR-205-5p as an endometrial cancer factor, also only in the EC tissue.

After dividing the patients according to the stage of advancement (FIGO < 2 and FIGO => 2) we assessed the differences in concentrations in the individual groups and miR-205-5p was initially statistically significant ($p = 0.017$), but lost statistical significance after applying the Benjamini–Hochberg correction ($p = 0.17$).

A similar situation occurred after dividing the patients according to the degree of differentiation (G3 and non-G3) we assessed the differences in concentrations in the individual groups and miR-205-5p was initially statistically significant ($p = 0.024$), but lost statistical significance after applying the Benjamini–Hochberg correction ($p = 0.12$). Our results are promising and indicate that studies in larger groups of patients are required to confirm the clinical usefulness of miR-205-5p in these subgroups.

The next miR examined was miR-222-3p, which was statistically significant in the tissue ($p < 0.001$), but after the Benjamini–Hochberg method was applied, it was corrected to 0.002. This miR was studied by Liu et al. and confirmed its effect on tumourigenesis in endometrial cancer tissues. The researchers, examining EC tissue, found that miR-222-3p expression correlated with ER α . The expression level of miR-222-3p was the lower in lower stage (1 and 2 vs. 3) and earlier stage (I vs. II, II vs. III, I vs. III) tumours. Furthermore, miR-222-3p was positively associated with lymph node metastasis [48].

In other cancers, researchers have also reported its oncogenic role after studying cancer tissue, for example, in osteosarcoma or lung cancer [54,55]. Exosomal miR-222 can also be studied in serum, e.g., its oncogenic effect on ovarian cancer [46]. The suppressive role is described by Fu et al. in their study on ovarian cancer [56]. In our study, we detected the downregulation of miR-222-3p expression in both tissue and serum of EC patients, indicating its suppressive role in EC cells. When examining serum in the group of patients with endometrial cancer, only miR-222-3p remained statistically significant ($p = 0.011$). However, our study showed no correlation between serum and tissue miR data (Table 7).

In contrast, miR-21-5p did not show significant changes in either tissue or serum in our study, despite previous reports linking its high expression to faster disease progression,

lymph node metastases, and high diagnostic efficacy in EC [36,37]. This discrepancy underscores the need for further research to clarify its role and diagnostic value.

The observed discrepancies between tissue and serum miRNA expression patterns, as well as between our results and prior studies, highlight the complexity of miRNA regulation in endometrial cancer. While our findings provide valuable insights, they also underscore several limitations, including the need for larger sample sizes to confirm statistically robust results and more comprehensive analyses to explore the mechanistic roles of miRNAs and reference genes in EC.

4. Materials and Methods

4.1. Tissues and Serum Samples

The study involved 18 patients diagnosed with endometrial cancer. All diagnoses were confirmed by previous histopathological tests. These patients came to the Department of Gynecology, Gynecology Oncology and Obstetrics of the Fryderyk Chopin University Hospital in Rzeszów between 04/2021 and 11/2022 to start oncological treatment. In our study, endometrial cancer tissue material, as well as serum from patients with endometrial cancer were used. The patients constituted the study group. The study also included 19 healthy women (without endometrial cancer) operated on in the local clinic due to pelvic organ prolapse or uterine fibroids, whose serum was collected as a control and these patients constituted the control group. All women consented to the use of tissues for genetic testing. The local bioethics committee approved the research project. Consent of the Bioethics Committee of the District Medical Chamber of 21 May 2020, resolution No. 54/B/2020. None of the patients received hormonal therapy, radiotherapy, or chemotherapy before sample collection.

4.2. miRNA Isolation from Serum Samples

Blood collected from the patients was centrifuged twice and the resulting serum was stored at -80°C . Serum samples from endometrial cancer were thawed on ice. Isolation of total RNA, including miRNA, from serum was performed using the miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Cat. No. 217204, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. MiRNA isolation was performed from 400 μL serum, adjusting buffer volumes for larger starting sample volumes. To establish internal standards for subsequent steps, 1 μL of spike-in control was added to the samples. After centrifugation, the upper aqueous phase containing total RNA, including miRNA, was transferred to a new reaction tube. Isopropanol was added to the supernatants to provide the appropriate conditions for RNA molecules (>18 nucleotides) to bind to the silica membrane. The entire sample was transferred to the RNeasy UCP MinElute centrifuge column, where subsequent wash steps removed membrane-bound contaminants. For RNA elution, 20 μL of RNase-free water was used. The microRNA from samples were frozen at -20°C .

4.3. miRNA Isolation from Tissue Samples

Tissue samples from patients with endometrial cancer were collected and preserved in RNAlater Tissue Reagent (Cat. No. 76104, Qiagen, Hilden, Germany) to maintain RNA integrity. These samples were then frozen at -80°C . Total RNA, including miRNA, was extracted using the miRNeasy Mini Kit (Cat. No. 217084, Qiagen, Hilden, Germany) per the manufacturer's instructions. The frozen tissues of approximately 10–20 mg were initially thawed on ice and transferred into tubes containing 700 μL of QIAzol Lysis Reagent. The samples were homogenized using sonication, followed by the addition of chloroform. The mixture was centrifuged at $12,000\times g$ for 15 min at 4°C to separate the phases. The upper aqueous phase, which contains total RNA including miRNA, was carefully transferred to

new tubes, mixed with ethanol, and then loaded onto RNeasy MiniElute Spin Columns for further purification. To remove any contaminating DNA, the samples underwent on-column digestion using the RNase-free DNase kit (Cat. No. 79254, Qiagen, Hilden, Germany). RNA was eluted in 30 μ L of RNase-free water. The RNA concentration and purity were determined using the NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the samples were diluted to a final RNA concentration of 5 ng/ μ L. To assess RNA integrity, electrophoresis was performed on a 1% agarose gel. Reverse transcription of the isolated RNA was carried out immediately following the isolation procedure to ensure RNA stability and quality.

4.4. Reverse Transcriptase Reaction

MicroRNAs were subjected to polyadenylation through the use of a poly(A) polymerase, and subsequently reverse-transcribed into cDNA using oligo-dT primers with a degenerate 3' anchor sequence, thereby facilitating the amplification of miRNAs during a real-time PCR reaction. Polyadenylation and reverse transcription were conducted in parallel in the same tube. cDNA synthesis was performed according to the manufacturer's instructions using the miRCURY LNA Reverse Transcription Kit (Cat. No. 339340, Qiagen, Hilden, Germany). The final volume of the RT reaction mixture was 10 μ L and consisted of 2 μ L RNA, 2 μ L of 5 \times miRCURY SYBR® Green RT Reaction Buffer, 1 μ L of 10 \times miRCURY RT Enzyme Mix, 0.5 μ L of both UniSp6 and miR-cel-39-3p spike-ins and 4.5 μ L of RNase-free water. The RT reaction was carried out in a T100™ 96-well thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) under the following conditions: incubation at 42 °C for 60 min, inactivation at 95 °C for 5 min, then the whole reaction was cooled to 4 °C. The cDNA was stored frozen at –20 °C until further use.

4.5. Absolute Quantification by dPCR

Absolute quantification for three miRNAs: hsa-miR-21-5p, hsa-miR-205-5p, and hsa-miR-222-3p was determined in serum samples from all patients in the study and control groups using QIAcuity System dPCR (Qiagen, Hilden, Germany). Cellular miR-39 was selected as the exogenous reference gene only in serum. The dPCR technique employs microfluidic nanoplate technology. This approach enables the quantification of nucleic acids by measuring the fluorescence endpoint of each partition. To determine the absolute concentration, we used the miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Cat. No. 339306, respectively: miR-21-5p YP00204230; miR-205-5p YP00204487; miR-222-3p YP00204551; cel-miR-39-3p YP00203952; Qiagen, Hilden, Germany) using QIAcuity Nanoplate (Qiagen, Hilden, Germany) 26K 24-well plates for miRNAs isolated from serum (Cat. No. 250001), and an 8.5K 96-well plate for miRNAs isolated from tissue (Cat. No. 250021). The dPCR reaction was performed using the QIAcuity EG PCR Kit (Cat. No. 250112, Qiagen, Hilden, Germany) as recommended by the manufacturer. Each dPCR mixture consisted of 13.3 μ L Eva Green PCR Master Mix, 4 μ L primer mix, 10 μ L of cDNA template (diluted 1:20 for cDNA derived from miRNA), and 12.7 μ L of RNase-free water. A total of 40 μ L of the reaction mixture was added to each well of a 24-well Nanoplate 26K and amplified under the following conditions: heat activation at 95 °C for 2 min, followed by 40 amplification cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 15 s and extension 72 °C for 15 s. The fluorescence was measured after all the cycles. Expression levels for the miRNAs tested were calculated based on the concentration expressed by the number of miRNA copies in the sample. The calculations were carried out using QIAcuity Software Suite version 2.1.8 (Qiagen, Hilden, Germany).

4.6. Statistical Analysis

The expression of miRNAs quantified with dPCR was log-transformed in order to achieve a normal distribution of data. Next, miRNA stability analysis was assessed using NormiRazor. NormiRazor is a tool that implements three different existing normalization algorithms—geNorm, NormFinder and BestKeeper [57]. None of the miRNAs were found to be stable enough to be considered acceptable normalizers. Differential expression analysis was conducted using an independent *t*-test, Welch *t*-test, or U Mann–Whitney test, selected based on variable distribution and variance equality, as determined by the Shapiro–Wilk test and Levene’s test, respectively. To control the false discovery rate associated with multiple comparisons, the Benjamini–Hochberg method was applied. Paired *t*-test was used to evaluate differences between miRNA concentration in serum and tissue. Spearman’s rank correlation test was used to assess correlation between serum and tissue concentration of miRNA. Univariate logistic regression analysis was applied to evaluate the impact of specific factors on the occurrence of endometrial cancer. Variables found to be significant in the univariate analysis were subsequently included in a multivariate logistic regression model. Nominal variables are reported as counts and percentages or as median (with range or interquartile range) and mean (\pm SD), depending on the normality of their distribution. Statistical analyses were performed using Statistica 13.1 software (TIBCO, Palo Alto, CA, USA) and R version 4.2.1. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

5. Conclusions

The analyses demonstrated increased expression of miR-205-5p in endometrial cancer tissue and decreased expression of miR-222-3p in both tissue and serum samples. These findings suggest that miR-205-5p and miR-222-3p may serve as potential biomarkers for endometrial cancer. Further studies on a larger group are needed to elucidate the diagnostic utility of microRNAs (miRNAs) such as miR-205 and miR-222.

6. Limitations

Our study had some limitations. The first was the small group of patients participating in the study, as the study group consisted of 18 patients with EC and the control group consisted of 19 patients. The obtained results of changes in miRNA expression are very promising, but our study only evaluates miRNAs and further studies with other miRNAs involved in EC carcinogenesis are necessary to better understand this process.

Author Contributions: Conceptualization, A.B., N.P., I.Z. and T.K.; methodology, N.P., S.P., M.S., A.B. and A.Z.; software, M.K. and N.P.; validation, I.Z. and T.K.; formal analysis, M.K.; investigation, A.B., N.P., S.P. and M.S.; resources, A.B., M.K.-B., A.W., J.W. and T.K.; data curation, N.P., A.B. and S.P.; writing—original draft preparation, A.B., N.P., S.P. and M.S.; writing—review and editing, A.B., N.P., I.Z. and T.K.; visualization, A.B., N.P. and M.K.; supervision, I.Z. and T.K.; project administration, A.B., N.P., S.P. and M.S.; funding acquisition, I.Z. and T.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of the Regional Medical Chamber in Rzeszow, protocol code 54/B/2020 and date 21 May 2020.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [CrossRef] [PubMed]
- Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 1941–1953. [CrossRef]
- Makker, V.; MacKay, H.; Ray-Coquard, L.; Levine, D.A.; Westin, S.N.; Aoki, D.; Oaknin, A. Endometrial cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**, *7*, 88. [CrossRef]
- Kandoth, C.; Schultz, N.; Cherniack, A.D.; Akbani, R.; Liu, Y.; Shen, H.; Robertson, A.G.; Pashtan, I.; Shen, R.; Benz, C.C.; et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **2013**, *497*, 67–73. [CrossRef] [PubMed]
- León-Castillo, A.; Gilvazquez, E.; Nout, R.; Smit, V.T.; McAlpine, J.N.; McConechy, M.; Kommos, S.; Brucker, S.Y.; Carlson, J.W.; Epstein, E.; et al. Clinicopathological and molecular characterisation of ‘multiple-classifier’ endometrial carcinomas. *J. Pathol.* **2020**, *250*, 312–322. [CrossRef]
- Piulats, J.M.; Guerra, E.; Gil-Martín, M.; Roman-Canal, B.; Gatiús, S.; Sanz-Pamplona, R.; Velasco, A.; Vidal, A.; Matias-Guiu, X. Molecular approaches for classifying endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **2017**, *145*, 200–207. [CrossRef] [PubMed]
- Pecorelli, S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **2009**, *105*, 103–104. [CrossRef]
- Berek, J.S.; Matias-Guiu, X.; Creutzberg, C.; Fotopoulou, C.; Gaffney, D.; Kehoe, S.; Lindemann, K.; Mutch, D.; Concin, N.; Endometrial Cancer Staging Subcommittee, FIGO Women’s Cancer Committee. FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *J. Gynecol. Oncol.* **2023**, *34*, e85. [CrossRef]
- Edmondson, R.J.; Crosbie, E.J.; Nickkho-Amiry, M.; Kaufmann, A.; Stelloo, E.; Nijman, H.W.; Leary, A.; Auguste, A.; Mileskin, L.; Pollock, P.; et al. Markers of the p53 pathway further refine molecular profiling in high-risk endometrial cancer: A TransPORTEC initiative. *Gynecol. Oncol.* **2017**, *146*, 327–333. [CrossRef]
- Zigelboim, I.; Goodfellow, P.J.; Gao, F.; Gibb, R.K.; Powell, M.A.; Rader, J.S.; Mutch, D.G. Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 2042–2048. [CrossRef]
- Bansal, N.; Yendluri, V.; Wenham, R.M. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* **2009**, *16*, 8–13. [CrossRef]
- Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **1993**, *75*, 843–854. [CrossRef] [PubMed]
- Grzywa, T.M.; Klicka, K.; Włodarski, P.K. Regulators at Every Step—How microRNAs Drive Tumor Cell Invasiveness and Metastasis. *Cancers* **2020**, *12*, 3709. [CrossRef] [PubMed]
- Michael, A.; Bajracharya, S.D.; Yuen, P.S.; Zhou, H.; Star, R.A.; Illei, G.G.; Alevizos, I. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral. Dis.* **2010**, *16*, 34–38. [CrossRef]
- Ly, L.L.; Cao, Y.; Liu, D.; Xu, M.; Liu, H.; Tang, R.N.; Ma, K.L.; Liu, B.C. Isolation and quantification of microRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. *Int. J. Biol. Sci.* **2013**, *9*, 1021–1031. [CrossRef]
- Zhou, Q.; Li, M.; Wang, X.; Li, Q.; Wang, T.; Zhu, Q.; Zhou, X.; Gao, X.; Li, X. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int. J. Biol. Sci.* **2012**, *8*, 118–123. [CrossRef] [PubMed]
- Lukasik, A.; Zielenkiewicz, P. In silico identification of plant miRNAs in mammalian breast milk exosomes—A small step forward? *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99963. [CrossRef]
- Wu, C.; Zhou, X.; Li, J.; Xiao, R.; Xin, H.; Dai, L.; Zhu, Y.; Bao, W. Serum miRNA-204-5p as a potential non-invasive biomarker for the diagnosis of endometrial cancer with sentinel lymph node mapping. *Oncol. Lett.* **2022**, *24*, 248. [CrossRef]
- Arroyo, J.D.; Chevillet, J.R.; Kroh, E.M.; Ruf, I.K.; Pritchard, C.C.; Gibson, D.F.; Mitchell, P.S.; Bennett, C.F.; Pogosova-Agadjanyan, E.L.; Stirewalt, D.L.; et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 5003–5008. [CrossRef]
- Tabet, F.; Vickers, K.C.; Cuesta Torres, L.F.; Wiese, C.B.; Shoucri, B.M.; Lambert, G.; Catherinet, C.; Prado-Lourenco, L.; Levin, M.G.; Thacker, S.; et al. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3292. [CrossRef]
- Vickers, K.C.; Palmisano, B.T.; Shoucri, B.M.; Shamburek, R.D.; Remaley, A.T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 423–433. [CrossRef] [PubMed]

22. Tan, Z.Q.; Liu, F.X.; Tang, H.L.; Su, Q. Expression and its clinical significance of hsa-miR-155 in serum of endometrial cancer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **2010**, *45*, 772–774.
23. Zhou, L.; Wang, W.; Wang, F.; Yang, S.; Hu, J.; Lu, B.; Pan, Z.; Ma, Y.; Zheng, M.; Lei, S.; et al. Plasma-derived exosomal miR-15a-5p as a promising diagnostic biomarker for early detection of endometrial carcinoma. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 57. [\[CrossRef\]](#)
24. Che, X.; Jian, F.; Chen, C.; Liu, C.; Liu, G.; Feng, W. PCOS serum-derived exosomal miR-27a-5p stimulates endometrial cancer cells migration and invasion. *J. Mol. Endocrinol.* **2020**, *64*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Jiang, Y.; Wang, N.; Yin, D.; Li, Y.K.; Guo, L.; Shi, L.P.; Huang, X. Changes in the Expression of Serum MiR-887-5p in Patients with Endometrial Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2016**, *26*, 1143–1147. [\[CrossRef\]](#)
26. Kumari, P.; Sharma, I.; Saha, S.C.; Srinivasan, R.; Bhardwaj, P. Role of serum microRNAs as biomarkers for endometriosis, endometrioid carcinoma of ovary & endometrioid endometrial cancer. *Indian. J. Med. Res.* **2022**, *156*, 516–523. [\[CrossRef\]](#)
27. Jia, W.; Wu, Y.; Zhang, Q.; Gao, G.; Zhang, C.; Xiang, Y. Identification of four serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential non-invasive biomarkers for endometrioid endometrial cancer. *Oncol. Lett.* **2013**, *6*, 261–267. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Ghazala, R.A.; El-Attar, E.A.; Abouzeid, Z.S. Circulating miRNA 27a and miRNA150-5p: a noninvasive approach to endometrial carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 4351–4360. [\[CrossRef\]](#)
29. Benati, M.; Montagnana, M.; Danese, E.; Paviati, E.; Giudici, S.; Franchi, M.; Lippi, G. Evaluation of miR-203 Expression Levels and DNA Promoter Methylation Status in Serum of Patients with Endometrial Cancer. *Clin. Lab.* **2017**, *63*, 1675–1681. [\[CrossRef\]](#)
30. Jin, X.H.; Lu, S.; Wang, A.F. Expression and clinical significance of miR-4516 and miR-21-5p in serum of patients with colorectal cancer. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 241. [\[CrossRef\]](#)
31. Seimiya, T.; Suzuki, T.; Iwata, T.; Kishikawa, T.; Sekiba, K.; Shibata, C.; Ishigaki, K.; Fujiwara, H.; Oyama, H.; Kanai, S.; et al. Combination of serum human satellite RNA and miR-21-5p levels as a biomarker for pancreatic cancer. *iScience* **2023**, *26*, 106021. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Soliman, S.E.; Abdelaleem, A.H.; Alhanafy, A.M.; Ibrahim, R.A.L.; Elhaded, A.S.A.; Assar, M.F.A. Circulating miR-21-5p and miR-126-3p: Diagnostic, prognostic value, and multivariate analysis in non-small-cell lung cancer. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 2543–2552. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Kolešnik, M.; Malm, M.; Drop, B.; Dworżański, J.; Polz-Dacewicz, M. MiRNA-21-5p as a biomarker in EBV-associated oropharyngeal cancer. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2023**, *30*, 77–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Chen, C.; Liu, X.; Chen, Q.; Dong, Y.; Hou, B. Clinical Significance of let-7a-5p and miR-21-5p in Patients with Breast Cancer. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **2019**, *49*, 302–308.
35. Hashemi, M.; Mirdamadi, M.S.A.; Talebi, Y.; Khaniabad, N.; Banaei, G.; Daneii, P.; Gholami, S.; Ghorbani, A.; Tavakolpournegari, A.; Farsani, Z.M.; et al. Pre-clinical and clinical importance of miR-21 in human cancers: Tumorigenesis, therapy response, delivery approaches and targeting agents. *Pharmacol. Res.* **2023**, *187*, 106568. [\[CrossRef\]](#)
36. Sato, K.; Miyamoto, M.; Takano, M.; Tsuda, H. MicroRNA-21 expression in cancer cells is an independent biomarker of progression-free survival of endometrioid endometrial carcinoma. *Virchows Arch.* **2021**, *479*, 883–891. [\[CrossRef\]](#)
37. Bouziyane, A.; Lamsisi, M.; Benaguida, H.; Benhessou, M.; El Kerroumi, M.; Ennaji, M.M. Diagnostic Value of MicroRNA 21 in Endometrial Cancer and Benign Lesions and its Differential Expression with Clinicopathological Parameters. *Micronut* **2021**, *10*, 146–152. [\[CrossRef\]](#)
38. Lu, L.G.; Zhang, G.M. Serum miR-205-5p level for non-small-cell lung cancer diagnosis. *Thorac. Cancer* **2022**, *13*, 1102–1103. [\[CrossRef\]](#)
39. Jiang, M.; Zhang, P.; Hu, G.; Xiao, Z.; Xu, F.; Zhong, T.; Huang, F.; Kuang, H.; Zhang, W. Relative expressions of miR-205-5p, miR-205-3p, and miR-21 in tissues and serum of non-small cell lung cancer patients. *Mol. Cell Biochem.* **2013**, *383*, 67–75. [\[CrossRef\]](#)
40. Zhou, J.; Cao, L.; Chen, Z. Differentiation of benign thyroid nodules from malignant thyroid nodules through miR-205-5p and thyroid-stimulating hormone receptor mRNA. *Hormones* **2021**, *20*, 571–580. [\[CrossRef\]](#)
41. Karaayvaz, M.; Zhang, C.; Liang, S.; Shroyer, K.R.; Ju, J. Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35158. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Jin, C.; Liang, R. miR-205 promotes epithelial-mesenchymal transition by targeting AKT signaling in endometrial cancer cells. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2015**, *41*, 1653–1660. [\[CrossRef\]](#)
43. Zhuo, Z.; Yu, H. miR-205 inhibits cell growth by targeting AKT-mTOR signaling in progesterone-resistant endometrial cancer Ishikawa cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 28042–28051. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Torres, A.; Kozak, J.; Korolczuk, A.; Rycak, D.; Wdowiak, P.; Maciejewski, R.; Torres, K. Locked nucleic acid-inhibitor of miR-205 decreases endometrial cancer cells proliferation in vitro and in vivo. *Oncotarget* **2016**, *7*, 73651–73663. [\[CrossRef\]](#)
45. Lu, Z.; Xu, Y.; Yao, Y.; Jiang, S. miR-205-5p contributes to paclitaxel resistance and progression of endometrial cancer by downregulating FOXO1. *Oncol. Res.* **2019**. [\[CrossRef\]](#)
46. Ying, X.; Wu, Q.; Wu, X.; Zhu, Q.; Wang, X.; Jiang, L.; Chen, X. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43076–43087. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

47. Jiang, K.; Li, G.; Chen, W.; Song, L.; Wei, T.; Li, Z.; Gong, R.; Lei, J.; Shi, H.; Zhu, J. Plasma Exosomal miR-146b-5p and miR-222-3p are Potential Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinomas. *Onco Targets Ther.* **2020**, *13*, 1311–1319. [\[CrossRef\]](#)
48. Liu, B.; Che, Q.; Qiu, H.; Bao, W.; Chen, X.; Lu, W.; Li, B.; Wan, X. Elevated MiR-222-3p promotes proliferation and invasion of endometrial carcinoma via targeting ER α . *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87563. [\[CrossRef\]](#)
49. Wu, Q.; Yu, L.; Lin, X.; Zheng, Q.; Zhang, S.; Chen, D.; Pan, X.; Huang, Y. Combination of Serum miRNAs with Serum Exosomal miRNAs in Early Diagnosis for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 485–495. [\[CrossRef\]](#)
50. Bogaczek, A.; Potocka, N.; Paszek, S.; Skrzypa, M.; Zuchowska, A.; Kośny, M.; Kluz, M.; Zawlik, I.; Kluz, T. Absolute Quantification of Selected microRNAs Expression in Endometrial Cancer by Digital PCR. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 3286. [\[CrossRef\]](#)
51. He, L.; Zhu, W.; Chen, Q.; Yuan, Y.; Wang, Y.; Wang, J.; Wu, X. Ovarian cancer cell-secreted exosomal miR-205 promotes metastasis by inducing angiogenesis. *Theranostics* **2019**, *9*, 8206–8220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Zhang, H.; Li, B.; Zhao, H.; Chang, J. The expression and clinical significance of serum miR-205 for breast cancer and its role in detection of human cancers. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8*, 3034–3043. [\[PubMed\]](#)
53. Ibrahim, S.; Hedia, M.; Taqi, M.O.; Derbala, M.K.; Mahmoud, K.G.M.; Ahmed, Y.; Ismail, S.; El-Belely, M. Alterations in the Expression Profile of Serum miR-155, miR-223, miR-17, miR-200a, miR-205, as well as Levels of Interleukin 6, and Prostaglandins during Endometritis in Arabian Mares. *Vet. Sci.* **2021**, *8*, 98. [\[CrossRef\]](#)
54. Guo, J.; Liu, Q.; Li, Z.; Guo, H.; Bai, C.; Wang, F. miR-222-3p promotes osteosarcoma cell migration and invasion through targeting TIMP3. *Onco Targets Ther.* **2018**, *11*, 8643–8653. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Tepebaşı, M.Y.; Öztürk, Ö. miR-21, miR-221, and miR-222 upregulation in lung cancer promotes metastasis by reducing oxidative stress and apoptosis. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **2023**, *69*, e20221688. [\[CrossRef\]](#)
56. Fu, X.; Li, Y.; Alvero, A.; Li, J.; Wu, Q.; Xiao, Q.; Peng, Y.; Hu, Y.; Li, X.; Yan, W.; et al. MicroRNA-222-3p/GNAI2/AKT axis inhibits epithelial ovarian cancer cell growth and associates with good overall survival. *Oncotarget* **2016**, *7*, 80633–80654. [\[CrossRef\]](#)
57. Grabia, S.; Smyczynska, U.; Pagacz, K.; Fendler, W. NormiRazor: Tool applying GPU-accelerated computing for determination of internal references in microRNA transcription studies. *BMC Bioinform.* **2020**, *21*, 425. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

W omawianym badaniu przeprowadzono analizę poziomów ekspresji trzech wybranych mikroRNA w surowicy pacjentek z rakiem endometrium. W badaniu wzięło udział 18 pacjentek z EC i 19 kobiet zdrowych, które stanowiły grupę kontrolną. Ze względu na ograniczoną liczebność próby badanie ma charakter pilotażowy i wymaga dalszej walidacji na większej populacji pacjentek. Analiza ekspresji mikroRNA została przeprowadzona przy użyciu dPCR, co wyróżnia to badanie na tle innych, opartych głównie na technikach takich jak qPCR. Ważnym aspektem jest także użycie wolnokrążącego mikroRNA, a nie izolowanego z egzosomów. Surowica krwi jest materiałem, który można pobrać od pacjenta w sposób minimalnie inwazyjny, a bezpośrednią izolację mikroRNA można łatwo wykonać w rutynowych badaniach. Należy jednak zaznaczyć, że bezpośrednie porównanie wyników ekspresji wolnokrążącego miRNA z wynikami badań, w których analizowano miRNA pochodzący z egzosomów, jest niemożliwe lub ograniczone ze względu na różnice w metodach izolacji oraz źródle analizowanego RNA.

W analizie tkanki raka endometrium (EC) uzyskano statystycznie istotne wyniki dla całkowitej ekspresji miR-205-5p ($p < 0.001$), które pozostały istotne także po korekcji Benjaminiiego-Hochberga. Wyniki te są zgodne z innymi podobnymi badaniami [67, 77, 78, 136]. Warto jednak zaznaczyć, że w niniejszym badaniu ekspresja miR-205-5p nie osiągnęła istotności statystycznej w analizie surowicy, co może wskazywać na różnice w stabilności mikroRNA lub odmienność mechanizmów regulacyjnych między tkanką a wolnokrążącym RNA w surowicy. W przeciwieństwie do uzyskanych wyników, rola miR-205-5p została wcześniej opisana w innych typach nowotworów, takich jak rak jajnika, niedrobnokomórkowy rak płuc lub rak piersi [74, 137, 138]. W badaniach tych analizowano zmiany ekspresji miR-205 w surowicy pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc oraz w surowicy pacjentów z rakiem piersi, przy czym w przypadku raka jajnika w badaniach wykorzystano mikroRNA pochodzące z egzosomów. Rola miR-205 została opisana również w surowicy zwierząt [139].

W przeprowadzonej analizie jednowymiarowej regresji logistycznej potwierdzono istotną rolę miR-205-5p jako czynnika związanego z rakiem endometrium, jednak tylko w tkance EC.

W dalszym etapie badania pacjentki zostały podzielone na grupy w zależności od stopnia zaawansowania choroby według klasyfikacji FIGO (FIGO < 2 vs. FIGO => 2), badano

zmiany ekspresji w poszczególnych grupach. Początkowo różnice w ekspresji miR-205-5p pomiędzy grupami były statystycznie istotne ($p = 0.017$), jednak po zastosowaniu korekcji metodą Benjaminiego-Hochberga wynik ten stracił istotność ($p = 0.17$).

Analogiczna sytuacja miała miejsce po podziale pacjentów według stopnia zróżnicowania (G3 vs. nie-G3). Również w tym przypadku ekspresja miR-205-5p różniła się początkowo i osiągnęła istotność statystyczną ($p = 0.024$), po korekcji wielokrotnych porównań uzyskany wynik przestał być istotny ($p = 0.12$). Mimo braku istotności statystycznej po korekcji, wyniki te są obiecujące i sugerują potencjalną wartość kliniczną miR-205-5p jako biomarkera w wybranych podgrupach chorych. Wskazują one również na konieczność przeprowadzenia dalszych badań z udziałem większej liczby pacjentek, celem weryfikacji uzyskanych obserwacji i potwierdzenia ich przydatności diagnostyczno-prognostycznej.

Następnym badanym mikroRNA był miR-222-3p. W analizie ekspresji w tkance uzyskano wynik istotny statystycznie ($p < 0.001$), który po zastosowaniu metody Benjaminiego-Hochberga pozostał istotny (skorygowane $p = 0.002$). W badaniu wykazano obniżenie ekspresji miR-222-3p zarówno w tkance, jak i w surowicy pacjentek z EC, co wskazuje na jego supresyjną rolę w komórkach EC. Podczas badania surowicy w grupie pacjentek z rakiem endometrium jedynie miR-222-3p wykazał istotność statystyczną ($p = 0.011$). Jednakże nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy poziomami ekspresji miR-222-3p w tkankach i w surowicy, co może świadczyć o niezależnych mechanizmach regulacyjnych w tych dwóch typach materiałów biologicznych.

Ekspresja miR-222-3p była również badana w egzosomach, gdzie opisano jego onkogeny wpływ na raka jajnika [87]. Natomiast rolę supresyjną tego mikroRNA opisali Fu i wsp., również w badaniu dotyczącym raka jajnika [83].

Natomiast w przeprowadzonym badaniu miR-21-5p nie wykazał znaczących zmian ani w tkance, ani w surowicy, pomimo wcześniejszych raportów łączących jego nadekspresję z szybszym postępem choroby, przerzutami do węzłów chłonnych i wysoką skutecznością diagnostyczną w EC [91, 121]. Uzyskane wyniki pozostają w sprzeczności z wcześniejszymi obserwacjami i mogą wynikać z różnic metodologicznych, wielkości

próby, charakterystyki populacji badanej lub źródła izolowanego mikroRNA. Rozbieżność ta podkreśla konieczność dalszych, szerzej zakrojonych badań w celu pełniejszego zrozumienia roli miR-21-5p oraz oceny jego potencjału jako biomarkera w diagnostyce raka endometrium.

Obserwowane rozbieżności między wzorcami ekspresji miRNA w tkankach a surowicą, a także otrzymanymi wynikami w niniejszym badaniu a danymi z wcześniejszych badań świadczą o złożoności regulacji miRNA w raku endometrium. Uzyskane wyniki dostarczają cennych spostrzeżeń, wskazują również na istotne ograniczenia, w tym potrzebę zwiększenia liczebności próby w celu potwierdzenia statystycznie istotnych wyników oraz przeprowadzenia bardziej kompleksowych analiz nad molekularnym działaniem miRNA i genów referencyjnych w raku endometrium. Implikują one konieczność dalszych badań na większych kohortach o większej mocy statystycznej oraz zastosowania pogłębionych analiz molekularnych, które umożliwią pełniejsze zrozumienie biologicznego znaczenia obserwowanych zmian ekspresji w kontekście patogenezy raka endometrium.

6. Wnioski

Niniejsza praca miała na celu zbadanie roli mikroRNA w patogenezie raka endometrium. Badanie zostało oparte na analizie zmian ekspresji mikroRNA zarówno w tkance, jak i w surowicy u pacjentek z EC, w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Zaobserwowano zmiany ekspresji w tkance raka endometrium dla miR-205-5p, miR-222-3p i SNORD48. W tkance raka endometrium miR-205-5p uległ nadekspresji w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy ekspresja zarówno miR-222-3p, jak i SNORD48 obniżyła się. Zaobserwowano także zmiany ekspresji miR-205-5p, U6 oraz SNORD48 w zależności od stopni zróżnicowania histologicznego.

Niniejsze badanie wskazuje, że SNORD48 i U6 nie spełniły oczekiwań dotyczących genu referencyjnego. Zarówno SNORD48, jak i U6 wykazały brak stabilności w różnych stopniach zróżnicowania histologicznego, co sugeruje, że mogą również wpływać na rozwój raka endometrium. Ponadto SNORD48 został zidentyfikowany jako czynnik rozwoju raka endometrium w analizie regresji logistycznej jednowymiarowej, jak i wielowymiarowej. Konieczne są dalsze badania, aby lepiej zrozumieć rolę SNORD48 i U6 w rozwoju raka endometrium.

W badaniu tym nie wykazano związku pomiędzy ekspresją badanych mikroRNA a wskaźnikiem masy ciała (BMI) lub innymi chorobami współistniejącymi u pacjentek z rakiem endometrium.

Analizy przeprowadzone z surowicy wykazały zmniejszoną ekspresję miR-222-3p w próbkach tkanek, która była obserwowana też w tkance EC. Wyniki te sugerują, że miR-222-3p może służyć jako potencjalny biomarker z surowicy pacjentek z EC. Surowica jest materiałem łatwo dostępnym w porównaniu z tkanką endometrium, a możliwość wykorzystania jej jako źródła informacji o miR-222-3p daje szansę na stworzenie markera diagnostycznego w populacji kobiet obciążonych ryzykiem raka endometrium.

Badanie to miało pewne ograniczenia. Pierwszym była grupa kontrolna, która składała się tylko z 19 pacjentów. Zaobserwowano także, w pierwszym etapie badania, nierównomierny rozkład pacjentów w poszczególnych grupach zróżnicowania histopatologicznego – grupa EIN składała się z 22 pacjentów, grupa G1 z 30,

grupa G2 z 47, zaś G3 zaledwie z 12 pacjentów. Natomiast ograniczeniem w drugim etapie badania była mała grupa pacjentów biorących w nim udział, ponieważ grupa badawcza składała się z 18 pacjentów z EC, a grupa kontrolna z 19, było to związane z pilotażowym charakterem prowadzonych analiz.

Nasze badania wymagają potwierdzenia na większej grupie pacjentów i zwiększenia liczby testowanych mikroRNA. Stwarza to nowe możliwości diagnostyczne i poprzez innowacyjne ukierunkowane terapie daje nam nowatorskie możliwości leczenia.

Wyniki badań mikroRNA w EC mogą mieć znaczenie we wczesnej diagnostyce pacjentek z EC lub stanowić punkty uchwytu w nowych terapiach celowanych, odwracając postęp lub skutki nowotworu.

7. Streszczenie

Rak endometrium jest jednym z najczęstszych nowotworów, głównie w krajach wysokorozwiniętych Europy i Ameryki Północnej. Częstość zachorowania na ten typ raka ma tendencję wzrostową. W ostatnich latach udowodniono, że na powstawanie raka endometrium mają wpływ mutacje genetyczne, co spowodowało wprowadzenie przez The Cancer Genome Atlas (TCGA) w 2013 r. podziału molekularnego EC. Natomiast do mechanizmów, które regulują ekspresję genów możemy zaliczyć mechanizmy epigenetyczne oraz niekodujące RNA. Jednym z rodzajów niekodujących RNA są mikroRNA (miR), które nie są klasycznymi czynnikami epigenetycznymi, ale odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym.

Celem niniejszej pracy było zbadanie związku między ekspresją trzech mikroRNA, tj.: miR-21-5p, miR-205-5p i miR-222-3p w tkance raka endometrium. Cel stanowiło również zbadanie stabilności ekspresji SNORD48 i U6, które są często używane jako geny referencyjne w badaniach ekspresji mikroRNA.

Grupę badaną stanowiło 111 pacjentek z EC, od których pobrano tkankę nowotworową podczas histerektomii. Do grupy kontrolnej włączono 19 pacjentek poddawanych operacji mięśniaków macicy lub wypadania narządów miednicy mniejszej bez zmian nowotworowych. Wszystkie pacjentki wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniu.

W celu określenia bezwzględnej ekspresji poszczególnych mikroRNA zastosowano metodę dPCR opierającą się na wykorzystaniu mikroprzepływowych nanopłytek oraz systemu dPCR QIAcuity (Qiagen, Hilden, Niemcy).

W tkance raka endometrium miR-205-5p ulegał nadekspresji, podczas gdy ekspresja miR-222-3p i SNORD48 była obniżona w porównaniu z grupą kontrolną. Wykryto statystycznie istotną korelację ekspresji miR-205-5p, U6 i SNORD48 z różnymi stopniami histologicznymi. Ekspresja miR-205-5p wzrasta wraz ze wzrostem zróżnicowania histopatologicznego (EIN = 1590, G1 = 3367,2, G2 = 8067 i G3 = 20 360), podczas gdy ekspresja U6 i SNORD spada od EIN do G2 i wzrasta ponownie w stopniu G3 (U6: EIN = 19 032, G1 = 16 482,4, G2 = 13 642,4, G3 = 133 008; SNORD48: EIN = 97 088, G1 = 59 520, G2 = 43 544, G3 = 227 200).

Prezentowane wyniki badań pokazują, że zwiększenie ekspresji miR-205-5p i zmniejszenie ekspresji miR-222-3p oraz SNORD48 może wpływać na rozwój raka endometrium. Ponadto zmiany ekspresji miR-205-5p, U6 i SNORD48 mogą być związane z postępowaniem raka endometrium. Wyniki wskazują również, że SNORD48 i U6, powszechnie stosowane jako geny referencyjne, mogą wpływać na rozwój i postęp raka endometrium i dlatego nie powinny być stosowane do normalizacji.

Kolejnym etapem badań było porównanie poziomu ekspresji miR-21-5p, miR-205-5p i miR-222-3p w tkankach raka endometrium z poziomem ekspresji w surowicy. Z całej grupy badanej do tego etapu włączono 18 pacjentek oraz całą grupę kontrolną (n=19). Ekspresja została oznaczona zarówno w tkankach endometrium jak i w surowicy z wykorzystaniem dPCR. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice dla miR-205-5p tylko w tkance ($p < 0,001$) oraz dla miR-222-3p zarówno w tkance ($p = 0,003$), jak i w surowicy ($p = 0,019$).

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano podwyższoną ekspresję miR-205-5p w tkankach raka endometrium oraz obniżoną ekspresję miR-222-3p zarówno w tkankach, jak i w surowicy. Uzyskane wyniki wskazują, że miR-205-5p oraz miR-222-3p mogą pełnić rolę potencjalnych biomarkerów raka endometrium. Spośród nich jedynie miR-222-3p potwierdził istotnie obniżony poziom ekspresji w surowicy, co wskazuje na jego przydatność jako łatwo dostępnego markera w diagnostyce tego nowotworu.

8. Summary

Endometrial cancer is one of the most common cancers, mainly in highly developed countries of Europe and North America. Its incidence is increasing. In recent years, it has been proven that genetic mutations influence the development of endometrial cancer, which resulted in the introduction of the molecular division of EC in 2013 by The Cancer Genome Atlas (TCGA). On the other hand, the mechanisms that regulate gene expression include epigenetic mechanisms and non-coding RNAs. One type of non-coding RNA is microRNA (miR), which are not classic epigenetic factors, but play an important role in the regulation of gene expression at the post-transcriptional level.

The aim of this dissertation was to examine the relationship between the expression of three microRNAs (miR-21-5p, miR-205-5p and miR-222-3p) in endometrial cancer tissue. The objective was also to examine the stability of SNORD48 and U6 expression, which are often used as reference genes in microRNA expression studies.

The study group consisted of 111 patients with EC, whose tumor tissue was collected during hysterectomy. The control group included 19 patients undergoing surgery for uterine fibroids or pelvic organ prolapse without tumors. All patients gave written consent to participate in the study.

The dPCR method based on the use of microfluidic nanoplates and the QIAcuity dPCR system (Qiagen, Hilden, Germany) was applied to determine the absolute expression of individual microRNAs.

In endometrial cancer tissue, miR-205-5p was overexpressed, while miR-222-3p and SNORD48 expression were downregulated compared with the control group. A statistically significant correlation of miR-205-5p, U6, and SNORD48 expression with different histological grades was detected. MiR-205-5p expression grew with the increasing histopathological grade (squamous intraepithelial neoplasia – EIN = 1590, G1 = 3367.2, G2 = 8067, and G3 = 20,360), whereas U6 and SNORD expression decreased from EIN to G2 and increased again at G3 (U6: EIN = 19,032, G1 = 16,482.4, G2 = 13,642.4, G3 = 133,008; SNORD48: EIN = 97,088, G1 = 59,520, G2 = 43,544, G3 = 227,200).

The outcomes of the study show that increased expression of miR-205-5p and decreased expression of miR-222-3p and SNORD48 may affect the development of endometrial cancer. Moreover, changes in the expression of miR-205-5p, U6 and SNORD48 may be associated with the progression of endometrial cancer. The results also indicate that SNORD48 and U6, commonly used as reference genes, may affect the development and progression of endometrial cancer, and therefore should not be used for normalization.

The next stage of the study was to compare the expression level of miR-21-5p, miR-205-5p and miR-222-3p in endometrial cancer tissues with the expression level in serum. From the entire study group, 18 patients and the entire control group (n=19) were included in this stage. The expression was determined in both endometrial tissue and serum using dPCR. Statistically significant differences were observed for miR-205-5p only in tissue ($p < 0.001$) and for miR-222-3p both in tissue ($p = 0.003$) and in serum ($p = 0.019$).

Based on the conducted analyses, increased expression of miR-205-5p in endometrial cancer tissues and decreased expression of miR-222-3p in both tissues and serum were demonstrated. The results indicate that miR-205-5p and miR-222-3p may act as potential biomarkers of endometrial cancer. Of these, only miR-222-3p confirmed a significantly reduced level of expression in serum, which indicates its usefulness as an easily accessible marker in the diagnosis of this cancer. This study requires confirmation in a larger group of patients and an increase in the number of tested microRNAs. This creates new diagnostic possibilities and, through new targeted therapies, gives us new treatment options.

9. Piśmiennictwo

1. Crosbie, E.J., et al., *Endometrial cancer*. Lancet, 2022. **399**(10333): p. 1412–1428.
2. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394–424.
3. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209–249.
4. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet, 2008. **371**(9612): p. 569–578.
5. Arnold, M., et al., *Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory*. Eur J Cancer, 2015. **51**(9): p. 1164–1187.
6. Visser, N.C.M., et al., *Accuracy of Endometrial Sampling in Endometrial Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis*. Obstet Gynecol, 2017. **130**(4): p. 803–813.
7. Makker, V., et al., *Endometrial cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2021. **7**(1): p. 88.
8. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1983. **15**(1): p. 10–17.
9. Deolet, E., Van Dorpe, J., and Van de Vijver, K., *Mesonephric-Like Adenocarcinoma of the Endometrium: Diagnostic Advances to Spot This Wolf in Sheep's Clothing. A Review of the Literature*. J Clin Med, 2021. **10**(4): p. 698.
10. Jalloul, R.J., et al., *Mucinous adenocarcinoma of the endometrium: case series and review of the literature*. Int J Gynecol Cancer, 2012. **22**(5): p. 812–8.
11. Berek, J.S., et al., *FIGO staging of endometrial cancer: 2023*. J Gynecol Oncol, 2023. **34**(5): p. e85.
12. Kandath, C., et al., *Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma*. Nature, 2013. **497**(7447): p. 67–73.
13. Yen, T.T., et al., *Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer*. Int J Gynecol Pathol, 2020. **39**(1): p. 26–35.
14. León-Castillo, A., et al., *Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy*. J Clin Oncol, 2020. **38**(29): p. 3388–3397.
15. Stelloo, E., et al., *Improved Risk Assessment by Integrating Molecular and Clinicopathological Factors in Early-stage Endometrial Cancer-Combined Analysis of the PORTEC Cohorts*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(16): p. 4215–4224.
16. Ferlay, J., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. Int J Cancer, 2019. **144**(8): p. 1941–1953.
17. Pecorelli, S., *Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium*. Int J Gynaecol Obstet, 2009. **105**(2): p. 103–104.
18. Dowdy, S.C. and Glaser, G.E., *Adjuvant therapy for women with high-risk endometrial carcinoma*. Lancet Oncol, 2018. **19**(3): p. 268–269.
19. Matei, D., et al., *Adjuvant Chemotherapy plus Radiation for Locally Advanced Endometrial Cancer*. N Engl J Med, 2019. **380**(24): p. 2317–2326.
20. Stasenko, M., et al., *Clinical patterns and genomic profiling of recurrent 'ultra-low risk' endometrial cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2020. **30**(6): p. 717–723.
21. Stavropoulos, A., et al., *Expression of p53 and PTEN in human primary endometrial carcinomas: Clinicopathological and immunohistochemical analysis and study of their concomitant expression*. Oncol Lett, 2019. **17**(5): p. 4575–4589.

22. Konopka, B., et al., *Assessment of the quality and frequency of mutations occurrence in PTEN gene in endometrial carcinomas and hyperplasias*. *Cancer Lett*, 2002. **178**(1): p. 43–51.
23. Khatami, F., et al., *PTEN promoter methylation and expression in endometrial cancer tissues*. *Epigenomics*, 2023. **15**(8): p. 507–516.
24. Wang, C., Li, Q., and He, Y., *MicroRNA-21-5p promotes epithelial to mesenchymal transition by targeting SRY-box 17 in endometrial cancer*. *Oncol Rep*, 2020. **43**(6): p. 1897–1905.
25. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*, 2005. **435**(7043): p. 834–838.
26. Lee, Y.S. and Dutta, A., *MicroRNAs in cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 199–227.
27. Stampoliou, A., Arapantoni-Dadioti, P., and Pavlakis, K., *Epigenetic mechanisms in endometrial cancer*. *J BUON*, 2016. **21**(2): p. 301–306.
28. Vallone, C., et al., *Non-Coding RNAs and Endometrial Cancer*. *Genes (Basel)*, 2018. **9**(4): p. 187.
29. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V., *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843–854.
30. Kim, V.N., *MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export*. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(4): p. 156–159.
31. Lin, S. and Gregory, R.I., *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2015. **15**(6): p. 321–333.
32. Peng, Y. and Croce, C.M., *The role of MicroRNAs in human cancer*. *Signal Transduct Target Ther*, 2016. **1**: p. 15004.
33. Fabian, M.R. and Sonenberg, N., *The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(6): p. 586–593.
34. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281–297.
35. Grzywa, T.M., Klicka, K., and P.K. Włodarski, *Regulators at Every Step-How microRNAs Drive Tumor Cell Invasiveness and Metastasis*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(12): p. 3709.
36. Chiu, H.C., et al., *Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Biology of Molecular Regulation in Endometrial Carcinogenesis*. *J Clin Med*, 2019. **8**(4): p. 439.
37. Vincent, K., et al., *MicroRNAs, genomic instability and cancer*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(8): p. 14475–14491.
38. Shirjang, S., et al., *MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis*. *Free Radic Biol Med*, 2019. **139**: p. 1–15.
39. Pedroza-Torres, A., et al., *MicroRNAs in Tumor Cell Metabolism: Roles and Therapeutic Opportunities*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 1404.
40. Wang, Y., et al., *New insights into the regulatory role of microRNA in tumor angiogenesis and clinical implications*. *Mol Cancer*, 2018. **17**(1): p. 22.
41. Yi, M., et al., *The role of cancer-derived microRNAs in cancer immune escape*. *J Hematol Oncol*, 2020. **13**(1): p. 25.
42. Mori, M.A., et al., *Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease*. *Cell Metab*, 2019. **30**(4): p. 656–673.
43. Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., and Struhl, K., *An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation*. *Cell*, 2009. **139**(4): p. 693–706.
44. Klicka, K., et al., *The Role of miRNAs in the Regulation of Endometrial Cancer Invasiveness and Metastasis—A Systematic Review*. *Cancers*, 2021. **13**(14): p. 3393.

45. Zhang, B., et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. *Dev Biol*, 2007. **302**(1): p. 1–12.
46. Ciafrè, S.A., et al., *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **334**(4): p. 1351–1358.
47. Mendiola-Soto, D.K., et al., *MiRNAs in Hematopoiesis and Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(6): p. 5436.
48. Sajjadi-Dokht, M., et al., *MicroRNAs and JAK/STAT3 signaling: A new promising therapeutic axis in blood cancers*. *Genes Dis*, 2022. **9**(4): p. 849–867.
49. Wang, Y., et al., *MiR-192-5p-Modified Tumor-Associated Macrophages-Derived Exosome Suppressed Endometrial Cancer Progression Through Targeting IRAK1/NF- κ B Signaling*. *Reprod Sci*, 2022. **29**(2): p. 436–447.
50. Chen, H.X., et al., *MicroRNA-29b Inhibits Angiogenesis by Targeting VEGFA through the MAPK/ERK and PI3K/Akt Signaling Pathways in Endometrial Carcinoma*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **41**(3): p. 933–946.
51. Guo, L., et al., *miRNA-miRNA interaction implicates for potential mutual regulatory pattern*. *Gene*, 2012. **511**(2): p. 187–194.
52. Hsiao, K.Y., Sun, H.S., and Tsai, S.J., *Circular RNA – New member of noncoding RNA with novel functions*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017. **242**(11): p. 1136–1141.
53. Zheng, Q., et al., *Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11215.
54. Boussios, S., et al., *The Developing Story of Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer*. *J Pers Med*, 2019. **9**(1): p. 12.
55. Zhao, Y., Jin, L.J., and Zhang, X.Y., *Exosomal miRNA-205 promotes breast cancer chemoresistance and tumorigenesis through E2F1*. *Aging (Albany NY)*, 2021. **13**(14): p. 18498–18514.
56. Konoshenko, M., et al., *MicroRNAs as Predictors of Lung-Cancer Resistance and Sensitivity to Cisplatin*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(14): p. 7594.
57. Chen, Q., et al., *Serum miR-19a predicts resistance to FOLFOX chemotherapy in advanced colorectal cancer cases*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013. **14**(12): p. 7421–7426.
58. Hansen, T.F., et al., *Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2015. **112**(4): p. 624–629.
59. Liu, B., et al., *Elevated MiR-222-3p promotes proliferation and invasion of endometrial carcinoma via targeting ER α* . *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e87563.
60. Wang, J., et al., *MicroRNA-135a promotes proliferation, migration, invasion and induces chemoresistance of endometrial cancer cells*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X*, 2020. **5**: p. 100103.
61. Karaayvaz, M., et al., *Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35158.
62. Torres, A., et al., *Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(7): p. 1633–1645.
63. Chen, C.Y., et al., *PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 338.
64. Mutter, G.L., et al., *Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(11): p. 924–930.
65. Zhang, G., et al., *MiR-205 inhibits cell apoptosis by targeting phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten in endometrial cancer Ishikawa cells*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 440.
66. Donkers, H., et al., *Usefulness of microRNA detection in the diagnostics of endometrial cancer*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2021. **100**(6): p. 1148–1154.

67. Jin, C. and Liang, R., *miR-205 promotes epithelial-mesenchymal transition by targeting AKT signaling in endometrial cancer cells*. J Obstet Gynaecol Res, 2015. **41**(10): p. 1653–1660.
68. Greene, S.B., et al., *A putative role for microRNA-205 in mammary epithelial cell progenitors*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 4): p. 606–618.
69. Jiang, J., et al., *Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(17): p. 5394–5403.
70. Wang, X., et al., *Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2557.
71. Gottardo, F., et al., *Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers*. Urol Oncol, 2007. **25**(5): p. 387–392.
72. Markou, A., et al., *Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR*. Clin Chem, 2008. **54**(10): p. 1696–1704.
73. Chen, X., et al., *MiR-205-5p Functions as a Tumor Suppressor in Gastric Cancer Cells through Downregulating FAM84B*. J Oncol, 2022. **2022**: p. 8267891.
74. Lu, L.G. and Zhang, G.M., *Serum miR-205-5p level for non-small-cell lung cancer diagnosis*. Thorac Cancer, 2022. **13**(7): p. 1102–1103.
75. Jiang, M., et al., *Relative expressions of miR-205-5p, miR-205-3p, and miR-21 in tissues and serum of non-small cell lung cancer patients*. Mol Cell Biochem, 2013. **383**(1–2): p. 67–75.
76. Zhou, J., Cao, L., and Chen, Z., *Differentiation of benign thyroid nodules from malignant thyroid nodules through miR-205-5p and thyroid-stimulating hormone receptor mRNA*. Hormones (Athens), 2021. **20**(3): p. 571–580.
77. Zhuo, Z. and Yu, H., *miR-205 inhibits cell growth by targeting AKT-mTOR signaling in progesterone-resistant endometrial cancer Ishikawa cells*. Oncotarget, 2017. **8**(17): p. 28042–28051.
78. Lu, Z., et al., *miR-205-5p contributes to paclitaxel resistance and progression of endometrial cancer by downregulating FOXO1*. Oncol Res, 2019.
79. Xin, W., et al., *lncRNA LA16c-313D11.11 modulates the development of endometrial cancer by binding to and inhibiting microRNA-205-5p function and indirectly increasing PTEN activity*. Int J Oncol, 2020. **57**(1): p. 355–363.
80. Xin, W., et al., *Long non-coding RNA derived miR-205-5p modulates human endometrial cancer by targeting PTEN*. Am J Transl Res, 2015. **7**(11): p. 2433–2441.
81. Montagnana, M., et al., *Aberrant MicroRNA Expression in Patients With Endometrial Cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2017. **27**(3): p. 459–466.
82. Donkers, H., et al., *Detection of microRNA in urine to identify patients with endometrial cancer: a feasibility study*. Int J Gynecol Cancer, 2021. **31**(6): p. 868–874.
83. Fu, X., et al., *MicroRNA-222-3p/GNAI2/AKT axis inhibits epithelial ovarian cancer cell growth and associates with good overall survival*. Oncotarget, 2016. **7**(49): p. 80633–80654.
84. Chen, W. and Li, X., *MiR-222-3p Promotes Cell Proliferation and Inhibits Apoptosis by Targeting PUMA (BBC3) in Non-Small Cell Lung Cancer*. Technol Cancer Res Treat, 2020. **19**: p. 1533033820922558.
85. Guo, J., et al., *miR-222-3p promotes osteosarcoma cell migration and invasion through targeting TIMP3*. Onco Targets Ther, 2018. **11**: p. 8643–8653.
86. Tepebaşı, M.Y. and Öztürk, Ö., *miR-21, miR-221, and miR-222 upregulation in lung cancer promotes metastasis by reducing oxidative stress and apoptosis*. Rev Assoc Med Bras (1992), 2023. **69**(6): p. e20221688.

87. Ying, X., et al., *Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages*. *Oncotarget*, 2016. **7**(28): p. 43076–43087.
88. Jiang, K., et al., *Plasma Exosomal miR-146b-5p and miR-222-3p are Potential Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinomas*. *Onco Targets Ther*, 2020. **13**: p. 1311–1319.
89. Wu, Q., et al., *Combination of Serum miRNAs with Serum Exosomal miRNAs in Early Diagnosis for Non-Small-Cell Lung Cancer*. *Cancer Manag Res*, 2020. **12**: p. 485–495.
90. Hashemi, M., et al., *Pre-clinical and clinical importance of miR-21 in human cancers: Tumorigenesis, therapy response, delivery approaches and targeting agents*. *Pharmacol Res*, 2023. **187**: p. 106568.
91. Sato, K., et al., *MicroRNA-21 expression in cancer cells is an independent biomarker of progression-free survival of endometrioid endometrial carcinoma*. *Virchows Arch*, 2021. **479**(5): p. 883–891.
92. Qin, X., et al., *microRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer*. *Oncol Lett*, 2012. **4**(6): p. 1290–1296.
93. Yang, C.H., et al., *The oncogenic microRNA-21 inhibits the tumor suppressive activity of FBXO11 to promote tumorigenesis*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(10): p. 6037–6046.
94. Wang, J., et al., *The role of lncRNA-MEG/miR-21-5p/PDCD4 axis in spinal cord injury*. *Am J Transl Res*, 2021. **13**(2): p. 646–658.
95. Liu, C., et al., *Cancer-Related Triplets of mRNA-lncRNA-miRNA Revealed by Integrative Network in Uterine Corpus Endometrial Carcinoma*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 3859582.
96. Tu, J., et al., *Growth arrest-specific transcript 5 represses endometrial cancer development by promoting antitumor function of tumor-associated macrophages*. *Cancer Sci*, 2022. **113**(8): p. 2496–2512.
97. Xiao, L., et al., *Endometrial Cancer Cells Promote M2-Like Macrophage Polarization by Delivering Exosomal miRNA-21 under Hypoxia Condition*. *J Immunol Res*, 2020. **2020**: p. 9731049.
98. Tian, C., et al., *lncRNA NBAT1 Inhibits Cell Metastasis and Promotes Apoptosis in Endometrial Cancer by Sponging miR-21-5p to Regulate PTEN*. *Comput Math Methods Med*, 2022. **2022**: p. 9304392.
99. Li, Q., et al., *Exosomal miR-21-5p derived from gastric cancer promotes peritoneal metastasis via mesothelial-to-mesenchymal transition*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(9): p. 854.
100. Tang, J., et al., *miR-21-5p/SMAD7 axis promotes the progress of lung cancer*. *Thorac Cancer*, 2021. **12**(17): p. 2307–2313.
101. He, Q., et al., *Cancer-secreted exosomal miR-21-5p induces angiogenesis and vascular permeability by targeting KRIT1*. *Cell Death Dis*, 2021. **12**(6): p. 576.
102. Liu, M., et al., *Exosomal hsa-miR-21-5p is a biomarker for breast cancer diagnosis*. *PeerJ*, 2021. **9**: p. e12147.
103. Cao, J., et al., *Exosomal miR-21-5p contributes to ovarian cancer progression by regulating CDK6*. *Hum Cell*, 2021. **34**(4): p. 1185–1196.
104. Jin, X.H., S. Lu, and A.F. Wang, *Expression and clinical significance of miR-4516 and miR-21-5p in serum of patients with colorectal cancer*. *BMC Cancer*, 2020. **20**(1): p. 241.
105. Seimiya, T., et al., *Combination of serum human satellite RNA and miR-21-5p levels as a biomarker for pancreatic cancer*. *iScience*, 2023. **26**(2): p. 106021.

106. Soliman, S.E., et al., *Circulating miR-21-5p and miR-126-3p: diagnostic, prognostic value, and multivariate analysis in non-small-cell lung cancer*. Mol Biol Rep, 2021. **48**(3): p. 2543–2552.
107. Kolečnik, M., et al., *MiRNA-21-5p as a biomarker in EBV-associated oropharyngeal cancer*. Ann Agric Environ Med, 2023. **30**(1): p. 77–82.
108. Chen, C., et al., *Clinical Significance of let-7a-5p and miR-21-5p in Patients with Breast Cancer*. Ann Clin Lab Sci, 2019. **49**(3): p. 302–308.
109. Grabia, S., et al., *NormiRazor: tool applying GPU-accelerated computing for determination of internal references in microRNA transcription studies*. BMC Bioinformatics, 2020. **21**(1): p. 425.
110. Chen, B., et al., *The role of MiRNA in polycystic ovary syndrome (PCOS)*. Gene, 2019. **706**: p. 91–96.
111. Udesen, P.B., et al., *Circulating miRNAs in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Longitudinal Cohort Study*. Cells, 2023. **12**(7): p. 83.
112. Che, X., et al., *PCOS serum-derived exosomal miR-27a-5p stimulates endometrial cancer cells migration and invasion*. J Mol Endocrinol, 2020. **64**(1): p. 1–12.
113. Kumar, S., et al., *MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. **146**: p. 47–94.
114. Gerasymchuk, M., et al., *The Role of microRNAs in Organismal and Skin Aging*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(15): p. 5281.
115. Wagner, K.H., et al., *Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology*. Nutrients, 2016. **8**(6): p. 338.
116. Noren Hooten, N., et al., *Age-related changes in microRNA levels in serum*. Aging (Albany NY), 2013. **5**(10): p. 725–740.
117. Wang, S., et al., *The Role of microRNA-23a-3p in the Progression of Human Aging Process by Targeting FOXO3a*. Mol Biotechnol, 2024 **66**(2):p. 277–287).
118. Kulinczak, M., et al., *Endometrial Cancer-Adjacent Tissues Express Higher Levels of Cancer-Promoting Genes than the Matched Tumors*. Genes (Basel), 2022. **13**(9): p. 1611.
119. Zhang, C., et al., *High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 119.
120. Stinson, S., et al., *TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer*. Sci Signal, 2011. **4**(177): p. ra41.
121. Bouziyane, A., et al., *Diagnostic Value of MicroRNA 21 in Endometrial Cancer and Benign Lesions and its Differential Expression with Clinicopathological Parameters*. Microna, 2021. **10**(2): p. 146–152.
122. Braun, M.M., Overbeek-Wager, E.A., and Grumbo, R.J., *Diagnosis and Management of Endometrial Cancer*. Am Fam Physician, 2016. **93**(6): p. 468–474.
123. Van Arsdale, A., et al., *Association of obesity with survival in patients with endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2019. **154**(1): p. 156–162.
124. Purdie, D.M. and Green, A.C., *Epidemiology of endometrial cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2001. **15**(3): p. 341–354.
125. Cirillo, F., et al., *Obesity, Insulin Resistance, and Colorectal Cancer: Could miRNA Dysregulation Play A Role?* Int J Mol Sci, 2019. **20**(12): p. 2922.
126. Rodrigues, P.M., et al., *miR-21-5p promotes NASH-related hepatocarcinogenesis*. Liver Int, 2023. **43**(10): p. 2256–2274.
127. Torres, A., et al., *Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues*. Gynecol Oncol, 2013. **130**(3): p. 588–594.

128. Bignotti, E., et al., *Identification of stably expressed reference small non-coding RNAs for microRNA quantification in high-grade serous ovarian carcinoma tissues*. J Cell Mol Med, 2016. **20**(12): p. 2341–2348.
129. Egidi, M.G., et al., *Stability Assessment of Candidate Reference Genes in Urine Sediment of Prostate Cancer Patients for miRNA Applications*. Dis Markers, 2015. **2015**: p. 973597.
130. Lawlor, H., et al., *Identification of suitable endogenous controls for gene and miRNA expression studies in irradiated prostate cancer cells*. Tumour Biol, 2015. **36**(8): p. 6019–6028.
131. Shen, L., et al., *SNORD15B and SNORA5C: Novel Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Colorectal Cancer*. Biomed Res Int, 2022. **2022**: p. 8260800.
132. Rapti, S.M., et al., *High miR-96 levels in colorectal adenocarcinoma predict poor prognosis, particularly in patients without distant metastasis at the time of initial diagnosis*. Tumour Biol, 2016. **37**(9): p. 11815–11824.
133. Masè, M., et al., *Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 41127.
134. Jurcevic, S., Olsson, B., and Klinga-Levan, K., *Validation of suitable endogenous control genes for quantitative PCR analysis of microRNA gene expression in a rat model of endometrial cancer*. Cancer Cell Int, 2013. **13**(1): p. 45.
135. Lou, G., et al., *Differential distribution of U6 (RNU6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microRNA quantification*. Int J Mol Med, 2015. **36**(5): p. 1400–1408.
136. Torres, A., et al., *Locked nucleic acid-inhibitor of miR-205 decreases endometrial cancer cells proliferation in vitro and in vivo*. Oncotarget, 2016. **7**(45): p. 73651–73663.
137. He, L., et al., *Ovarian cancer cell-secreted exosomal miR-205 promotes metastasis by inducing angiogenesis*. Theranostics, 2019. **9**(26): p. 8206–8220.
138. Zhang, H., et al., *The expression and clinical significance of serum miR-205 for breast cancer and its role in detection of human cancers*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(2): p. 3034–3043.
139. Ibrahim, S., et al., *Alterations in the Expression Profile of Serum miR-155, miR-223, miR-17, miR-200a, miR-205, as well as Levels of Interleukin 6, and Prostaglandins during Endometritis in Arabian Mares*. Vet Sci, 2021. **8**(6): p. 98.

10. Oświadczenia współautorów

Rzeszów, dnia 1.04.2025

Imię i nazwisko: Anna Bogaczyk

Jednostka: Klinika Ginekologii,

Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa

Promotor: prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz

Promotor pomocniczy: dr n. med. Natalia Potocka

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny nauk medycznych), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

Bogaczyk A, Zawlik I, Zuzak T, Kluz M, Potocka N, Kluz T. The Role of miRNAs in the Development, Proliferation, and Progression of Endometrial Cancer. Int J Mol Sci. 2023 Jul 15;24(14):11489. doi: 10.3390/ijms241411489. PMID: 37511248; PMCID: PMC10380838.

wchodzącego w skład zbioru jest następujący:

- pisanie - edycja i recenzja
- nadzór
- odpowiedź na recenzje i redakcja

Anna Bogaczyk
Podpis

3. lek. med. Kluz Marta

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- pisanie - edycja i recenzja


.....
Podpis

4. dr n. med. Natalia Potocka

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- pisanie - edycja i recenzja
- nadzór
- odpowiedź na recenzje i redakcja


.....
Podpis

Oświadczenia współautorów

1. prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- pisanie - edycja i recenzja
- nadzór



Podpis

2. dr n. med. Tomasz Zuzak

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- pisanie - edycja i recenzja



Podpis

5. prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- pisanie - edycja i recenzja
- nadzór



Podpis

Rzeszów, dnia 14.04.25

Imię i nazwisko: Anna Bogaczyk
Jednostka: Klinika Ginekologii,
Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa
Promotor: prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz
Promotor pomocniczy: dr n. med. Natalia Potocka

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny nauk medycznych), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

Bogaczyk A, Potocka N, Paszek S, Skrzypa M, Zuchowska A, Kośny M, Kluz M, Zawlik I, Kluz T. Absolute Quantification of Selected microRNAs Expression in Endometrial Cancer by Digital PCR. Int J Mol Sci. 2024 Mar 14;25(6):3286. doi: 10.3390/ijms25063286. PMID: 38542261; PMCID: PMC10969921.

wchodzącego w skład zbioru jest następujący:

- konceptualizacja
- metodologia
- badania
- zasoby
- gromadzenie danych
- pisanie — przygotowanie pierwotnej wersji roboczej
- pisanie — recenzja i edycja
- wizualizacja
- administrowanie projektem
- odpowiedź na recenzje i redakcja


.....
Podpis

Oświadczenia współautorów

1. dr n. med. Natalia Potocka

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- konceptualizacja
- metodologia
- badania
- gromadzenie danych
- pisanie — przygotowanie pierwotnej wersji roboczej
- pisanie — recenzja i edycja
- wizualizacja
- administrowanie projektem
- odpowiedź na recenzje i redakcja



Podpis

2. dr n. o zdr. Inż. Sylwia Paszek

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- metodologia
- badania
- gromadzenie danych
- pisanie — przygotowanie pierwotnej wersji roboczej
- administrowanie projektem



Podpis

3. dr n. med. Marzena Skrzyba

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- metodologia
- badania
- pisanie — przygotowanie pierwotnej wersji roboczej
- administrowanie projektem



Podpis

4. dr Alina Zuchowska

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- metodologia



Podpis

4. lek.med Marta Kluz

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- zasoby



Podpis

5. prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- konceptualizacja
- walidacja
- pisanie — recenzja i edycja
- nadzór



Podpis

5. prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- konceptualizacja
- walidacja
- zasoby
- pisanie — recenzja i edycja
- nadzór
- pozyskiwanie funduszy



Podpis

Oświadczenia współautorów

1. Michał Kośny

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- oprogramowanie
- analiza formalna
- wizualizacja



Podpis

Rzeszów, dnia 14.04.2015

Imię i nazwisko: Anna Bogaczyk
Jednostka: Klinika Ginekologii,
Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa
Promotor: prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz
Promotor pomocniczy: dr n. med. Natalia Potocka

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny nauk medycznych), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

Bogaczyk A, Potocka N, Paszek S, Skrzypa M, Zuchowska A, Kośny M, Kluz-Barłowska M, Wróbel A, Wróbel J, Zawlik I, Kluz T. MiR-205-5p and MiR-222-3p as Potential Biomarkers of Endometrial Cancer. Int J Mol Sci. 2015 Mar 14;26(6):2615. doi: 10.3390/ijms26062615. PMID: 40141259; PMCID: PMC11941963.

wchodzącego w skład zbioru jest następujący:

- konceptualizacja
- metodologia
- badanie
- zasoby
- gromadzenie danych
- pisanie — przygotowanie oryginalnego projektu
- pisanie — recenzja i edycja
- wizualizacja
- administrowanie projektem
- odpowiedź na recenzje i redakcja

Anna Bogaczyk
Podpis

Oświadczenia współautorów

1. dr n. med. Natalia Potocka

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- konceptualizacja
- metodologia
- oprogramowanie
- badanie
- gromadzenie danych
- pisanie — przygotowanie oryginalnego projektu
- pisanie — recenzja i edycja
- wizualizacja
- administrowanie projektem
- odpowiedź na recenzje i redakcja



.....
Podpis

2. dr n. o zdr. Inż. Sylwia Paszek

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- metodologia
- badanie
- gromadzenie danych
- pisanie — przygotowanie oryginalnego projektu
- administrowanie projektem



.....
Podpis

3. dr n. med. Marzena Skrzypa

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- metodologia
- badanie
- pisanie — przygotowanie oryginalnego projektu
- administrowanie projektem



Podpis

4. dr Alina Zuchowska

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- metodologia



Podpis

4. lek. med. Marta Kluz - Barłowska

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- zasoby



Podpis

5. prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- konceptualizacja
- walidacja
- pisanie — recenzja i edycja
- nadzór
- pozyskiwanie funduszy



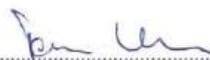
.....
Podpis

5. prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- konceptualizacja
- walidacja
- zasoby
- pisanie — recenzja i edycja
- nadzór
- pozyskiwanie funduszy



.....
Podpis

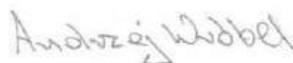
Oświadczenia współautorów

1. prof. dr hab. n. med. Andrzej Wróbel

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- zasoby



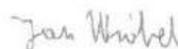
.....
Podpis

2. Jan Wróbel

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- zasoby



.....
Podpis

Oświadczenia współautorów

1. Michał Kośny

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Annę Bogaczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- oprogramowanie
- analiza formalna
- wizualizacja



.....
Podpis

11. Zgoda komisji bioetycznej

Komisja Bioetyczna
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej
35-030 Rzeszów, ul. Dekerta 2
tel. 17 717 77 17

UCHWAŁA Nr 24/B/2019 Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej z dnia 14 lutego 2019 r.

Komisja Bioetyczna Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie działając na podstawie art. 29 ust. 2 ustawy z dnia 5.12.1996 r. o zawodzie lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 15. 464 tj.), zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 r.) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania, oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, Kodeksu Etyki Lekarskiej, z uwzględnieniem zasad Deklaracji Helsińskiej (Declaration of Helsinki) oraz zasad prawidłowego prowadzenia badań klinicznych (Good Clinical Practice) i Międzynarodowej Konferencji na rzecz harmonizacji wymogów technicznych dla rejestracji środków farmaceutycznych (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH), : po zapoznaniu się z dokumentami przedłożonymi wraz ze „Zgłoszeniem badań” oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę :

postanawia

w wyniku przeprowadzonej dyskusji i głosowania, Komisja pozytywnie zaopiniowała projekt badania pt. :

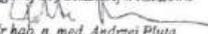
**„Badania proteomiczne, metabolomiczne i genetyczne w nowotworach
narządu rodowego oraz piersi”.**

Badacz :

dr hab. n. med. TOMASZ KLUZ

Ośrodek :

**Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 1 im. F. Chopina, Klinika Ginekologii i Położnictwa
oraz Zakład Genetyki Medycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego.**

Przewodniczący
Komisji Bioetycznej
Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie

dr hab. n. med. Andrzej Pluta

Komisja Bioetyczna
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej
35-030 Rzeszów, ul. Dekerta 2
tel. 17 717 77 17

UCHWAŁA Nr 54/B/ 2020
Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej
z dnia 21 maja 2020 r.

Komisja Bioetyczna Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie działając na podstawie art. 29 ust. 2 ustawy z dnia 5.12.1996 r. o zawodzie lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 15. 464 t.j.), zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 r.) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania, oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, Kodeksu Etyki Lekarskiej, z uwzględnieniem zasad Deklaracji Helsińskiej (Declaration of Helsinki) oraz zasad prawidłowego prowadzenia badań klinicznych (Good Clinical Practice) i Międzynarodowej Konferencji na rzecz harmonizacji wymogów technicznych dla rejestracji środków farmaceutycznych (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH), : po zapoznaniu się z dokumentami przedłożonymi wraz ze „Zgłoszeniem badań” oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę :

postanawia

Komisja wyraziła zgodę na wprowadzenie poprawki do badania klinicznego pt. :

**„Badania proteomiczne, metabolomiczne i genetyczne w nowotworach
narządu rodnego oraz piersi”.**

Koordinator : dr hab. n. med. Tomasz Kluz

Poprawka dotyczy : dołączenia do badania naukowego prowadzącego w Klinice Ginekologii i Położnictwa KSW Nr 1 w Rzeszowie , Zakładu Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Uniwersytetu Łódzkiego kierowanego przez :

Profesora Pawła Stączka

W załączeniu dokumenty :

- 1. Streszczenie protokołu badania.*
- 2. Oświadczenie Badacza dotyczące wyposażenia ośrodka badawczego i kwalifikacji personelu.*
- 3. Życiorys głównego badacza oraz życiorysy członków Zespołu Badawczego.*
- 4. Publikacje naukowe.*

Pakiet dokumentów przeznaczony dla lokalnej Komisji Bioetycznej.

Przewodniczący
Komisji Bioetycznej
Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie
dr hab. n. med. Andrzej Piłtuś

Komisja Bioetyczna
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej
35-030 Rzeszów, ul. Dekerta 2
tel. 17 717 77 17

KB/2/D/2024

Rzeszów 8 lipca 2024 r.

Szanowny Pan
Prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz

Komisja Bioetyczna przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Rzeszowie po zapoznaniu się z Pana prośbą oraz przedłożonymi dokumentami, na posiedzeniu w dniu 08 lipca 2024 r. **wyraziła zgodę** na dołączenie do zespołu badawczego : prof. dr hab. n. med. Izabeli Zawlik, dr n. med. Natalii Potockiej, dr n.o zdr.inż. Sylwii Paszek, dr n. med. Marzeny Skrzypa, dr n.biol. Aliny Zuchowskiej do badania naukowego pt. : „**Badania proteomiczne, metaboliczne i genetyczne w nowotworach narządu rodnego i piersi**”(Uchwała Nr 24/B/2019 z poprawką Nr 54/B/2020) w Klinicznym Szpitalu Nr 1, Klinice Ginekologii i Położnictwa oraz Zakładzie Genetyki Ogólnej UR oraz Laboratorium Biologii Molekularnej UR.

Z poważaniem

Przewodniczący
Komisji Bioetycznej
Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie

dr hab. n. med. Andrzej Płuta

UCHWAŁA Nr 7/B/2025
Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej
z dnia 10 lutego 2025 r.

Komisja Bioetyczna Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie działając na podstawie art. 29 ust. 2 ustawy z dnia 5.12.1996 r. o zawodzie lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 15. 464 t.j.), zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 r.) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania, oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, Kodeksu Etyki Lekarskiej, z uwzględnieniem zasad Deklaracji Helsińskiej (Declaration of Helsinki) oraz zasad prawidłowego prowadzenia badań klinicznych (Good Clinical Practice) i Międzynarodowej Konferencji na rzecz harmonizacji wymogów technicznych dla rejestracji środków farmaceutycznych (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH), : po zapoznaniu się z dokumentami przedłożonymi wraz ze „Zgłoszeniem badań” oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę :

postanawia

Komisja wyraziła zgodę na wprowadzenie poprawki do badania klinicznego pt. :

**„Badania proteomiczne, metabolomiczne i genetyczne w nowotworach
narządu rodneg o oraz piersi”.**

Koordynator : prof. dr hab. n. med. Tomasz Kluz

Poprawka dotyczy :

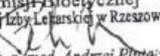
dołączenia do badania naukowego prowadzącego w Klinice Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. F. Chopina w Rzeszowie :

lek. Anny Bogaczyk i lek. Patryka Jasielskiego

asystentów Kliniki Ginekologii Onkologicznej i Położnictwa Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. F. Chopina w Rzeszowie

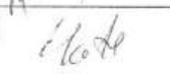
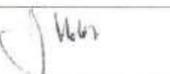
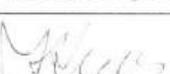
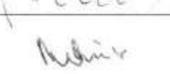
W załączeniu dokumenty :

1. Podanie koordynatora badania prof. dr hab. n. med. Tomasza Kluz
2. CV Badaczy : lek. Anny Bogaczyk i lek. Patryka Jasielskiego
3. Certyfikaty GCP lek. Anny Bogaczyk i lek. Patryka Jasielskiego

Przewodniczący
Komisji Bioetycznej
Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie

dr hab. n. med. Andrzej Płota

Komisja Bioetyczna
 przy Okręgowej Izbie Lekarskiej
 35-030 Rzeszów, ul. Dekerta 2
 tel. 17 217 77 17

„Badania proteomiczne, metabolomiczne i genetyczne w nowotworach narządu rodnego oraz piersi”.

Członkowie Komisji Bioetycznej OIL w Rzeszowie Osoby podpisane – obecne na posiedzeniu w dniu 10 lutego 2025 r.	Podpis
1. dr hab. n.med. Andrzej Piłta /lekarz/ - Prywatny Gabinet Lekarski w Rzeszowie	
2. dr n. med. Wojciech Domka /lekarz/ Uniwersytecki Szpital Kliniczny Nr 1 w Rzeszowie	
3. dr filozofii Anna Habrat/filozof/ Uniwersytet Rzeszowski	
4. mgr Jerzy Halat /prawnik/ Sąd Pracy w Rzeszowie	
5. dr n. med. Marzena Janas /lekarz/ Uniwersytecki Szpital Kliniczny Nr 1 w Rzeszowie	
6. dr n. med. Artur Kozłowski /lekarz/ Szpital Specjalistyczny w Mielcu	
7. dr n. med. Jerzy Kuźniar /lekarz/ Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2 w Rzeszowie	
8. mgr Zbigniew Machnio /pielęgniarka/ Uniwersytecki Szpital Kliniczny Nr 1 w Rzeszowie	
9. lek. dent. Radosław Maksymowicz /lekarz dentysta/ NZOZ DentAR w Rzeszowie	
10. lek. Krzysztof Marchewka /lekarz/ Szpital Wojewódzki w Tarnobrzegu	
11. Ks. dr hab. Janusz Miąso/duchowny/ Uniwersytet Rzeszowski	
12. mgr Maria Michna Ciąpała /farmaceuta/ Prywatna Apteka	