



**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**  
**Katedra Endokrynologii Ginekologicznej i Leczenia Niepłodności**  
**Zakład Diagnostyki i Leczenia Niepłodności**  
Department of Gynecological Endocrinology and Infertility Treatment  
Division of Diagnosis and Treatment of Infertility  
Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznań, Poland

60-535 Poznań  
ul. Polna 33  
Poland

Tel.: +48(61) 8419412,  
Fax: +48(61) 8419612  
e-mail: knier@gpsk.am.poznan.pl

---

**Prof. dr hab.n. med. Leszek Pawelczyk**  
**Kierownik Katedry i Zakładu**  
**Leszek Pawelczyk, M.D., Ph.D.**  
**Professor**  
**Head of Department and Division**

Poznań, 19 września 2023

## **OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**lek. med. Gabrieli Milewskiej**

**p.t. „Molekularne mechanizmy działania progesteronu i selektywnego modulatora receptora progesteronowego w mięśniakach macicy”**

Mięśniaki należą do najczęstszych guzów macicy i szacuje się, że występują u około 20-80 % kobiet a ryzyko ich wystąpienia rośnie wraz z wiekiem. Wśród czynników predysponujących ich rozwój wymienia się: przynależność rasową (częściej u kobiet negroidalnych), czynniki genetyczne (częściej gdy mięśniaki stwierdzone u matki lub siostry) oraz hormonalne (wpływ estrogenów i progesteronu). Mięśniaki mogą stanowić poważny problem dla wielu kobiet, który zależy od ich lokalizacji, wielkości oraz liczby co przekłada się na występowanie objawów klinicznych. Należą do nich: nieprawidłowe, obfite, krwawienia miesięczne oraz w przebiegu cyklu prowadzące często do anemizacji, dolegliwości bólowe podbrzusza i okolicy krzyżowej, problemy z oddawaniem moczu i /lub stolca, trudności z zajściem i/lub przebiegiem ciąży oraz porodu jak również zaburzenia emocjonalne i psychiczne. Jedynym, w pełni skutecznym leczeniem mięśniaków, jest całkowite usunięcie macicy. Jednakże dla wielu kobiet, szczególnie w wieku rozrodczym, nie jest to postępowanie akceptowalne i dlatego alternatywą może być ich wyluszczenie lub embolizacja tętnic macicznych. Ze względu na hormonowrażliwość tych guzów od bardzo wielu lat trwają poszukiwania farmakologicznych opcji terapeutycznych, które pozwoliłyby uniknąć leczenia operacyjnego. Głównymi celami tych form leczenia jest zahamowanie krwawień z macicy oraz

wzrostu czy optymalniej, zmniejszenia wielkości samych mięśniaków. Obecnie istnieje kilka protokołów terapeutycznych, które obejmują stosowanie: preparatów antykoncepcyjnych, analogów GnRH, inhibitory aromatazy czy progestagenów. Rozwój badań nad selektywnymi modulatorami receptora progesteronowego (SPRMs) ma swój początek w latach 90. XX wieku. W 2005 r. Eisinger i wsp. opublikowali pierwsze badania nad zastosowanie Mefipristonu w terapii mięśniaków macicy i zaobserwowali 53% zmniejszenie ich objętości oraz u 75% kobiet zatrzymanie krwawień z macicy po jednym roku leczenia. W 2012 r. w *New England Journal of Medicine* zostały przedstawione szczegółowe wyniki wielośrodkowego, międzynarodowego, badania klinicznego PEARL analizującego efektywność jak i działania uboczne Octanu Ulipristalu w leczeniu krwawień spowodowanych mięśniakami, które spowodowało bardzo szerokie stosowanie tego selektywnego modulatora w codziennej praktyce lekarskiej (*Donnez J. et al.: 2012, NEJM;366:421-432*). Zdecydowana większość ogłoszonych w tym temacie badań koncentruje się jednak na aspektach klinicznych natomiast niewiele jest publikacji dotyczących wpływu na poziomie komórkowym stosowanych terapii na same mięśniaki.

Z tego względu, podjęty przez lek. med. Gabrielę Milewską temat dotyczący molekularnych podstaw oddziaływania progesteronu oraz selektywnego modulatora receptora progesteronowego w mięśniakach macicy uważam za niezwykle interesujący i nowatorski.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa liczy 101 stron maszynopisu. Układ pracy jest typowy i obejmuje: streszczenia w języku angielskim i polskim, wykaz skrótów, wstęp, założenia i cel, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, wykaz rycin i tabel oraz piśmiennictwo.

Z merytorycznego punktu widzenia całość wstępu można by podzielić na trzy części. W pierwszej, doktorantka w sposób syntetyczny zapoznaje czytelnika z klinicznymi aspektami mięśniaków macicy i ich wpływem na płodność kobiety, epidemiologią oraz czynnikami ryzyka ich rozwoju. W tym miejscu chciałbym odnieść się do Ryciny 1, na której autorka przedstawia typy mięśniaków ze względu na ich lokalizację. W 2011r. została opublikowana przez Munro i wsp., obowiązująca do dzisiaj, klasyfikacja FIGO mięśniaków w zależności od ich umiejscowienia w macicy. W mojej ocenie, w opracowaniach naukowych, włączając w to rozprawy doktorskie, należałoby posługiwać się tym, ogólnie zaakceptowanym, podziałem. Uzupełnieniem tej części jest końcowy fragment wstępu, w którym lek. med. Gabriela Milewska odnosi się do stosowanych form leczenia mięśniaków macicy podkreślając miejsce postępowania operacyjnego oraz farmakologicznego ze zwróceniem uwagi na analogi GnRH i octan ulipristalu. Jako klinicysta, chciałbym jednak podkreślić, że kontekst decyzji Europejskiej Agencji Leków (EMA) w związku z wystąpieniem po stosowaniu octanu ulipristalu niewydolności wątroby jest bardziej jednoznaczny niż wyraziła to w tekście doktorantka. Lek.med. Gabriela Milewska pisze, cyt.: „Europejska Agencja Leków(EMA, ang. European Medicines Agency) zatwierdziła stosowanie ostanu ulipristalu w leczeniu mięśniaków z pewnymi ograniczeniami, tj. gdy operacja (w tym embolizacja) zakończyła się niepowodzeniem u kobiet przed menopauzą.” W rzeczywistości w komunikacie EMA możemy przeczytać, że Agencja zezwala na stosowanie preparatów zawierających octan ulipristalu tylko u kobiet przedmenopauzalnych, których nie można zoperować lub operacja nie

przyniosła efektów. W mojej opinii te podobnie brzmiące stanowiska mają jednak i ciężar kliniczny. Konsekwencją decyzji EMA była wycofanie przez Główny Inspektorat Farmaceutyczny (GIF) octanu ulipristalu z obrotu na terenie całej Polski.

Drugą część wstępu lek.med. Gabriela Milewska poświęca opisowi ultrastruktury mięśniaków i porównaniu jej z mięśniem prawidłowej macicy ze szczególnym naciskiem na charakterystykę macierzy zewnątrzkomórkowej oraz czynników i mechanizmów wpływających na nią. W mojej opinii jest to niezwykle interesująca i rzadko spotykana w innych opracowaniach część wstępu.

Trzeci merytorycznie fragment wstępu to bardzo szczegółowy opis mechanizmów działania progesteronu i octanu ulipristalu na mięśniaki macicy. Z naukowego punktu widzenia godnym podkreślenia jest znakomite omówienie i charakterystyka zarówno cytoplazmatycznych jak i błonowych receptorów progesteronowych oraz indukowanych przez nie szlaków i efektów wewnątrzkomórkowych.

Należy zaznaczyć, że całość wstępu znakomicie przygotowuje czytelnika do badań podjętych przez lek.med. Gabriele Milewską w rozprawie doktorskiej.

Cel pracy jest bardzo ambitny i precyzyjnie przedstawiony a jego rozwinięcie w postaci celów szczegółowych nakreśla jak niezwykle trudnego i szerokiego zadania podjęła się doktorantka..

Materiał badawczy jest imponujący i obejmował świeże fragmenty tkankowe prawidłowej mięśniówki macicy (n=100) oraz mięśniaków macicy bez uprzedniego leczenia octanem ulipristalu (n=150) i po leczeniu tym modulatorem (n=100). Z opisu materiału nie wynika jednak czy każdy uzyskany fragment pochodził od innej kobiety czy też z indywidualnych mięśniaków od pojedynczych pacjentek. Powyższa wątpliwość łączy się z pytaniem o liczbę operowanych kobiet od których pobierano materiał. Opisując materiał, doktorantka nie ustrzegła się braku konsekwencji dotyczącej jego liczebności. W pierwszym zdaniu opisu lek.med. Gabriela Milewska podaje że do badania włączono fragmenty mięśniaków w liczbie 250 (zarówno po jak i przed leczeniem) natomiast w podrozdziale 3.3 na str. 39 znajdujemy informację cyt.: „Bezpośrednio po operacji mięśniaki macicy uzyskane od pacjentek leczonych i nieleczonych octanem ulipristalu (UA-L, NT-L) (n=150) oraz próbki tkanek prawidłowej mięśniówki macicy (M-) (n=100) przemyto dwukrotnie PBS i pocięto na kawałki o średnicy 1 mm na płytce Petriego sterylnym skalpelem.”

Dla realizacji założonych celów lek.med. Gabriela Milewska wykorzystwała niezwykle nowoczesne i różnorodne metody analizy laboratoryjnej obejmujące: hodowle tkankową i komórkową, izolację RNA, reakcję odwróconej transkrypcji, ilościową reakcję łańcuchową polimerazy (qPCR) jak również techniki immunohisto- i immunocytochemiczne. Świadczy to dobitnie o znakomitym opanowaniu przez doktorantkę bogatego warsztatu laboratoryjnego.

Niezwykle liczne wyniki zostały przedstawione na 22 rycinach wykonanych i opisanych w bardzo jasny i precyzyjny sposób. Chronologia prezentowanych rezultatów badań w pełni koresponduje z założonymi celami. Porównując wpływ progesteronu i octanu ulipristalu na żywotność komórek mięśniaka macicy doktorantka wykazała odwrotny efekt działania obu związków, pobudzający progesteronu i hamujący selektywnego modulatora receptora, który nie

podlegał uwolnieniu po równoczesnym zastosowaniu obu z nich. Niezwykle interesujące z poznawczego i terapeutycznego punktu widzenia są obserwacje lek.med.Gabrieli Milewskiej dotyczące ekspresji cytoplazmatycznych i błonowych receptorów progesteronowych w zdrowej tkance mięśniowej macicy oraz w mięśniakach jak również wpływu terapii progesteronem i octanem ulipristalu na ich występowanie w badanych guzach macicy. Jak wykazała doktorantka, w porównaniu do zdrowego mięśnia macicy, mięśniaki cechowały się znacznie wyższą ekspresją obu badanych receptorów cytoplazmatycznych, co potwierdza wyniki innych badaczy oraz błonowych  $\alpha$ ,  $\beta$  i komponenty błonowej PGRMC1, co istotnym wkładem w aktualną wiedzę. Wynikiem tej części badań nad receptorami są obserwacje, że zastosowanie do leczenia mięśniaków progesteronu zwiększało ekspresję PGRA/B, PGRB, mPR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i PGRMC1 natomiast octan ulipristalu wykazywał efekt przeciwny z wyjątkiem dla receptora PGRA/B. Pomimo, że nie było to przedmiotem badań doktorantki, niezwykle ważnym w tym miejscu pytaniem jest miejsce receptorów estrogenowych w mięśniakach macicy i ich rola w ekspresji receptorów progesteronowych oraz wpływu octanu ulipristalu na ich wzajemne mechanizmy regulatorowe. Kolejnym, fascynującym elementem przeprowadzonych przez lek.med.Gabrielę Milewską badań była ocena wpływu progesteronu i octanu ulipristalu na szlaki sygnałowe TGF- $\beta$  i RhOA oraz czynników biorących udział w ich aktywacji /hamowaniu: TGF- $\beta$ 1, 3, TGF- $\beta$ R1, TGF- $\beta$ R2, SMAD2 i SMAD3. Jak wykazała doktorantka zastosowany w badaniu selektywny modulator receptora progesteronowego efektywnie hamował szlak TGF- $\beta$ . Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na zauważoną nieścisłość w podrozdziale 4.3.3. Autorka stwierdza, cyt.: „ Aby ustalić, czy progesteron i octan ulipristalu aktywują sygnalizację TGF- $\beta$ 1/SMAD, zbadaliśmy ich wpływ na stosunek fosforylowanego (pSMAD3) i niefosforylowanego SMAD3 w mięśniakach macicy”. W opisie zauważalny jest brak części eksperymentu dotyczy stymulacji z użyciem progesteronu. Ostatnia część badań dotyczyła oceny wpływu obu badanych substancji na angiogenezę i proces zapalny występujący w mięśniakach, elementy mające istotny wpływ na macierz pozakomórkową. Jak wykazała doktorantka oceniany selektywny modulator receptora progesteronowego istotnie obniżał ekspresję zarówno VEGFA i B jak i interleukiny 6 oraz jej receptorów. Całość uzyskanych wyników oraz wynikających z nich konsekwencji lek. med. Gabriela Milewska w znakomity sposób podsumowała na Ryc. 28 przedstawiając porównanie wpływu progesteronu oraz octanu ulipristalu na szlaki sygnalizacyjne w mięśniakach macicy i w efekcie ich rozwój i wzrost. Według oceny recenzenta jest to niezwykle nowatorskie podejście nie tylko poznawcze ale także użyteczne z klinicznego punktu widzenia. Szkoda tylko, że rycina ta nie znalazła swojego odniesienia w tekście podrozdziału 4.8 a dopiero w dyskusji.

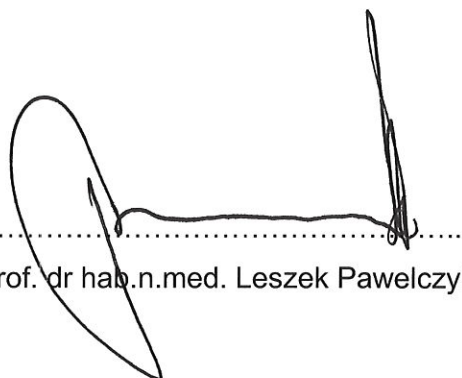
Dyskusja napisana jest w sposób czytelny w oparciu o dużą znajomość piśmiennictwa i umiejętnym jego wykorzystaniu. W rozdziale tym doktorantka w sposób niezwykle wyczerpujący zestawia uzyskane niezwykle liczne wyniki z dostępną literaturą oraz formułuje w sposób dojrzały własne refleksje i przemyślenia. Pozwoliło to na niezwykle nowatorskie obserwacje o istnieniu dwóch różnych mechanizmów działania progesteronu w mięśniakach macicy: aktywację szlaku TGF- $\beta$  / SMAD3 oraz oddziaływania na przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej.

Całość rozprawy kończy się dziewięcioma wnioskami, które w rzeczowy sposób podsumowują uzyskane wyniki i w pełni korespondują z założonymi celami rozprawy.

Cytowane przez Doktorantkę piśmiennictwo liczące 163 pozycje jest niezwykle trafnie dobrane, aktualne (29 spośród nich opublikowane po 2015 roku) i świadczy o znakomitej znajomości tematu.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że rozprawa lek.med. Gabrieli Milewskiej wskazuje na jej ogromną pracowitość a także dojrzałość naukową. Sposób zaplanowania badań, opracowania oraz interpretacji dużej ilości wyników wymagał od Autorki ogromnego nakładu czasowego i wkładu intelektualnego. Uzyskane wyniki otwierają nowe strategie terapeutyczne mięśniaków macicy poprzez zastosowania leczenia celowanego w szlaki sygnalizacyjne wpływające na macierz pozakomórkową i w efekcie rozwój i wzrost tych guzów. Dlatego wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku prośbę o wyróżnienie tej rozprawy.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszelkie wymagania dla tego rodzaju rozpraw. Wobec powyższego wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek med. Gabrieli Milewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



.....

Prof. dr hab.n.med. Leszek Pawelczyk