

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski
Z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim



Gabriela Milewska

**MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA PROGESTERONU
I SELEKTYWNEGO MODULATORA RECEPTORA PROGESTERONOWEGO
W MIĘŚNIAKACH MACICY**

*Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauk medycznych*

Promotor: prof. dr hab. n. med. Nafis Rahman
Pracę wykonano w Klinice Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Sławomir Wołczyński

Białystok, 2023 rok

*Serdecznie podziękowania promotorowi mojej pracy – Prof. dr hab. Nafis A. Rahman
– za zaangażowanie, merytoryczną pomoc, przekazywane wartości oraz cenne rady
nie tylko podczas pisania pracy doktorskiej, ale także przez cały okres
mojego dotychczasowego rozwoju naukowego.*

Najszczerze podziękowania Prof. dr hab. Sławomirowi Wołczyńskiemu za bezwarunkowe wsparcie, wiarę, życzliwość oraz wytrwałość w pomaganiu mi, abym odnalazła swoją drogę zawodową jak i naukową; za przekazywaną wiedzę i pasję do nauki oraz pracy lekarza.

Chciałabym również podziękować dr n. med. Donacie Ponikwickiej-Tyszko za wprowadzenie w świat biologii molekularnej, za poświęcany czas, przekazywaną wiedzę, cierpliwość i wyrozumiałość, a także za zaufanie i wiarę we mnie i moje możliwości.

Dziękuję również mojemu Mężowi – dr n. o zdr. Rafałowi Milewskiemu – za wspólną drogę przez studia doktoranckie, bezwarunkowe wsparcie oraz okazywaną miłość, a także wiarę i motywację do dalszego rozwoju.

Podziękowania kieruję również do moich wspinających Rodziców, za ich nieskończoną wiarę we mnie oraz wsparcie na każdym etapie mojego rozwoju osobistego i zawodowego.

Spis treści

Abstrakt.....	8
Streszczenie w języku polskim.....	9
Streszczenie w języku angielskim.....	11
Wykaz skrótów.....	13
1. WSTĘP.....	16
1.1. Mięśniaki macicy – wprowadzenie.....	16
1.1.1. Obraz kliniczny.....	16
1.1.2. Epidemiologia i czynniki ryzyka.....	18
1.2. Patomorfologia mięśniaków macicy.....	20
1.2.1. Budowa histologiczna.....	20
1.2.2. Ultrastruktura mięśniaków macicy.....	21
1.3. Macierz pozakomórkowa.....	23
1.3.1. Transformujący czynnik wzrostu β	24
1.3.2. Metaloproteinazy i ich inhibitory.....	26
1.4. Proces włóknienia.....	27
1.5. Progesteron i receptory progesteronowe w biologii mięśniaków macicy.....	28
1.5.1. Progesteron i jego rola w biologii mięśniaków macicy.....	28
1.5.2. Receptory progesteronowe i ich rola w biologii mięśniaków macicy...	30
1.6. Octan uliprystalu - selektywny modulator receptora progesteronowego	32
1.7. Leczenie.....	34
1.7.1. Leczenie chirurgiczne.....	34
1.7.2. Leczenie farmakologiczne.....	34

2.	ZAŁOŻENIA I CEL PRACY.....	37
3.	MATERIAŁ i METODYKA BADAŃ.....	38
3.1.	Materiał badawczy.....	38
3.2.	Leczenie.....	39
3.3.	Hodowla i stymulacja eksplantów tkankowych prawidłowej mięśniówki macicy i mięśniaków macicy.....	39
3.4.	Hodowla i stymulacja pierwotnych hodowli komórkowych prawidłowej mięśniówki macicy i mięśniaków macicy.....	40
3.5.	Pomiar żywotność komórek mięśniaków macicy w hodowlach komórkowych.....	41
3.6.	Reakcja odwrotnej transkrypcji oraz ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR).....	42
3.7.	Pomiar wydzielania czynników wzrostu i cytokin.....	45
3.8.	Barwienie immunohistochemiczne.....	45
3.9.	Barwienie immunocytochemiczne.....	46
3.10.	Analiza statystyczna.....	46
4.	WYNIKI.....	47
4.1.	Wpływ progesteronu i octanu uliprystalu na żywotność komórek mięśniaków macicy.....	47
4.2.	Wpływ progesteronu i octan uliprystalu na profil ekspresji receptorów progesteronowych w prawidłowej mięśniówce macicy i w mięśniakach macicy.....	49
4.2.1.	Wpływ progesteronu i octan uliprystalu na profil ekspresji receptorów progesteronowych w eksplantach mięśniakach macicy.....	49

4.2.2.	Profil ekspresji oraz lokalizacja receptorów progesteronowych w prawidłowej mięśniówce macicy i w mięśniakach macicy przed i po leczeniu octanem uliprystalu.....	51
4.2.3.	Lokalizacja receptorów progesteronowych w mięśniakach przed i po leczeniu octanem uliprystalu.....	53
4.3.	Rola progesteronu i octanu uliprystalu w szlaku sygnałowego TGF- β w mięśniakach macicy.....	56
4.3.1.	Charakterystyka profilu ekspresji szlaku sygnałowego TGF- β w prawidłowej mięśniówce i mięśniakach macicy przed i po leczeniu octanem uliprystalu.....	56
4.3.2.	Rola progesteronu i octanu uliprystalu w regulacji szlaku sygnałowego TGF- β w mięśniakach macicy.....	58
4.3.3.	Rola progesteronu i octanu uliprystalu w aktywacji szlaku sygnałowego TGF- β w mięśniakach macicy.....	60
4.4.	Mechanizm działania progesteronu i octanu uliprystalu w regulacji VEGF w mięśniakach macicy.....	62
4.4.1.	Charakterystyka profilu ekspresji rodziny VEGF w prawidłowej mięśniówce i mięśniakach macicy.....	62
4.4.2.	Wpływ VEGF na żywotność komórek mięśniaków macicy.....	64
4.4.3.	Rola progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 w regulacji ekspresji i wydzielania VEGF w mięśniakach macicy.....	65
4.5.	Mechanizm działania progesteronu i octanu uliprystalu w regulacji IL-6 w mięśniakach macicy.....	67
4.5.1.	Charakterystyka profilu ekspresji rodziny IL-6 w prawidłowej mięśniówce i mięśniakach macicy.....	67
4.5.2.	Wpływ IL-6 na żywotność komórek mięśniaków macicy.....	68

4.5.3.	Rola progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 w regulacji ekspresji i wydzielania IL-6 w mięśniakach macicy.....	69
4.6.	Rola progesteronu i octanu uliprystalu w regulacji ścieżki sygnałowej RhOA w mięśniakach macicy.....	71
4.6.1	Charakterystyka profilu ekspresji RhOA i jego lokalizacja w mięśniakach macicy.....	71
4.6.2.	Rola progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 w regulacji ekspresji i wydzielania RhOA w mięśniakach macicy.....	73
4.7.	Ekspresja genów różnych typów interleukin i czynników wzrostu w prawidłowej mięśniówce macicy oraz mięśniakach macicy.....	76
4.8.	Dwa różne mechanizmy działania progesteronu i selektywnego modulatora receptora progesteronowego, octanu uliprystalu, w mięśniakach macicy.....	79
5.	DYSKUSJA.....	81
6.	WNIOSKI.....	87
7.	WYKAZ RYCIN.....	88
8.	WYKAZ TABEL.....	90
9.	WYKAZ PIŚMIENNICTWA.....	91
10.	ANEKS ZAWIERAJĄCY SKAN ZGODY KOMISJI BIOETYCZNEJ.....	100
11.	ANEKS ZAWIERAJĄCY SKAN ZGODY KOMISJI BIOETYCZNEJ.....	101

Molekularne mechanizmy działania progesteronu i selektywnego modulatora receptora progesteronowego w mięśniakach macicy

Mięśniaki macicy są najczęstszymi łagodnymi nowotworami żeńskich narządów płciowych występującymi głównie u kobiet w wieku rozrodczym. Progesteron jest silnym aktywatorem wzrostu, syntezy oraz akumulacji macierzy zewnątrzkomórkowej mięśniaków macicy. Selektywny modulator receptora progesteronowego octan uliprystalu ma udowodnioną skuteczność kliniczną w leczeniu tych guzów, jednak molekularne mechanizmy jego działania pozostają niejasne.

Celem pracy było zbadanie mechanizmów molekularnych działania octanu uliprystalu w mięśniakach macicy oraz tego, jak różni się on od indukowanej przez progesteron aktywacji kaskad sygnalizacyjnych zaangażowanych w syntezę i odkładanie się macierzy zewnątrzkomórkowej. Ostatecznym celem było poznanie mechanizmów wyjaśniających terapeutyczny wpływ octanu uliprystalu na wzrost mięśniaków macicy.

W badaniu przeanalizowano próbki mięśniaków macicy od pacjentek leczonych (n=100) i nieleczonych (n=150) octanem uliprystalu oraz prawidłowej mięśniówki macicy (n=100) jako grupy kontrolnej, pod kątem indukowanej przez progesteron aktywacji kaskad sygnalizacyjnych zaangażowanych w syntezę i odkładanie macierzy zewnątrzkomórkowej w mięśniakach macicy.

Leczenie progesteronem aktywowało złożone szlaki sygnalizacyjne transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β)/SMAD3 oraz stymulowało proliferację/wzrost i przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej w mięśniakach macicy poprzez selektywne zwiększanie ekspresji SMAD3, TGF- β RI/II, RhoA, VEGF, podczas gdy octan uliprystalu wywoływał adekwatnie przeciwne efekty hamujące.

Te dwa odrębne funkcjonalnie antagonizujące się mechanizmy działania progesteronu i octanu uliprystalu mogą wyjaśniać jego terapeutyczne działania hamujące na proliferację/wzrost mięśniaków macicy. Może to być bardzo istotne w dalszej pracy nad nową, ulepszoną strategią leczenia mięśniaków macicy za pomocą octanu uliprystalu.

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wstęp

Mięśniaki macicy są najczęstszymi łagodnymi nowotworami żeńskich narządów płciowych występującymi głównie u kobiet w wieku rozrodczym. Ze względu na objawy kliniczne tj. bóle podbrzusza, nadmierne krwawienia miesiączkowe i anemię są one najczęstszym wskazaniem do usunięcia macicy na świecie. Mięśniaki mają negatywny wpływ na implantację zarodka w macicy i zwiększają ryzyko poronienia przyczyniając się do niepłodności. Wzrost mięśniaków macicy jest zależny między innymi od jajnikowych hormonów steroidowych, progesteronu i estradiolu. Progesteron poprzez swoje receptory może regulować proliferację, apoptozę oraz akumulację macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednak dane dotyczące patogenezы tych nowotworów w dostępnym piśmiennictwie medycznym są wciąż niejasne, w wyniku czego brak jest skutecznej i nieinwazyjnej metody leczenia. Obecnie, jednymi z najbardziej obiecujących i skutecznych leków są selektywne modulatory receptora progesteronowego, w tym octan uliprystalu, który zmniejsza objawy kliniczne związane z bólem i krwawieniami miesiączkowymi, ale także zmniejsza objętość guza. Patogeneza, a także dokładne mechanizmy działania progesteronu i octanu uliprystalu w tych nowotworach nie są do końca poznane i wymagają dalszych analiz.

Cel

Celem pracy było zbadanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw działania octanu uliprystalu w mięśniakach macicy oraz tego, jak różnią się one od indukowanej progesteronem aktywacji kaskad sygnalizacyjnych zaangażowanych w syntezę i odkładanie się macierzy zewnątrzkomórkowej. Celem było również zbadanie mechanizmów wyjaśniających terapeutyczne działanie octanu uliprystalu w kontroli wzrostu mięśniaków macicy.

Materiały i metody

W badaniu przeanalizowano 250 tkanek mięśniaków macicy. Próbkę pobrano bezpośrednio po zabiegu operacyjnym od kobiet nieleczonych (n=100) oraz od kobiet leczonych (n=150) octanem uliprystalu przed zabiegiem. Terapia przedoperacyjna octanem uliprystalu trwała 3 miesiące w dawce 5 mg/dobę. Grupę kontrolną stanowiła prawidłowa mięśniówka macicy (n=100). Dodatkowo przeprowadzono eksperymenty na pierwotnych hodowlach komórkowych mięśniaków macicy (n=30) oraz na hodowlach eksplantów mięśniaków (n=30) i prawidłowej mięśniówki macicy (n=30). Hodowle komórkowe oraz

tkankowe były ekspozowane na octan uliprystalu, progesteron, inhibitor SMAD3, inhibitor TGF- β RI/II, VEGF, IL-6 i ich kombinacje. Poziom ekspresji genów zbadano przy użyciu metody RT-PCR. Do określenia lokalizacji białek wykorzystano metody immunocytochemiczne i immunohistochemiczne. Metodą ELISA zmierzono stężenie produkowanych białek. Żywotność komórek oceniano za pomocą metod kolorymetrycznych.

Wyniki

W mięśniakach macicy stwierdzono wysoką ekspresję jądrowego receptora progesteronowego, receptorów błonowych α , β i γ oraz składnika błonowego receptora progesteronu 1 (PGRMC1). Leczenie octanem uliprystalu obniżało ekspresję wszystkich analizowanych receptorów na poziomie mRNA i białka, z wyjątkiem receptora jądrowego oraz PGRMC2. Progesteron znacząco stymulował, podczas gdy octan uliprystalu hamował żywotność komórek mięśniaków macicy *in vitro*. Leczenie octanem uliprystalu odwracało efekty działania progesteronu. Octan uliprystalu, jak i progesteron regulował szlak sygnałowy TGF- β w mięśniakach macicy. Blokowanie receptorów TGF- β wzmacniało działanie octanu uliprystalu, podczas gdy inhibitor SMAD3 silnie hamował działanie progesteronu w mięśniakach macicy. Octan uliprystalu hamował translokację jądrową SMAD3. Progesteron znacząco podwyższył ekspresję VEGF, IL-6 i RhoA w mięśniakach macicy. Ponadto, inhibitor SMAD3 wzmacniał działanie octanu uliprystalu na komórki mięśniaków macicy *in vitro*.

Wnioski

Podsumowując, powyższe badania własne dostarczyły nowych funkcjonalnych dowodów na dwa różne mechanizmy działania, gdzie progesteron aktywował szlak sygnałowy TGF- β /SMAD3 i stymulował proliferację, wzrost i przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej w mięśniakach macicy. Octan uliprystalu wykazał nowe przeciwstawne działanie na proliferację i wzrost mięśniaków macicy oraz akumulację macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez szlak sygnałowy TGF- β /SMAD3, a mianowicie działając negatywnie poprzez SMAD3, TGF- β RI/II, RhoA i VEGF. Potencjalne nowe strategie terapeutyczne łączące octan uliprystalu z bezpośrednim bądź pośrednim celowaniem w macierz zewnątrzkomórkową mogą być skuteczniejszą i korzystniejszą strategią leczenia mięśniaków macicy. Taka terapia miałaby na celu zahamowania ich wzrostu i proliferacji, a także zablokowania syntezy i akumulacji macierzy zewnątrzkomórkowej.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Molecular mechanisms of progesterone and selective progesterone receptor modulator action in uterine leiomyomas

Introduction

Uterine leiomyomas (ULs) are the most common benign tumors of the female genital tract mainly affecting women in reproductive age. Due to clinical symptoms like lower abdominal pain, excessive menstrual bleeding and anemia, they are the most common indication for hysterectomy worldwide. ULs may cause impaired embryo implantation, recurrent pregnancy loss or infertility. ULs growth is dependent on the ovarian steroid hormones, progesterone and estradiol. Progesterone through its receptors can regulate the proliferation, apoptosis and accumulation of the extracellular matrix. However, data on the pathogenesis of these tumors in the available medical literature are still obscure, which cause a lack of effective and non-invasive medical treatment. At present, among the most promising and effective drugs for ULs are the selective progesterone receptor modulator, such as ulipristal acetate (UA) reduces the clinical symptoms associated with pain and metrorrhagia, but also shrinks significantly the tumor volume. The pathogenesis and precise mechanisms of progesterone and UA action in these tumors are not fully understood and require further analysis.

Objective

This laboratory-based study investigated the molecular mechanisms underlying the action of UA, as well as its distinct effects from the progesterone-induced activation of the signaling cascades involved in uterine leiomyomas in the deposition and growth of extracellular matrix. Among other aims, the mechanisms that explain the therapeutic effects of ulipristal acetate in the control of uterine leiomyomas growth were additionally investigated.

Materials and methods

This study analyzed n=250 ULs tissues. Samples were obtained immediately after surgery from untreated women (n=100) and from women treated with ulipristal acetate before the surgery. Pre-operative therapy with ulipristal acetate lasted 3 months at a dose of 5 mg/day. The control group was normal myometrium (n=100). In addition, experiments were performed on primary ULs cell cultures (n=30) and on ULs (n=30) and normal myometrium explants

cultures (n=30). Cell and tissue cultures were exposed to ulipristal acetate, progesterone, SMAD3 inhibitor, PGRMC1 inhibitor, TGF- β RI/II inhibitor, VEGF, IL-6 and combinations thereof. The level of gene expression was examined using the RT-PCR method. Immunocytochemical and immunohistochemical methods were used to determine the protein localization. The concentration of produced proteins was measured by ELISA. Cell viability was assessed by colorimetric methods.

Results

Up-regulated expression of nuclear progesterone receptor, membrane receptors α , β , γ and membrane component of progesterone receptor 1 (PGRMC1) was found in ULs. Treatment with ulipristal acetate decreased the expression of all analyzed receptors at the levels of mRNA and protein, except for the nuclear receptor and PGRMC2. *In vitro* treatment with progesterone significantly stimulated, whereas UA inhibited the viability of ULs primary cells. In addition, treatment with UA reversed the effects of progesterone. Treatment with both UA and progesterone regulated the TGF- β signaling pathway in ULs. Inhibition of TGF- β receptors enhanced the effects of UA, while the SMAD3 inhibitor strongly abolished the effects of progesterone in ULs. Moreover, UA inhibited the SMAD3 nuclear translocation. Progesterone significantly increased the expression of VEGF, IL-6, RhoA and COL1A1 in these tumors. In addition, SMAD3 inhibitor enhanced the UA effect on ULs cells *in vitro*.

Conclusion

Taken together, our data provided novel mechanistic insights into two distinct mechanisms of action, where P4 activated the TGF- β /SMAD3 signaling pathway and stimulated proliferation/growth and ECM remodeling in ULs. On the contrary, UA showed the novel opposite effects on the ULs proliferation/growth or ECM accumulations through TGF- β /SMAD3 signaling pathway, namely acting negatively through SMAD3, TGF- β RI/II, RhoA and VEGF. Potential novel therapeutic approaches combining UA with direct/indirect ECM targeting could be a more effective treatment strategy for ULs to inhibit their growth and proliferation, as well as to block the ECM synthesis and accumulation.

WYKAZ SKRÓTÓW

α -SMA – aktyna mięśni gładkich α

BMI – indeks masy ciała

C – kontrola (nieleczone mięśniaki macicy)

ECM – macierz pozakomórkowa

EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu

EGFR – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu

EMA – Europejska Agencja Leków

FGF2 – czynnik wzrostu fibroblastów 2

GnRH – gonadoliberyna

IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IFN- β 1, interferon β 1

IL-1 β – interleukina 1 β

IL-6 – interleukina 6

IL-6R – receptor interleukiny 6

IL-24 – interleukina 24

iSMAD3 – inhibitor SMAD3

iTGF- β RI/II – TGF- β receptor I/II inhibitor

JAK/STAT – kinaza Janus/przetwornik sygnału i aktywator transkrypcji

L – mięśniak macicy

LNG –IUD – wkładka wewnątrzmaciczna uwalniająca lewonorgestrel

M – prawidłowa mięśniówka macicy

MAPK – kinazy aktywowane mitogenami

MMP – metaloproteinazy

mPR α , błonowy receptor progesteronowy α

mPR β , błonowy receptor progesteronowy β

mPR γ , błonowy receptor progesteronowy γ

MRgFUS – zogniskowane ultradźwięki sterowane obrazowaniem rezonansem magnetycznym

NT-L – nieleczone mięśniaki macicy

P4 – progesteron

P4-L – mięśniaki macicy leczone progesteronem

PCNA – antygen jądrowy komórek proliferujących

PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu

PGR – jądrowy receptor progesteronowy

PGRA – podjednostka A jądrowego receptora progesteronowego

PGRB – podjednostka B jądrowego receptora progesteronowego

PGRMC1 – komponent błonowy receptora progesteronowego 1

PGRMC2 – komponent błonowy receptora progesteronowego 2

PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu

pSMAD3 – fosforylowany SMAD3

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β

TGF- β 1 – transformujący czynnik wzrostu β 1

TGF- β 3 – transformujący czynnik wzrostu β 3

TGF- β R1 – receptor 1 transformującego czynnika wzrostu β

TGF- β R2 – receptor 2 transformującego czynnika wzrostu β

TIMP – tkanowe inhibitory metaloproteinaz

TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α

UA – octan uliprystalu

UA-L – mięśniaki leczone octanem uliprystalu

UAE – embolizacja tętnic macicznych

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

VEGFA – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego A

VEGFB – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego B

VEGFC – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego C

VEGFR2 – receptor 2 czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego

1. WSTĘP

1.1. Mięśniaki macicy – wprowadzenie

Mięśniaki macicy są najczęstszymi łagodnymi nowotworami żeńskich narządów płciowych [1]. Guzy te są zbudowane z komórek mięśni gładkich, tkanki łącznej oraz nadmiernie akumulowanej macierzy zewnątrzkomórkowej [2]. Mięśniaki to guzy monoklonalne, rozwijające się z pojedynczej, zmienionej komórki mięśniówki macicy, mięśniówki naczyń lub fibromioblastu [2]. Transformacja komórki macierzystej prawidłowej mięśniówki macicy następuje na skutek zmian genetycznych oraz działania hormonów steroidowych. Pod wpływem czynników środowiskowych oraz biologicznych mediatorów tj. czynników profibrotycznych oraz angiogenezy dochodzi do różnicowania komórek w kierunku mięśniaka macicy, a następnie do uformowania guza [3].

Częstość występowania mięśniaków macicy jest bardzo zróżnicowana w zależności od wieku kobiet i badanej grupy: wzrasta wraz z wiekiem w okresie rozrodczym, natomiast w okresie pomenopauzalnym guzy te najczęściej ulegają atrofii [1, 4].

Klinicznie rozpoznanie mięśniaków macicy można ustalić na podstawie wywiadu i badania ginekologicznego oraz potwierdzić w badaniu ultrasonograficznym lub rezonansie magnetycznym. W badaniu ultrasonograficznym mięśniaki obrazują się zarówno jako ogniska hipo- jak i hiperechogeniczne w zależności od zawartości mięśni gładkich i tkanki łącznej w obrębie guza [5].

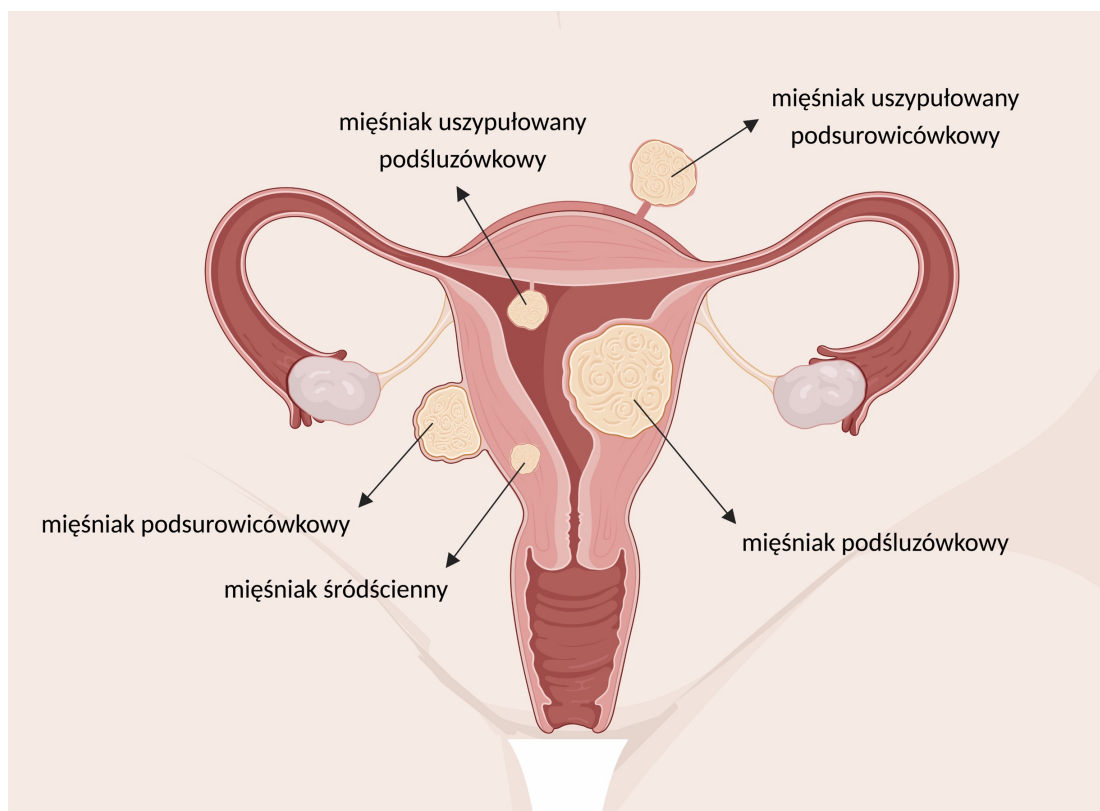
Mięśniaki macicy często przebiegają bezobjawowo, ale również mogą być przyczyną obfitych krwotocznych miesiączek, bólów w podbrzuszu, niepłodności, poronień i porodów przedwczesnych [3, 6].

1.1.2. Obraz kliniczny

Mięśniaki macicy są klasyfikowane w zależności od lokalizacji: podsurowicze (wystające poza macicę), śródścienna (w mięśniówce macicy) i podśluzówkowe (wystające do jamy macicy) (**Rycina 1**). Na objawy i możliwości leczenia ma wpływ wielkość, liczba i lokalizacja guzów [7]. Wiele mięśniaków macicy przebiega bezobjawowo. Najczęściej są one wtedy rozpoznawane przypadkowo podczas

rutynowych badań wykonywanych z innych wskazań. Bezobjawowe mięśniaki nie wymagają leczenia ani częstych kontroli [8, 9]. Jednakże, 30-40% pacjentek doświadcza uporczywych objawów klinicznych wymagających leczenia [10]. Najczęstszym objawem klinicznym mięśniaków macicy jest nieprawidłowe krwawienie z macicy, zwykle obfite krwawienie miesięczkowe z późniejszą anemią, która może zagrażać życiu [6, 11]. Duże mięśniaki mogą również powodować objawy uciskowe na sąsiadujące struktury co prowadzi do dysfunkcji jelit i pęcherza moczowego, objawiającej się zaparciami, zwiększonym parciem na mocz, zwiększoną częstością oddawania moczu w ciągu dnia oraz nietrzymaniem moczu [12]. Pacjentki bardzo często zgłaszają również bolesne miesiączkowanie i ból w okolicy miednicy, co negatywnie wpływa na jakość życia i upośledza codzienne czynności [13].

Niepłodność i nawracające poronienia również mogą być objawami mięśniaków, szczególnie w przypadku mięśniaków podśluzówkowych i śródściennych zniekształcających jamę macicy [14, 15]. Mięśniaki mogą upośledzać płodność poprzez kilka możliwych mechanizmów, w tym: (1) zmianę miejscowej anatomii (anatomiczne zniekształcenie jamy macicy), z późniejszymi zmianami funkcji endometrium, (2) zmiany czynnościowe, takie jak zwiększona kurczliwość macicy i upośledzenie ukrwienia endometrium i mięśniówki macicy oraz (3) zmiany w lokalnym środowisku hormonalnym i 17arokryny zmiany molekularne wywołane przez mięśniaki, które mogą upośledzać transport gamet i/lub zmniejszyć implantację blastocysty [16-19]. Duże retrospektywne badanie kobiet z mięśniakami macicy wykazało istotnie zwiększone ryzyko cesarskiego cięcia w porównaniu z grupą kontrolną, a także wzrost ryzyka ułożenia pośladowego, przedwczesnego pęknięcia błon płodowych, porodu przed 37. Tygodniem ciąży oraz wewnątrzmacicznej śmierci płodu z ograniczeniem wzrostu [20]. Z tego powodu mięśniaki macicy u kobiet w ciąży są wskazaniem do wzmożonego nadzoru nad matką i płodem. W okresie poporodowym kobiety z mięśniakami macicy są bardziej narażone na krwotok poporodowy wtórny do zwiększonego ryzyka atonii macicy [21].



Rycina 1. Typy mięśniaków macicy. Utworzono za pomocą BioRender.com.

1.1.2. Epidemiologia i czynniki ryzyka

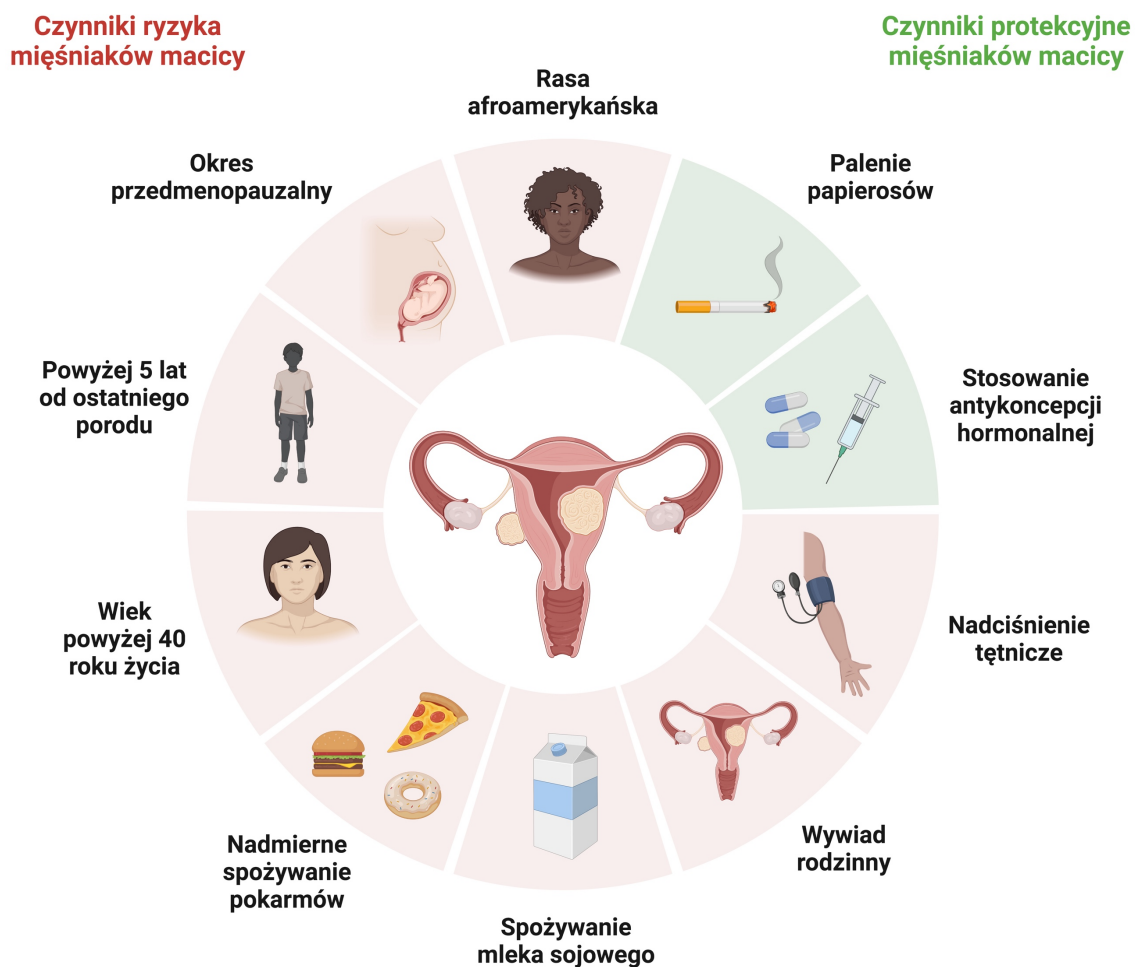
Mięśniaki macicy są to najczęstsze łagodne nowotwory żeńskich narządów płciowych [1]. Częstość występowania mięśniaków macicy jest bardzo zróżnicowana. W badaniach epidemiologicznych obserwowano od 4,5% do 68,6% kobiet z mięśniakami macicy [22]. Nie stwierdzono spójnych powiązań między częstością występowania, a krajem/regionem, metodologią badania lub badaną populacją [1, 22].

Współczynniki chorobowości mięśniaków macicy oscylowały w szerokim zakresie od 217 do 1348 przypadków na 100 000 kobiet w badaniu California Teachers Study oraz w badaniu Nurses' Health Study II, w których tylko 3% i 1% uczestniczek było czarnoskórych [4, 23]. Natomiast w badaniu Black Women's Health Study współczynnik chorobowości wynosił 3745 przypadków na 100 000 kobiet [24, 25].

Analizy czynników ryzyka wykazały, że u czarnoskórych kobiet ryzyko rozwoju mięśniaków macicy dwu-, trzykrotnie przewyższa ryzyko rozwoju, w porównaniu

do kobiet rasy białej [4, 23, 26]. Istotnymi czynnikami ryzyka rozwoju mięśniaków macicy są wiek powyżej 40 roku życia, rodzinne występowanie mięśniaków macicy, czas powyżej 5 lat od ostatniego porodu, okres pomenopauzalny, nadciśnienie tętnicze, nadmierne spożywanie pokarmów oraz spożywanie mleka sojowego [23, 25, 27-30]. Palenie, zwłaszcza u kobiet z niskim wskaźnikiem masy ciała (BMI, ang. *Body Mass Index*), stosowanie antykoncepcji doustnej i domięśniowej oraz hormonalnej wewnątrzmacicznej zmniejsza ryzyko rozwoju mięśniaków macicy (**Rycina 2**) [29, 31, 32].

W skali całego świata mięśniaki są najczęstszym wskazaniem do usunięcia macicy, czyli histerektomii. Rocznie z powodu mięśniaków macicy tylko w samych Stanach Zjednoczonych Ameryki wykonuje się blisko 200 000 histerektomii i 30 000 miomektomii [33].



Rycina 2. Czynniki chroniące i czynniki ryzyka mięśniaków macicy. Utworzono za pomocą BioRender.com.

1.2. Patomorfologia mięśniaków macicy

1.2.1. Budowa histologiczna

Mięśniaki macicy są łagodnymi guzami pochodzenia monoklonalnego zbudowanymi ze zmienionych komórek mięśni gładkich, fibroblastów, naczyń krwionośnych oraz nadmiernie akumulowanej macierzy pozakomórkowej zawierającej kolagen, fibronektynę i proteoglikany [34-37]. Budowa histologiczna mięśniaków różni się składem macierzy zewnątrzkomórkowej, stosunkiem ilości macierzy zewnątrzkomórkowej do liczby komórek, aktywnością mitotyczną komórek, obecnością atypii komórkowej oraz zawartością dodatkowych elementów (np. komórki tłuszczowe) [38].

Komórki mięśni gładkich wchodzące w skład guza przypominają w badaniu mikroskopowym prawidłowe komórki mięśniówki macicy. Komórki te mają kształt wrzecionowaty, wydłużone jądra z małym jąderkiem, kwasochłonną cytoplazmę i niewyraźne granice [39]. Komórki budujące mięśniaki układają się w wiązki wzajemnie przeplatające się [39]. W komórkach prawidłowej mięśniówki macicy podstawowym elementem kurczliwym są miofibryle ułożone w sposób regularny, natomiast w komórkach mięśniakach ich ułożenie jest zdezorganizowane [40].

Dobrze unaczyniona tkanka łączna stanowi podścielisko mięśniaków macicy. Przestrzeń pomiędzy komórkami wypełnia macierz pozakomórkowa, która tworzy rusztowanie utrzymujące strukturę mięśniaka [41]. Składniki macierzy wiążąc się wzajemnie tworzą mocną, elastyczną strukturę tkanki. Poprzez oddziaływania komórka-macierz, modulowanie zewnątrzkomórkowych sygnałów oraz magazynowanie czynników wzrostu wywierają wpływ na funkcjonowanie otaczających komórek [41].

1.2.2. Ultrastruktura mięśniaków macicy

Badania zidentyfikowały pewne cechy ultrastrukturalne, które mogą odróżnić mięśniaka gładkiego macicy od mięśniówki macicy. Należą do nich sarcolemma, kaweole, macierz zewnątrzkomórkowa, miofilamenty i włókna pośrednie. W Tabeli I zostały przedstawione cechy ultrastrukturalne odróżniające mięśniaki macicy od prawidłowej mięśniówki macicy.

Tabela I. Cechy ultrastrukturalne mięśniaka macicy w porównaniu do prawidłowej mięśniówki macicy.

CECHA ULTRASTRUKTURALNA	MIĘŚNIAK MACICY	MIĘŚNÍÓWKA MACICY	ŹRÓDŁO
Sarcolemma - błona komórkowa komórki włókien mięśni poprzecznie prążkowanych	Pasma sarkolemmy gęstsze oraz znacznie dłuższe w mięśniakach i mięśniówce pochodzącej z macicy mięśniakowatej	Pasma sarolemmy rzadsze i krótsze niż mięśniakach macicy	[42]
Kaweole - 50-100 nm wgłobienia błony plazmatycznej o kształcie omega (Ω)	Mniejsza liczba kaweoli w mięśniakach i mięśniówce pochodzącej z macicy mięśniakowatej	Większa liczba kaweoli niż w mięśniakach macicy	[42]
Macierz zewnątrzkomórkowa	W mięśniaku macicy włókna kolagenu	W mięśniówce macicy struktura kolagenu jest	[43] [40]

	są luźno upakowane, nieuporządkowane	uporządkowana z ciasnymi wiązkami	
Miofilamenty i włókna pośrednie - kurczliwe elementy włókna mięśniowego	Miofilamenty i włókna pośrednie zdezorganizowane	Miofilamenty i włókna pośrednie były uporządkowane i wyrównane	[40]

1.3. Macierz pozakomórkowa

Kolageny są kluczowymi składnikami strukturalnymi macierzy pozakomórkowej utrzymującymi morfologię komórkową. Oprócz roli w gojeniu ran i włóknieniu, kolageny regulują migrację, proliferację, różnicowanie i przeżycie komórek przekazując sygnały poprzez receptory powierzchniowe komórek, w tym integryny [44, 45]. Komórki mięśniaków macicy mają zwiększoną ekspresję kolagenów, a ich struktura i orientacja w guzach są zaburzone [34, 43, 46].

Innymi elementem niezbędnym w tworzeniu struktury macierzy pozakomórkowej, których nadekspresję obserwujemy w mięśniakach macicy jest fibronektyna zapewniająca przyłączanie komórek do składników macierzy pozakomórkowej poprzez oddziaływanie z receptorami błonowymi, a także laminina odgrywająca ważną rolę w migracji, adhezji, wzroście i różnicowaniu komórek oraz w tworzeniu struktury macierzy pozakomórkowej [47, 48]. Innym składnikiem macierzy pozakomórkowej istotnym w patogenezie mięśniaków macicy jest fibulina, która odgrywa ważną rolę w morfologii, wzroście, adhezji i ruchliwości komórek [49]. Fibulina-3 działa jako antagonist angiogenezy [50]. Obniżenie ekspresji genu kodującego fibulinę-3 tj. EFEMP1, które jest obserwowane w mięśniakach macicy i związana z tym utrata białka fibuliny-3 może być związana ze zwiększoną angiogenezą obserwowaną w tych guzach [51].

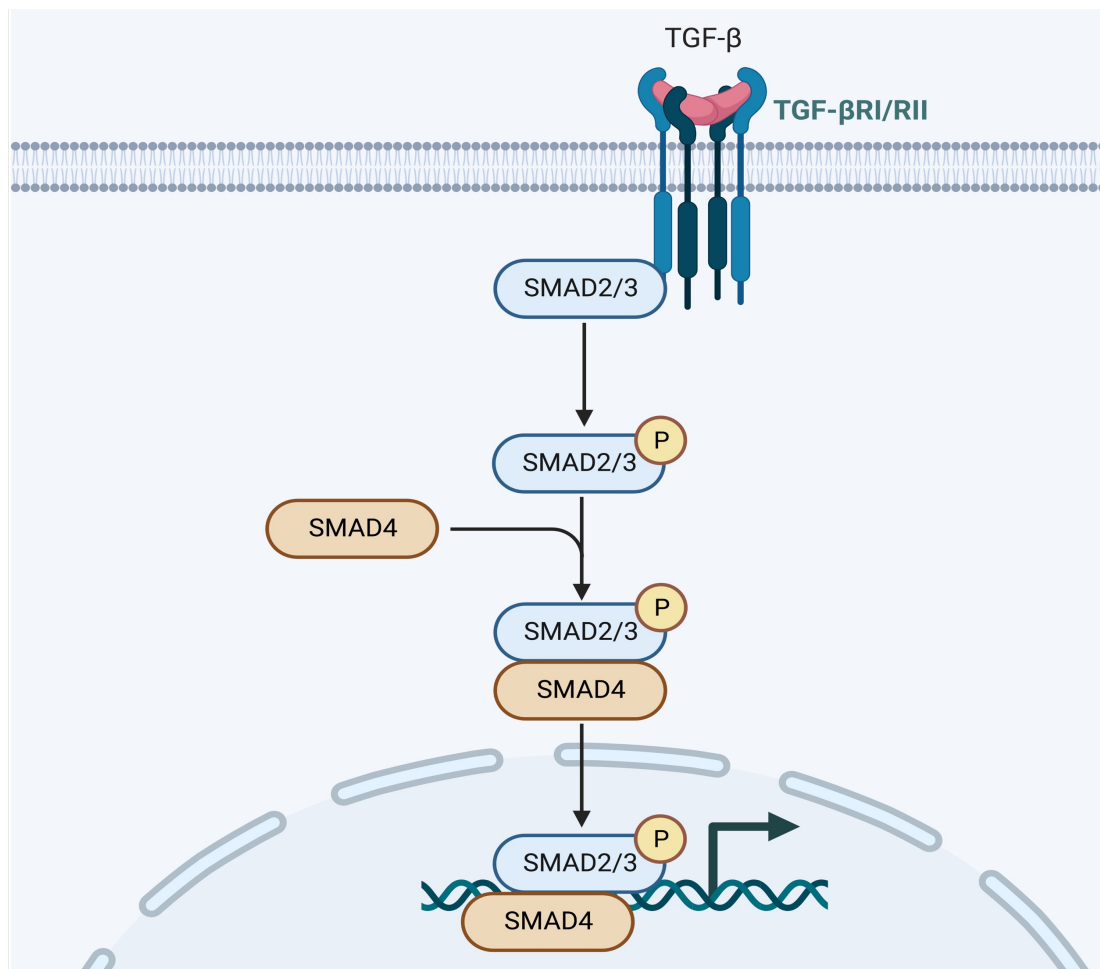
Ważnym składnikiem macierzy pozakomórkowej są proteoglikany odpowiadające za utrzymanie struktury i napięcia macierzy. Dotychczasowe badania wykazały podwyższoną zawartość siarczanu chondroityny, siarczanu dermatanu, siarczanu keratyny, wersikanu oraz fibromoduliny w mięśniakach macicy w porównaniu do prawidłowej mięśniówki macicy [46, 52-55].

W przeciwieństwie do proteoglikanów, ekspresja dekoryny w mięśniakach macicy jest istotnie niższa niż w prawidłowej mięśniówce macicy [56, 57]. Dekoryna może działać jako antagonist szlaku sygnalizacyjnego transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β , ang. *transforming growth factor β*). Jej obniżona ekspresja może powodować zwiększoną aktywację sygnalizacji TGF- β w mięśniakach macicy, która jest ważnym szlakiem w procesie włóknienia [58].

1.3.1. Transformujący czynnik wzrostu β

TGF- β jest to polipeptyd charakteryzujący się plejotropowymi właściwościami, który w istotny sposób przyczynia się do kontroli apoptozy, angiogenezy, gojenia ran, regulacji immunologicznej i biologii nowotworów [59]. TGF- β składa się z trzech izoform: TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3, które oddziałują na komórkę poprzez receptory błonowe TGF- β R1 i TGF- β R2 [60]. W przeciwieństwie do innych cytokin, TGF- β jest wydzielany w postaci latentnej, która może być aktywowana przez różne mechanizmy w celu wywarcia swojego działania. Latencja jest prawdopodobnie niezbędna ze względu na wszechobecną ekspresję receptorów dla TGF- β [59]. TGF- β początkowo wiąże się z receptorem typu II. Następnie kompleks ligand-receptor typu II łączy się z receptorem typu I, w wyniku czego powstaje kompleks dwóch cząsteczek TGF- β R1 i TGF- β R2. Aktywowany receptor fosforyluje białka sygnalizacyjne SMAD2/3. Aktywacja SMAD2/3 powoduje utworzenie heterokompleksu z białkiem SMAD4, który przedostając się do jądra komórkowego reguluje ekspresję TGF- β -zależnych genów (**Rycina 3**). TGF- β może działać również poprzez szlaki niezależne od białek SMAD np. RhoA-Rac-cdc42 [61].

Według wielu badaczy TGF- β jest jednym z najistotniejszych czynników wzrostu mięśniaków macicy, a izoforma TGF- β 3 jest uważana za najważniejszą w biologii mięśniaków macicy [35, 62, 63]. Najnowsze badania wykazały, że TGF- β 3 jest jednym z nielicznych czynników wzrostu, które występują w tych guzach w znacznie wyższych stężeniach niż pozostałe [63]. Komórki mięśniaków macicy w badaniach wykazały wzrost ekspresji TGF- β 3 w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy [36, 63]. TGF- β 3 może bezpośrednio oddziaływać na tkankę prawidłowej mięśniówki macicy i wywoływać te same procesy, które zachodzą w mięśniakach macicy [63]. Izofoma TGF- β 3 odgrywa największą rolę w nadprodukcji macierzy pozakomórkowej poprzez stymulację ekspresji kolagenu typu I, fibronektyny, lamininy i proteoglikanów [36, 43, 64, 65].



Rycina 3. Schemat sygnalizacji TGF-β przez SMAD2/3. Utworzono za pomocą BioRender.com.

1.3.2. Metaloproteinazy i ich inhibitory

Mięśniaki macicy wykazują również ekspresję enzymów proteolitycznych, takich jak metaloproteinazy macierzy (MMP, ang. *matrix metalloproteinases*) i tkankowe inhibitory MMP (TIMP, ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*), które odgrywają kluczową rolę w przebudowie macierzy pozakomórkowej [46, 66]. Wśród badanych MMP ekspresja MMP-1, -2, -3, -9, -11, -14, -16 i -24 jest podwyższona, natomiast ekspresja MMP-7, -19 i -25 jest obniżona w mięśniakach macicy [46, 67-70]. Obecne badania sugerują, że MMP to nie tylko proteazy degradujące macierz pozakomórkową. Enzymy te uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych, w tym migracji, różnicowaniu, wzroście, odporności wrodzonej i adaptacyjnej, stanach zapalnych, angiogenezie oraz apoptozie [71]. Niektóre MMP są przeciw włóknieniowe, podczas gdy inne mogą pełnić funkcje profibrotyczne [72]. MMP mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na funkcje różnych cytokin, które odgrywają rolę w procesach zapalnych i naprawczych, w tym czynnik wzrostu śródbłoka naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) i TGF- β [73, 74]. MMP mogą również regulować biodostępność czynników angiogennych sekwestrowanych przez macierz pozakomórkową.

Badania wskazują, że akumulacja i funkcja macierzy pozakomórkowej jest regulowana przez czynniki wzrostu, cytokiny i hormony steroidowe [63, 75, 76]. Macierz pozakomórkowa wiąże i sekwestruje czynniki wzrostu, aby promować ich stabilność, a także ograniczać ich aktywność. Poprzez degradację składników macierzy pozakomórkowej, MMP i inne enzymy proteolityczne uwalniają czynniki wzrostu i wyzwalają aktywację wielu szlaków transdukcji sygnału. Macierz pozakomórkowa może pełnić rolę zarówno rezerwuaru czynników wzrostu, jak i modulatora ich działania [71].

1.4. Proces włóknienia

Zwłóknienie jest inicjowane przez stan zapalny w obecności lub braku zmian genetycznych. Rozwój mięśniaka macicy jest konsekwencją nieprawidłowej odpowiedzi zapalnej [77]. Czynniki wzrostu, cytokiny i hormony steroidowe są wytwarzane w miejscu urazu i przyczyniają się do aktywacji i różnicowania fibroblastów w miofibroblasty, przy czym miofibroblasty prawdopodobnie odgrywają kluczową rolę w procesie zwłóknienia [78]. Mięśniaki macicy zbudowane są z komórek dodatnich i ujemnych względem alfa aktyny mięśni gładkich (α -SMA, ang. *Smooth muscle α actin*), a także dużej ilości kolagenu, co wskazuje na obecność miofibroblastów i ich rolę w odkładaniu się macierzy pozakomórkowej [78]. W wieku rozrodczym owulacja, miesiączka i implantacja zarodka mogą powodować fizjologiczne uszkodzenia macicy. Siły mechaniczne, niedotlenienie i stres oksydacyjny mogą powodować przewlekły stan zapalny w macicy [77, 79]. W stanie zapalnym związanym z urazem miofibroblasty wytwarzają składniki macierzy pozakomórkowej w celu przywrócenia homeostazy, a następnie powinny zostać wyeliminowane przez apoptozę [80]. Jednak podczas przewlekłego stanu zapalnego miofibroblasty stają się odporne na eliminację na drodze apoptozy i wytwarzają nadmierne ilości składników macierzy pozakomórkowej, co prowadzi do patologicznego zwłóknienia. TGF- β odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu miofibroblastów podczas procesu zwłóknienia [63, 78].

1.5. Progesteron i receptory progesteronowe w biologii mięśniaków macicy

1.5.1. Progesteron i jego rola w biologii mięśniaków macicy

Występowanie mięśniaków macicy u kobiet w wieku rozrodczym oraz niski odsetek wykrywania tych guzów u kobiet w okresie postmenopauzalnym wskazuje na kluczową rolę steroidów jajnikowych w ich rozwoju i wzroście [81]. W przeszłości estradiol był uważany za główny czynnik rozwoju mięśniaków. Jego rola w tym procesie została dość dobrze poznana i opisana [82]. Badania kliniczne, molekularne jak i immunohistochemiczne wskazują, że to jednak progesteron i jego receptory są krytycznym czynnikiem w rozwoju mięśniaków macicy, a rola estrogenów może polegać na zwiększaniu wrażliwości tkanek na progesteron, zwiększając ilość receptorów dla progesteronu w komórkach [83-85].

Obserwacje kliniczne wskazują, że w pierwszym trymestrze ciąży mięśniaki macicy zwiększają swoją objętość. Efekt ten można przypisać ekspozycji na wysokie stężenia progesteronu dominujące w tym okresie [86]. U kobiet z mięśniakami macicy podawanie progesteronu powodowało wzrost wielkości oraz aktywności mitotycznej guzów [83]. Aktywność mitotyczna komórek mięśniaków macicy w fazie lutealnej jest wyższa w porównaniu do fazy proliferacyjnej [87]. Ekspozycja komórek mięśniaków macicy na progesteron w hodowli komórkowej powodowała wzrost ekspresji markera proliferacji (PCNA, ang. *proliferating cell nuclear antigen*) [88, 89]. W tkance mięśniaków w fazie lutealnej podobnie wzrastał odsetek komórek wykazujących ekspresję tego markera w porównaniu do fazy folikularnej [88].

Progesteron stymuluje proliferację komórek mięśniaków macicy zwiększając ekspresję naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*), ale wcześniej to estradiol pobudza ekspresję receptora dla tej cytokiny (EGF-R, ang. *epidermal growth factor receptor*) [89]. Progesteron hamuje apoptozę w komórkach mięśniaków poprzez zwiększanie ekspresji Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*). Ekspresja tego białka jest najwyższa w fazie lutealnej, w obecności progesteronu [89].

Wykazano, że stymulowanie pierwotnych hodowli komórek prawidłowej mięśniówki macicy i mięśniaków macicy octanem medroksyprogesteronu (syntetycznym wariantem progesteronu) stymulowało wydzielanie TGF- β 1,

a najwyższy poziom ekspresji TGF- β 3 obserwowano w mięśniakach macicy ze środkowej fazy wydzielniczej cyklu miesięczkowego [35, 90]. W badaniach nad wpływem progesteronu na ekspresję dekoryny w mięśniakach w porównaniu z prawidłową tkanką mięśniówki macicy w różnych etapach cyklu miesięczkowego, wykazano obniżoną ekspresję dekoryny w tkankach mięśniaków pochodzących z fazy wydzielniczej w porównaniu z fazą proliferacyjną [57]. Wyniki te sugerują hamujący wpływ progesteronu na ekspresję dekoryny w tych guzach [57]. Progesteron zmniejsza również ekspresję dekoryny w komórkach mięśniaków macicy w porównaniu z grupą kontrolną [57]. Ponieważ dekoryna hamuje aktywność TGF- β , jej obniżony poziom w mięśniakach macicy może zwiększać odkładanie macierzy pozakomórkowej poprzez zwiększenie aktywności TGF- β [91].

Progesteron jest w stanie wywoływać szybkie efekty, inicjowane przez receptory błonowe, niezależne od transkrypcji genów, które zmieniają produkcję wtórnych przekaźników zaangażowanych w szlaki transdukcji sygnalizacji komórkowej [10]. W szlaku PI3K/AKT pośredniczy progesteron, który poprzez swoje receptory może szybko aktywować ten szlak, coraz częściej uważany za potencjalnego promotora wzrostu mięśniaków macicy [92]. Negatywnym regulatorem AKT jest PTEN [93]. Wykazano, że w mięśniakach pochodzących od kobiet w wieku rozrodczym, aktywność fosforylowanego PTEN (p-PTEN) jest znacznie mniejsza w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy [93]. W tkankach kobiet po menopauzie zawartość p-PTEN nie różniła się w mięśniakach od prawidłowej mięśniówki, co podkreśla rolę progesteronu w regulacji p-PTEN i pAKT [93].

Progesteron może modulować ekspresję białek sygnałowych tj. czynników wzrostu związanych z proliferacją i apoptozą komórek mięśniaków macicy, jednakże geny te nie zostały jeszcze w pełni zidentyfikowane ani zbadane funkcjonalnie [83, 84, 94]. Progesteron odgrywa kluczową rolę w biologii mięśniaków macicy, ale mechanizm, za pomocą którego promuje proliferację, profil zaangażowanych genów i sposób, w jaki reguluje szlaki sygnałowe czynników wzrostu wymaga głębszego zbadania.

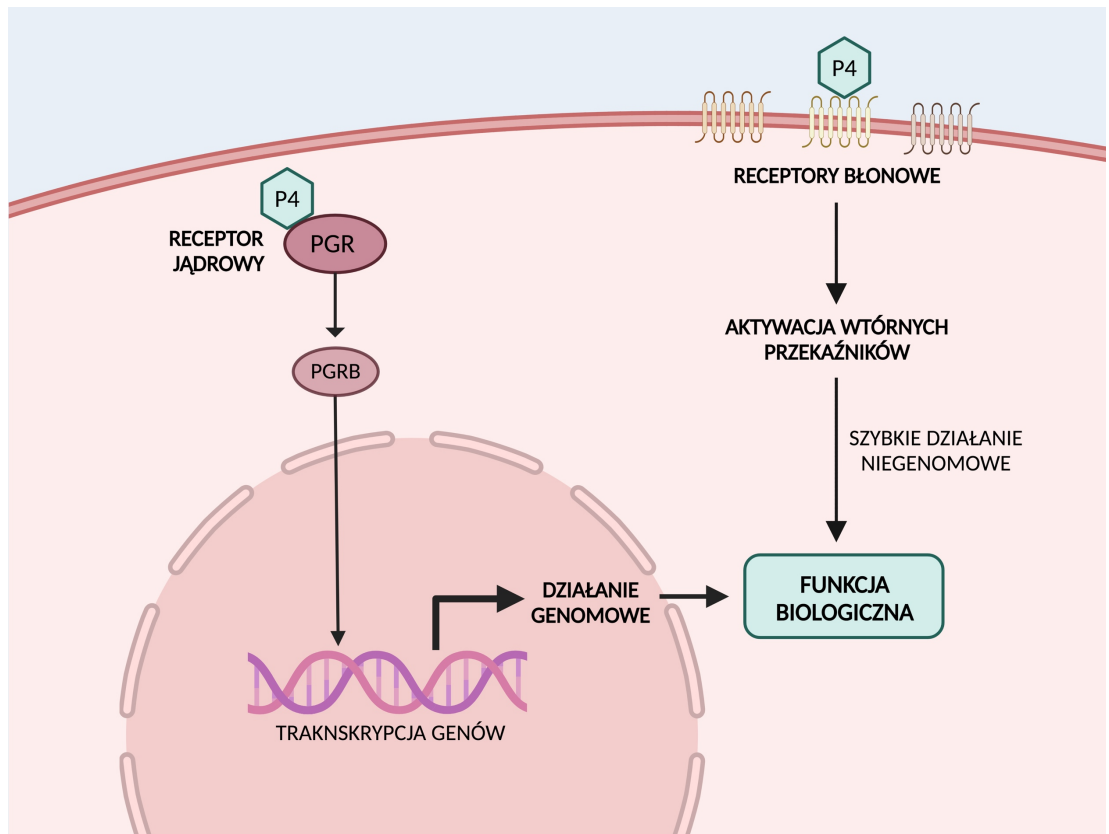
W tkankach progesteron wywiera swoje efekty poprzez aktywację receptorów cytoplazmatycznych i błonowych. Co najmniej 9 receptorów opisano dla tego steroidu.

Mechanizm molekularny działania progesteronu oraz udział poszczególnych receptorów w rozwoju mięśniaków macicy nie został poznany.

1.5.2. Receptory progesteronowe i ich rola w biologii mięśniaków macicy

Progesteron oddziałuje na komórki aktywując receptory cytoplazmatyczne i błonowe. Co najmniej dziewięć receptorów aktywowanych progesteronem zostało opisanych, co świadczy o bardzo złożonym mechanizmie jego działania [95]. Najczęściej analizowane są efekty wywierane za pośrednictwem dwóch izoform receptora progesteronowego: izoformy A (PGRA) oraz izoformy B (PGRB). Izoformy po przyłączeniu progesteronu są transportowane do jądra komórkowego, gdzie jako czynniki transkrypcyjne łączą się z promotorami genów oraz z koregulatorami transkrypcyjnymi modulując ekspresję wybranych genów (**Rycina 4**) [96]. Receptory progesteronowe mogą także oddziaływać z kinazami tyrozynowymi Src w cytoplazmie aktywując kinazy aktywowane mitogenami (MAPKs; ang. *mitogen-activated protein kinases*) i dopiero te wywierają efekty genomowe [97]. Każda z izoform wywiera inne specyficzne efekty. Zarówno izoforma PGRA, jak i PGRB wykazuje zwiększoną ekspresję w tkankach mięśniaków macicy w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy [88, 98, 99]. Ekspresja PGRB w tkance mięśniaka były bezpośrednio związane z liczbą mięśniaków, ale odwrotnie skorelowane z nasileniem objawów. Receptory PGRB dominują w mięśniakach macicy [100]. Co więcej, PGRB działa jako aktywator transkrypcji genów reagujących na progesteron, podczas gdy PGRA działa jako inhibitor receptorów hormonów steroidowych [101].

Progesteron wywiera również efekty pozagenomowe za pośrednictwem swoich receptorów błonowych. Rola receptorów błonowych jest jak dotychczas słabo poznana [102]. Dotychczas opisane receptory to: mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ , mPR ϵ , PGRMC1 i PGRMC2. Aktywacja tych receptorów wywołuje zmiany w błonie komórkowej i cytoplazmie poprzez wpływ na kanały jonowe, regulowanie stężenia wtórnych przekaźników czy aktywację kinaz. Efekt działania tych receptorów jest bardzo szybki (**Rycina 4**). Receptory te uczestniczą również w regulacji proliferacji oraz apoptozy [103].



Rycina 4. Działanie progesteronu w komórce. Utworzono za pomocą BioRender.com.

1.6. Octan uliprystalu - selektywny modulatory receptora progesteronowego

Po ustaleniu kluczowej roli progesteronu we wzroście i rozwoju mięśniaków, można wpływać na jego szlak za pomocą selektywnych modulatorów receptora progesteronowego [104, 105]. Jest to nowa klasa syntetycznych ligandów wykazująca działanie agonistyczne/antagonistyczne/antagonistyczno-agonistyczne selektywnie w różnych tkankach [106]. Ich wiązanie umożliwia tym receptorom interakcję z koaktywatorami i/lub korepresorami, a dodatkowo wpływa na to obecność koregulatorów w określonym typie komórek, co będzie determinować, czy selektywny modulator receptora progesteronowego działa bardziej jako agonista czy antagonistą [104, 106].

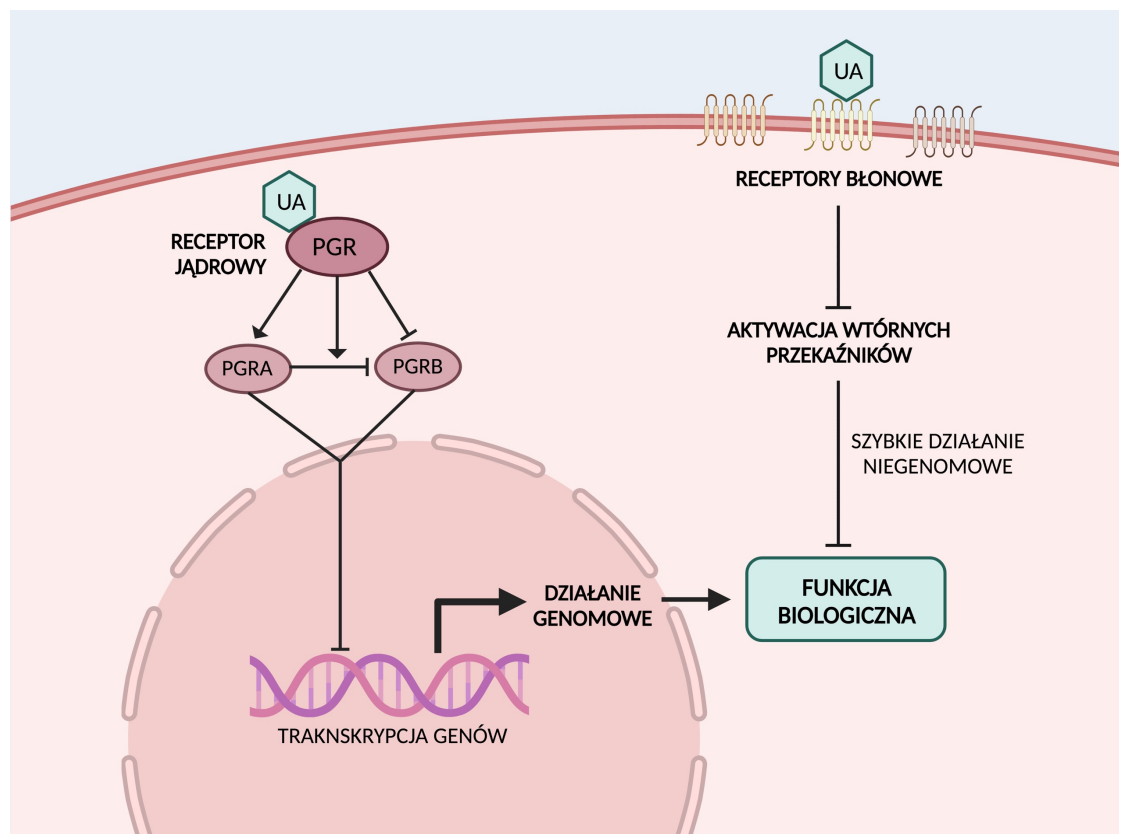
Obecnie w leczeniu farmakologicznym mięśniaków macicy najbardziej obiecującym selektywnym modulatorem receptora progesteronowego był octan uliprystalu. Badania kliniczne wykazały, że leczenie octanem uliprystalu zmniejsza objętość mięśniaków macicy i częstość krwawień z jamy macicy nie powodując przy tym istotnych działań niepożądanych [107]. Przedoperacyjne podawanie octanu uliprystalu umożliwia wykonanie miomektomii, a kobiety mogą uniknąć operacji całkowitego usunięcia macicy i zachować płodność [107]. Octan uliprystalu jest równie skuteczny w leczeniu mięśniaków macicy jak analogi hormonu uwalniającego gonadotropiny (GnRH, ang. *gonadotropin-releasing hormone*), ale w odróżnieniu od nich nie powoduje obniżenia stężenia estrogenów we krwi, a co za tym idzie poważnych działań niepożądanych np. utraty masy kostnej czy objawów menopauzy [107, 108].

Octan uliprystalu podawany jest doustnie i charakteryzuje się tkankowo specyficznym, częściowym działaniem antagonistycznym na receptory progesteronowe [106]. Octan uliprystalu łącząc się z receptorem progesteronowym hamuje transkrypcję genów przyłączając do kompleksu receptor-ligand korepresory (**Rycina 5**). Ekspozycja tkanek na octan uliprystalu reguluje ekspresję receptorów progesteronowych w hodowlach komórkowych, zarówno izoformy A jak i B [109]. PGRB działa jako aktywator transkrypcji genów reagujących na progesteron, podczas gdy PGRA działa jako inhibitor receptorów hormonów steroidowych [101]. Uliprystal wykazuje głównie aktywność antagonistyczną w stosunku do izoformy PGRB i agonistyczną w stosunku do izoformy PGRA [100]. Ponadto, leczenie octanem

uliprystalu zwiększyło ekspresję izoformy PGRA i obniżyło PGRB w komórkach mięśniaków, ale nie w komórkach prawidłowej mięśniówki macicy [100].

Efekty działania octanu uliprystalu się być związane również z wywieraniem wpływu na naczynia w guzie poprzez hamowanie ekspresji VEGF i jego receptorów. Ważnym efektem może być również wpływ na ekspresję MMPs i ekspresję TIMPs co powoduje zahamowanie gromadzenia się macierzy w tkankach guza [110, 111]. Octan uliprystalu nie wpływa znacząco na stężenie estradiolu produkowanego przez jajnik oraz nie wykazuje aktywności antyglukokortykosteroidowej [108].

Mimo wielu badań dokładny mechanizm molekularny działania uliprystalu w mięśniakach macicy nie został dotychczas opisany.



Rycina 5. Działanie octanu uliprystalu w komórce. Utworzono za pomocą BioRender.com.

1.7. Leczenie

1.7.1. Leczenie chirurgiczne

Obecne strategie postępowania obejmują głównie interwencje chirurgiczne. Wybór leczenia zależy od wieku pacjentki i chęci zachowania płodności lub uniknięcia „radykalnej” operacji, takiej jak histerektomii, czyli zabiegu całkowitego usunięcia macicy [17, 112]. Inne metody chirurgiczne obejmują miomektomię przez histeroskopię, miomektomię przez laparotomię lub laparoskopię oraz laparoskopową kriomiolizę i termokoagulację [17, 112-114]. Alternatywą do leczenia chirurgicznego jest embolizacja tętnicy macicznej (UAE, ang. *Uterine artery embolisation*), zamknięcie tętnic macicznych oraz leczenie skoncentrowanymi falami ultradźwięków pod kontrolą rezonansu magnetycznego (MRgFUS, ang. *MRI guided Focused Ultrasound*) [113, 114].

Obecne metody leczenia mięśniaków macicy są głównie chirurgiczne, a co za tym idzie drogie. Spośród 600 000 histerektomii wykonywanych każdego roku w USA, 200 000 dotyczy mięśniaków macicy [115]. Pomimo braku odpowiednich ocen medyczno-ekonomicznych różnych terapii, prawdopodobne jest, że zmniejszenie liczby histerektomii i innych procedur chirurgicznych zmniejszy koszty i chorobowość. Konieczne jest zatem opracowanie i ocena alternatyw dla zabiegów chirurgicznych, zwłaszcza gdy celem jest zachowanie płodności [116, 117].

1.7.2. Leczenie farmakologiczne

Analogi GnRH

Analogi GnRH wykazują bezpośrednie działanie na przysadkę mózgową, hamując pulsacyjne uwalnianie gonadoliberyny. Po kilkudniowym zwiększeniu uwalniania gonadotropin, analogi GnRH prowadzą do zahamowania ich syntezy i uwalniania, a w rezultacie do zahamowania czynności gonad oraz zmniejszenia stężenia hormonów płciowych tj. estradiolu i progesteronu. Poprzez wywołanie stanu hipostrogenizmu, agoniści GnRH są wykorzystywani do zmniejszania wielkości mięśniaków i przywracania stężenia hemoglobiny u kobiet z objawowymi mięśniakami

macy [118, 119]. Przedoperacyjne stosowanie agonistów GnRH wydaje się być istotne i korzystne u pacjentów z mięśniakami podśluzówkowymi [120]. Korzyści obejmują ustąpienie niedokrwistości przedoperacyjnej, zmniejszenie wielkości mięśniaków, zmniejszenie grubości endometrium i unaczynienia, a następnie poprawa widoczności oraz możliwość planowania operacji [17, 118, 119, 121, 122]. Należy jednak pamiętać, że w związku z powodowaniem przejściowej menopauzy oraz jej skutków ubocznych takich jak utrata masy kostnej, agonistów GnRH nie należy stosować w długotrwałej terapii.

Selektywne modulatory receptora progesteronowego

Selektywne modulatory receptora progesteronowego to grupa leków, która wykazuje działanie swoiste tkankowo i częściowo antagonistyczne dla progesteronu. W ostatnich latach do leczenia przedoperacyjnego mięśniaków macicy zarejestrowano octan uliprystalu [107]. W badaniach wykazywał obiecujące wyniki pod względem skuteczności i bezpieczeństwa stosowania. Również w porównaniu do agonistów GnRH wykazywał się lepszą skutecznością w kontroli objawów klinicznych oraz lepszą tolerancją wśród pacjentek [108]. W badaniach klinicznych krwawienia z macicy były opanowane u ponad 90% pacjentek otrzymujących trzymiesięczną kurację octanem uliprystalu, a ponadto, mediana czasu do opanowania krwawienia była krótsza w grupie leczonej octanem uliprystalu (5–7 dni) niż w grupie agonisty GnRH (21 dni) [108]. Stwierdzono również, że terapia octanem uliprystalu przynosi trwały efekt (do sześciu miesięcy) u kobiet, które nie przeszły operacji po trzymiesięcznym okresie terapii. Z kolei u osób leczonych agonistą GnRH nastąpił szybki odrost mięśniaków, których rozmiar osiągnął rozmiary sprzed terapii w sześć miesięcy po leczeniu [107, 108].

Do 2020 roku leczenie octanem uliprystalu przeszło 765 000 kobiet. U 5 kobiet stwierdzono bardzo rzadkie przypadki idiosynkratycznej ostrej niewydolności wątroby, a cztery z nich wymagały przeszczepu wątroby [123-125]. W związku z powyższym Europejska Agencja Leków (EMA, ang. *European Medicines Agency*) zatwierdziła stosowanie octanu uliprystalu w leczeniu mięśniaków z pewnymi ograniczeniami, tj., gdy operacja (w tym embolizacja) zakończyła się niepowodzeniem u kobiet przed menopauzą ([https://www.ema.europa.eu/en/news/ulipristal-acetate-uterine- mięśniaki-](https://www.ema.europa.eu/en/news/ulipristal-acetate-uterine-mi%C4%99niaki-)

ema-zaleca-ograniczenie-uzytkowania). Informacja ta wskazuje na dalszą potrzebę modyfikacji terapii octanem uliprystalu w przypadku mięśniaków macicy.

Leczenie objawowe

Nadmierne krwawienia miesięczkowe to najczęstszy objaw kliniczny mięśniaków macicy, w związku z tym możliwe jest zastosowanie leczenia objawowego. W leczeniu hamującym nadmierne krwawienia miesięczkowe stosowane są tabletki o składzie antykoncepcyjnym, wkładki wewnątrzmaciczne uwalniające lewonorgestrel (LNG-IUD, ang. *levonorgestrel intrauterine device*), kwas traneksamowy, antagoniści GnRH (elagolix, relugolix) [126]. Leki te wykazują się różną skutecznością w leczeniu nadmiernych krwawień miesięczkowych związanych z mięśniakami, ale żaden nie doprowadza do zaniku mięśniaków macicy.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Celem pracy jest scharakteryzowanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw działania progesteronu i selektywnego modulatora receptora progesteronowego octanu uliprystalu w mięśniakach macicy w porównaniu do mięśniaków nieleczonych octanem uliprystalu oraz do prawidłowej mięśniówki macicy.

Cele szczegółowe obejmują:

- a) Scharakteryzowanie profilu ekspresji genów i białek progesteronowych receptorów jądrowych i błonowych w mięśniakach macicy.
- b) Określenie wpływu progesteronu i octanu uliprystalu na zmiany ekspresji genów/białek receptorów progesteronowych oraz żywotność komórek mięśniaków macicy.
- c) Określenie wpływu progesteronu i octanu uliprystalu na ścieżki sygnalizacyjne zaangażowane w syntezę i odkładanie się macierzy zewnątrzkomórkowej w mięśniakach macicy.
- d) Ustalenie mechanizmów wyjaśniających terapeutyczny wpływ octanu uliprystalu na kontrolę wzrostu mięśniaków macicy

3. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

3.1. Materiał badawczy

Próbki świeżej tkanki mięśniaków macicy (n=250) oraz prawidłowej mięśniówki macicy (n=100) pobrano bezpośrednio po operacji przeprowadzonej w Klinice Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w latach 2017-2021. Lokalna Komisja Bioetyczna zatwierdziła badanie (R-I-002/482/2017, APK.002.4.2021). Pisemną świadomą zgodę uzyskano przed operacją od wszystkich pacjentek, które zostały wcześniej zakwalifikowane do badania. Mięśniaki macicy zostały zebrane od pacjentek w wieku 25–45 lat, które przeszły miomektomię, czyli zabieg wyłuszczenia mięśniaków macicy. Zabieg był wykonany z powodu niepłodności związanej z mięśniakami macicy lub miały poważne objawy kliniczne, takie jak obfite krwawienia miesięczkowe prowadzące do niedokrwistości. Pacjentki podzielono na dwie grupy: pacjentki leczone octanem uliprystalu (UA-L) (n = 100) i pacjentki nieleczone octanem uliprystalu (NT-L) (n = 150) przed operacją. Przedoperacyjna terapia octanem uliprystalu polegała na podawaniu 5 mg leku dziennie przez 3 miesiące. Zabieg wyłuszczenia mięśniaków macicy wykonano w pierwszej fazie cyklu miesięczkowego, miesiąc po zakończeniu terapii. Rodzaj, rozmiar i lokalizacja mięśniaków macicy były różne.

Kryteriami kwalifikacji do badania były: co najmniej jeden mięśniak, średnica guza co najmniej 10 mm, niepłodność związana z mięśniakami lub poważne objawy kliniczne związane z guzem, histopatologicznie potwierdzone mięśniaki macicy. Z badania wykluczono pacjentki, u których w okresie ostatnich 6 miesięcy stosowano jakiegokolwiek inne leczenie hormonalne, u których stwierdzono menopauzę, zaburzenia hormonalne, inne guzy czynne hormonalnie lub procesy nowotworowe. Prawidłową mięśniówkę macicy (n = 100) uzyskano od kobiet w wieku 45 – 55 lat podczas histerektomii wykonanej z innego powodu niż mięśniaki macicy. Z badania wykluczono pacjentki ze złośliwymi, hormonalnie czynnymi procesami w obrębie dróg rodnych.

Wszystkie próbki do analiz histopatologicznych umieszczono w 10% buforowanej formalinie na 48 godzin, dokładnie przemyto w PBS (Gibco), odwodniono w stopniowanym etanolu i ksylenie, a na koniec zatopiono w parafinie w kasetach

tkankowych. Świeże próbki tkanek pobrano natychmiast po operacji, zabezpieczono przed degradacją RNA w RNAlater (Life Technologies) lub natychmiast zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu analizy.

3.2. Leczenie

Czynniki stymulujące, które zostały wykorzystane do przeprowadzenia badania: octan uliprystalu (UA), progesteron (P4), inhibitor SMAD3 (SIS3) i inhibitor PGRMC1 (AG-205) dostarczyła firma Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Inhibitor TGF- β RI/II (GW788388), inhibitor IL-6 (Tocilizumab) oraz inhibitor VEGF (Axitinib) zakupiono od Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). Ludzki rekombinowany VEGF (rhVEGF) i ludzki rekombinowany IL-6 (rhIL-6) zostały wyprodukowane przez R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

3.3. Hodowla i stymulacja eksplantów tkankowych prawidłowej mięśniówki macicy i mięśniaków macicy

Bezpośrednio po operacji mięśniaki macicy uzyskane od pacjentek leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu (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 płycie Petriego sterylnym skalpelem. Eksplanty umieszczono w 48-dołkowej płycie i utrzymywano w podstawowej pożywce hodowlanej DMEM/f-12 (Gibco) z 10% FBS (Gibco), 1% roztworem antybiotyku/przeciwgrzybiczego (Sigma-Aldrich) i 20 ul plazmocyny (Invivogen) w 37°C w wilgotnej atmosferze w obecności 5% CO_2 przez 24 godziny. Następnie eksplanty głodzono w DMEM / F12 bez fenolu z 0,5% FBS i roztworem antybiotyku / środka przeciwgrzybiczego przez 16 godzin. Po okresie głodzenia eksplanty były przez 24 godziny stymulowane następującymi czynnikami: nośnikiem etanolu (0, 01%), P4 (1 uM), UA (1 uM), iSMAD3 (2 uM), rhIL-6 (5 ng/ml), rhVEGF (50 ng/ml) w pożywce stymulacyjnej (bezfenolowy DMEM/F12 z 0,5% roztworem FBS i P/S). Po zakończeniu stymulacji, medium w których umieszczone były eksplanty pobrano do pomiarów stężenia cytokin, a eksplanty do ekstrakcji RNA i analiz ekspresji genów. Zestawienie szczegółowych danych dotyczących warunków przeprowadzonych

stymulacji umieszczono w Tabeli II. Przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty w czterech powtórzeniach dla każdej stymulacji.

3.4. Hodowla i stymulacja pierwotnych hodowli komórkowych prawidłowej mięśniówki macicy i mięśniaków macicy

Natychmiast po operacji mięśniaki macicy uzyskane od pacjentek leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu (UA-L, NT-L) ($n = 150$) oraz tkanki prawidłowej mięśniówki macicy pocięto na małe kawałki i inkubowano w 1 ml 10% kolagenazy (Sigma) w bezfenolowej pożywce DMEM/F12 przez minimum 4 godziny dla mięśniaków macicy i minimum 3 godziny dla prawidłowej mięśniówki macicy. Proces trawienia przeprowadzano w temperaturze 37°C i 5% CO₂. Roztwór kolagenazy i tkanek mieszano pipetą serologiczną co 30 minut. Po uzyskaniu zawiesiny komórek aktywność kolagenazy blokowano poprzez dodanie 10 ml pożywki DMEM/F12 z 10% roztworem FBS i P/S. Zawiesinę wirowano przez 10 minut. Supernatant usunięto, a otrzymany osad komórkowy ponownie zawieszono w 5 ml DMEM/F12 z 10% roztworem FBS i P/S i wysiano do butelki hodowlanej o pojemności 25 cm². Pierwotne komórki mięśniaków macicy i prawidłowej mięśniówki macicy hodowano w pożywce DMEM/F12, uzupełnionej 10% FBS i roztworem antybiotyku/środka przeciwgrzybiczego. Komórki inkubowano w 37°C w nawilżonej atmosferze 95% w obecności 5% CO₂, aż osiągnęły 80% konfluencję. Do eksperymentów stosowano hodowle komórkowe po minimum jednym pasażu i maksymalnie trzech pasażach z konfluencją 80%. Czystość hodowli komórkowych określono za pomocą barwienia α -SMA. Do badania włączono tylko hodowle, w których stwierdzano ponad 95% czystych kultur. Liczbę żywych komórek oceniano przez zliczanie w komorze Burkera. Zestawienie szczegółowych danych dotyczących warunków przeprowadzonych stymulacji umieszczono w Tabeli II. Przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty w czterech powtórzeniach dla każdej stymulacji.

Tabela II. Szczegółowe dane dotyczące warunków przeprowadzonych stymulacji.

	ILOŚĆ WYSIANYCH KOMÓREK NA DOŁEK	PŁYTKA HODOWLANA	CZAS STYMULACJI [H]
Eksplanty tkankowe mięśniaków macicy	-	48-dołkowa	24
Eksplanty tkankowe prawidłowej mięśniówki	-	48-dołkowa	24
Komórki mięśniaków macicy	$2,5 \times 10^4$	48-dołkowa	24
Komórki mięśniaków macicy	1×10^4	96-dołkowa	24/48/72
Komórki prawidłowej mięśniówki	$2,5 \times 10^4$	48-dołkowa	24

3.5. Pomiar żywotność komórek mięśniaków macicy w hodowlach komórkowych

Do analiz żywotności komórek, wysiano 1×10^4 /dołek komórek mięśniaków macicy na 96-dołkową płytkę i stymulowano nośnikiem (0), UA (0,1, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 100 μ M), P4 (0,001, 0,01, 0,1, 1 μ M), rhVEGF (5, 10, 25, 50 ng/ml), iVEGF (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 μ M), rhIL-6 (5 ng/ml) lub iIL-6 (10 ng/ml) w pożywce stymulującej. Podłoże zawierające świeże dawki stymulantów zmieniano co 24h. Żywotność pierwotnych komórek mięśniaków macicy oceniano po 24, 48 i 72 godzinach leczenia metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem kitu CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Absorbancję odczytano przy 490 nm po 4 godzinach inkubacji z odczynnikami MTT z każdego dołka. Grupy kontrolne traktowano nośnikiem etanolu w końcowym stężeniu 0,05% etanolu.

3.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji oraz ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR)

Na początku RNA izolowano z komórek mięśniaków macicy i komórek prawidłowej mięśniówki macicy po stymulacji *in vitro*, a także bezpośrednio z tkanek mięśniaków macicy od pacjentów leczonych octanem uliprystalu (UA-L) i nieleczonych octanem uliprystalu (NT-L) oraz z tkanek prawidłowej mięśniówki macicy (M). Izolację RNA przeprowadzano za pomocą odczynnika TRIzol (Invitrogen). Zastosowano NanoDrop (Thermo Scientific) i elektroforezę żelową do określenia ilości i jakości wyizolowanego RNA. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z zestawem High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit zawierającym inhibitor rybonukleazy (RNazy) (Applied Biosystems) zgodnie z protokołem producenta. Do qPCR w czasie rzeczywistym zastosowano Master Mix SYBR Green PCR (Applied Biosystems) i termocykler 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Warunki reakcji były następujące: 2 minuty w temperaturze 50°C, 10 minut w temperaturze 95 °C, 15 sekund w temperaturze 95 °C i 1 minutę w temperaturze 60 °C, łącznie 40 cykli amplifikacji. Aby zapewnić amplifikację pojedynczego produktu, produkty PCR analizowano za pomocą analizy krzywej topnienia i elektroforezy w żelu agarozowym. Każdy produkt reakcji oddzielono i zweryfikowano za pomocą analizy sekwencjonowania. Poziomy ekspresji badanych genów znormalizowano do genu metabolizmu podstawowego peptydylprolilu izomeraza A (PPIA). Wszystkie użyte primery i ich parametry wykazano w Tabeli III.

Tabela III. Sekwencja starterów użytych w reakcji q-PCR.

GEN (LUDZKI)	SEKWENCJA PRIMERÓW (5'-3')	EMBL
<i>PGR</i>	F: GAGCACTGGATGCTGTTGCT	NM_001202474.3
	R: GGCTTAGGGCTTGGCTTTC	
<i>PGRMC1</i>	F: TGCCTGGATAAAGGAAGCACT	NM_006667.4
	R: GCCCACGTGATGATACTTGA	
<i>PGRMC2</i>	F: ATGGGAAAGTCTTCGACGTG	NM_006320.4
	R: CAAAATGTGGCCAGTCCTCT	
<i>PAQR7</i>	F: TGCCCTGCTGTGTGATCTTA	NM_178422.5
	R: ATAGCTGAGGCTCCTGGATG	
<i>PAQR8</i>	F: CGGTTGCATACCCTGTCCTG	NM_133367.4
	R: ATCTTGGGAAGCCCATCCTC	
<i>PAQR5</i>	F: ATTGTCCCAAGGCCTCAGAT	NM_001104554.1
	R: ATGCCATTCCAGTCAAATCC	
<i>TGFB1</i>	F: GCCGACTACTACGCCAAGGA	NM_000660.6
	R: CATAGATTTTCGTTGTGGGTTTCC	
<i>TGFB2</i>	F: CGAGAGGAGCGACGAAGAGT	NM_001135599.4
	R: AGGGCGGCATGTCTATTTTG	
<i>TGFB3</i>	F: CGGAATGAGCAGAGGATCGA	NM_003239.5
	R: CTGTTTGGCAATGTGCTCATCT	
<i>TGFBR1</i>	F: GCTGCAATCAGGACCATTG	NM_004612.4
	R: GATGCAGACGAAGCACACTG	
<i>TGFBR2</i>	F: TCCATCTGTGAGAAGCCACA	NM_001024847.2
	R: GGAGAAGCAGCATCTTCCAG	

<i>SMAD2</i>	F: TGGGATACAACAGGCCTTTACA	NM_005901.6
	R: ATACCTGGAGACGACCATCAAGA	
<i>SMAD3</i>	F: GGAGCTGACACGGAGACACA	NM_005902.4
	R: GAAGACCTCCCCTCCGATGT	
<i>PPIA</i>	F: GCCAAGACTGAGTGGTTGGATG	NM_021130.4
	R: GAGTTGTCCACAGTCAGCAATGG	
<i>VEGFA</i>	F: AGTGTGTGCCCACTGAGGA	NM_001025366.3
	R: TGTTGTGCTGTAGGAAGCTCA	
<i>VEGFB</i>	F: ACTGTGCAGCGCTGTGGT	NM_003377.5
	R: TCTGCATTCACTGGCTGT	
<i>VEGFC</i>	F: CACGAGCTACCTCAGCAAGA	NM_005429.5
	R: ATCGGCAGGAAGTGTGATTG	
<i>VEGFR2</i>	F: AGTGACCAACATGGAGTCGT	NM_002253.4
	R: ATCTTGCACAAAGTGACACG	
<i>IL-6</i>	F: GAAGCTCTATCTCCCCTCCAG	NM_000600.5
	R: AGGCAACACCAGGAGCAG	
<i>IL-6R</i>	F: GACGACAAAGGCTGTGCTCT	NM_000565.4
	R: GCAGGAGAACTTCTGGGACTC	
<i>RhOA</i>	F: CCAATCCTGTTTGCCATATCTCT	NM_001313941.2
	R: TCGGAATGATGAGCACACAAG	
<i>COL1A1</i>	F: TCCTGACGCACGGCCAAGA	NM_000088.4
	R: AGGCCGTTCTGTACGCAGGT	
<i>NRP1</i>	F: CGAATGGCTGATTCAGGCTC	NM_003873.7
	R: AACAGGAGGAGGGGCTATCT	

3.7. Pomiar wydzielania czynników wzrostu i cytokin

Stężenie cytokin i czynników wzrostu w supernatantach pozyskanych z hodowli komórkowych określono za pomocą zestawów Quantikine ELISA Kit (R&D Systems), stosując: Human VEGF DuoSet ELISA (R&D), Human IL-6 DuoSet ELISA (R&D), human TGF- β 1 DuoSet ELISA (R&D) i human TGF- β 3 DuoSet ELISA (R&D) zestaw zgodnie z zaleceniami producenta. Pomiar absorbancji przeprowadzono za pomocą czytnika płytek Infinite M200 Pro Tecan. Każdą próbę analizowano w dwóch powtórzeniach.

3.8. Barwienie immunohistochemiczne

Ludzkie tkanki mięśniaków macicy i tkanki prawidłowej mięśniówki macicy zostały utrwalone w paraformaldehydzie, a następnie zatopione w parafinie. Do immunohistochemii wykorzystano skrawki parafiny o grubości 5 μ m, które następnie odparafinowano, uwodniono i gotowano w 10 mM buforze z kwasem cytrynowym (pH 6,0) w aparacie Retriever przez 2,5 godziny. Skrawki tkanek inkubowano z roztworami blokującymi (3% BSA w PBS) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w celu zmniejszenia nieswoistego barwienia tła. Następnie skrawki inkubowano przez noc w 4 ° C z pierwszorzędowymi przeciwciałami dla PGR (MA5-12658, Thermo Fisher; rozcieńczenie 1: 700), mPR α (ab75508, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1: 500), mPR β (ab46534, Abcam; rozcieńczenie 1:1000), mPR γ (ab79517, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1:500), PGRMC1 (PAB20135, Abnova Corporation, Taipei, Tajwan; rozcieńczenie 1:2000), PGRMC2 (ab125122, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1:1000), RhoA (ab54835, Abcam, Cambridge, UK; rozcieńczenie 1:200), VEGF (ab191274, Abcam, Cambridge, UK; rozcieńczenie 1:50), IL-6 (ab9324, Abcam, Cambridge, UK ; rozcieńczenie: 0,125 μ g/ml), SMAD3 (ab40854, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1:200) i pSMAD3 (ab52903, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1:200). Po zablokowaniu endogennej peroksydazy (0,5% H₂O₂ w PBS przez 20 minut w ciemności w temperaturze pokojowej), pierwszorzędowe przeciwciała połączono z Envision® anty-mysim lub anty-króliczym polimerem + HRP (Dako) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Produkt reakcji wizualizowano za pomocą tetrachlorowodoru 3'3-diaminobenzyny (DAB, Dako).

Po każdym etapie przeprowadzono trzy przemywania z PBS z 0,05% Tween (PBS-T). Hematoksylinę zastosowano jako barwnik kontrastowy, a następnie skrawki odwodniono i utrwalono za pomocą Pertex (Histolab Products AB; Askim, Szwecja). W każdej dodatnio wybarwionej komórce zmierzono intensywność wybarwienia jako gęstość optyczną produktu reakcji z obrazem analizowanym przez oprogramowanie Fiji Software. Sześć obszarów wybrano losowo z każdej sekcji i automatycznie określono ilościowo. Dla każdego analizowanego obszaru obliczono średnią gęstość optyczną (OD).

3.9. Barwienie immunocytochemiczne

Komórki mięśniaków macicy w ilości $1,5 \times 10^3$ wysiano i hodowano na szkiełku nakrywkowym Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slide™ system 154534 8-dołkowy (SigmaAldrich) i stymulowano przez 24 godziny pożywką do stymulacji zawierającą kontrolę w formie nośnika (0) lub octan uliprystalu ($1 \mu\text{M}$). Komórki utrwalano acetonem (8 min, temperatura pokojowa) i przemywano PBS (3 x 5 min). Następnie, w celu zablokowania nieswoistego wiązania komórki inkubowano przez 30 minut z roztworem blokującym (1% BSA w PBS z 0,05% Tween20; PBST) w temperaturze pokojowej. Odtąd komórki inkubowano w nawilżanej komorze przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z następującymi pierwszorzędowymi przeciwciałami anti-pSMAD3 (ab52903, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1:200) rozcieńczonymi w roztworze blokującym. Następnie komórki inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem fluorescencyjnym Alexa Fluor 647 kozim anty-króliczym IgG (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1:200) przez 45 minut. Aby wykryć jądra komórkowe, komórki inkubowano z DAPI przez 1 minutę.

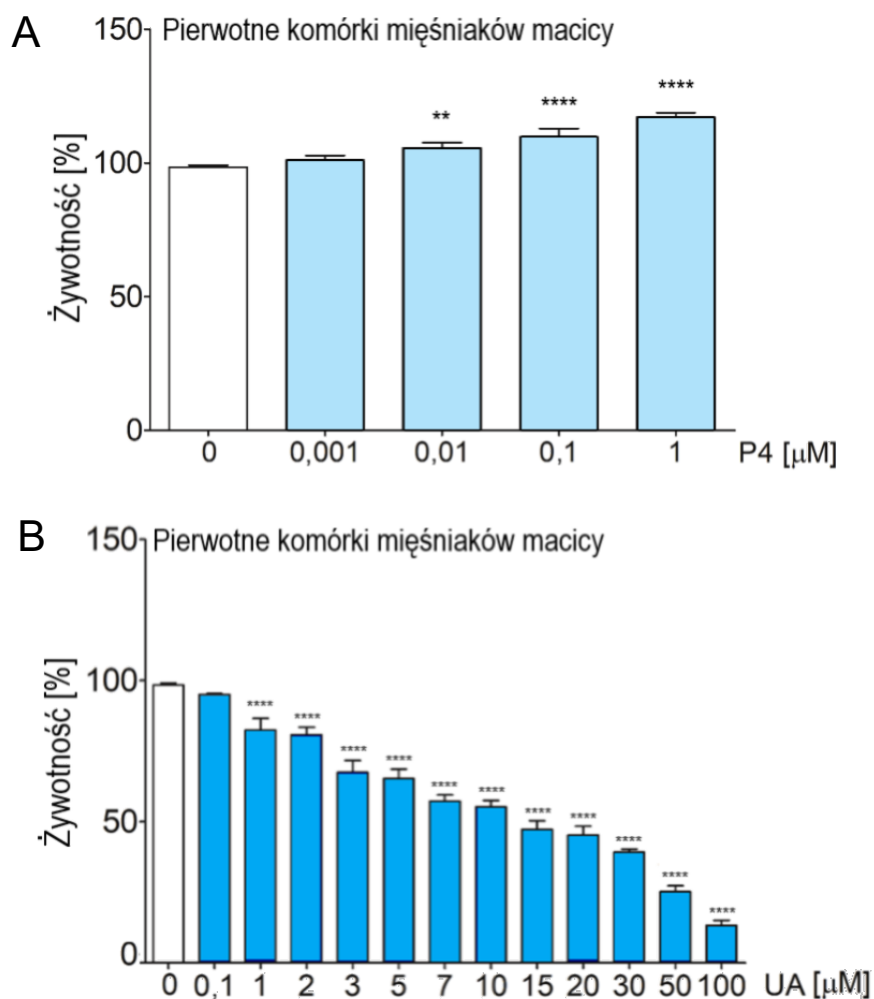
3.10. Analiza statystyczna

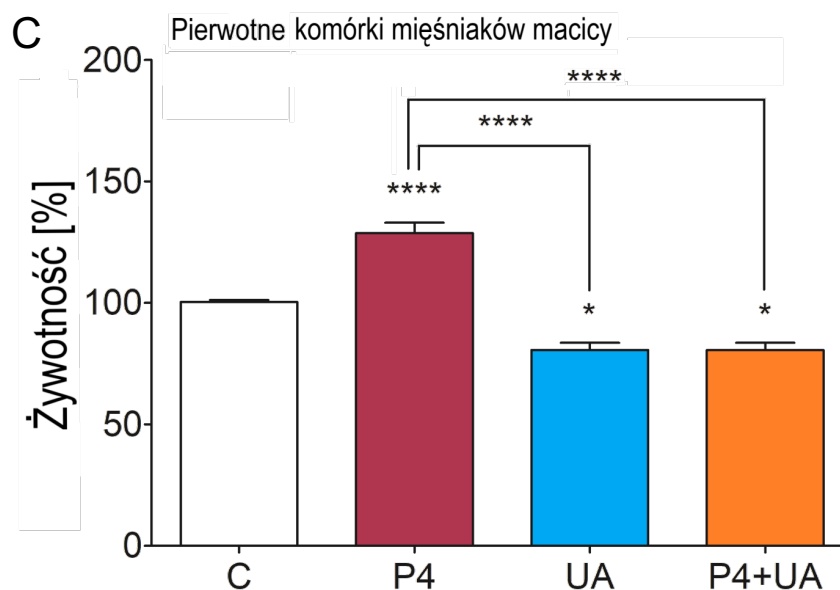
Wyniki wyrażono jako średnią \pm SEM. Istotność statystyczną oceniono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego i dwuczynnikowej analizy ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego przy użyciu GraphPad PRISM v. 7.0 (GraphPad Software, Inc). $P \leq 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

4. WYNIKI

4.1. Wpływ progesteronu i octanu uliprystalu na żywotność komórek mięśniaków macicy

Przeanalizowaliśmy wpływ progesteronu (0 – 1 μM) i octanu uliprystalu (0 – 100 μM) na żywotność pierwotnych komórek mięśniaków macicy *in vitro*. Żywotność komórek mięśniaków macicy po 72-godzinnej stymulacji progesteronem w dawce 0,01 μM i wyższej była istotnie statystycznie podwyższona w porównaniu do grupy kontrolnej (**Rycina 6 A**). Po 72-godzinnej stymulacji octanem uliprystalu w dawkach 1 μM lub wyższych, żywotność komórek mięśniaków macicy była istotnie statystycznie obniżona w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grupy stymulowanej progesteronem (**Rycina 6 B – C**). Stwierdziliśmy również, że octan uliprystalu hamował stymulujące działanie progesteronu w komórkach mięśniaków macicy (**Rycina 6 C**).





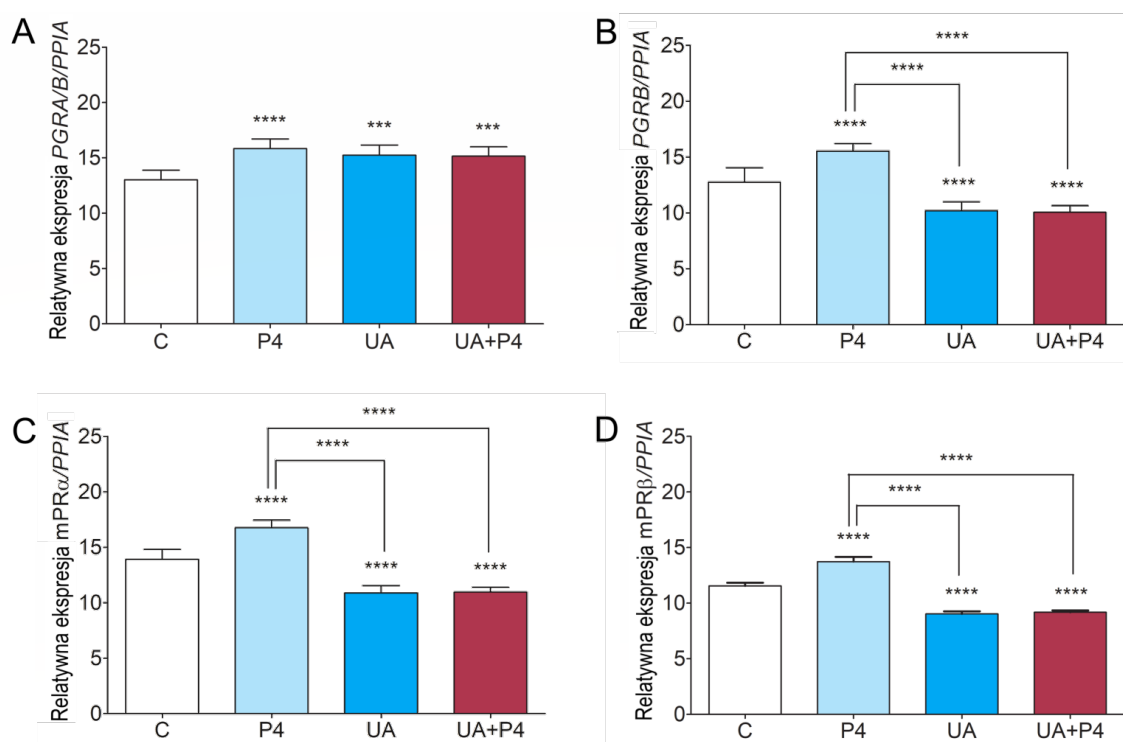
Rycina 6. Wpływ progesteronu i octanu uliprystalu na żywotność komórek pierwotnej linii komórkowej mięśniaków macicy po 72-godzinnej stymulacji.

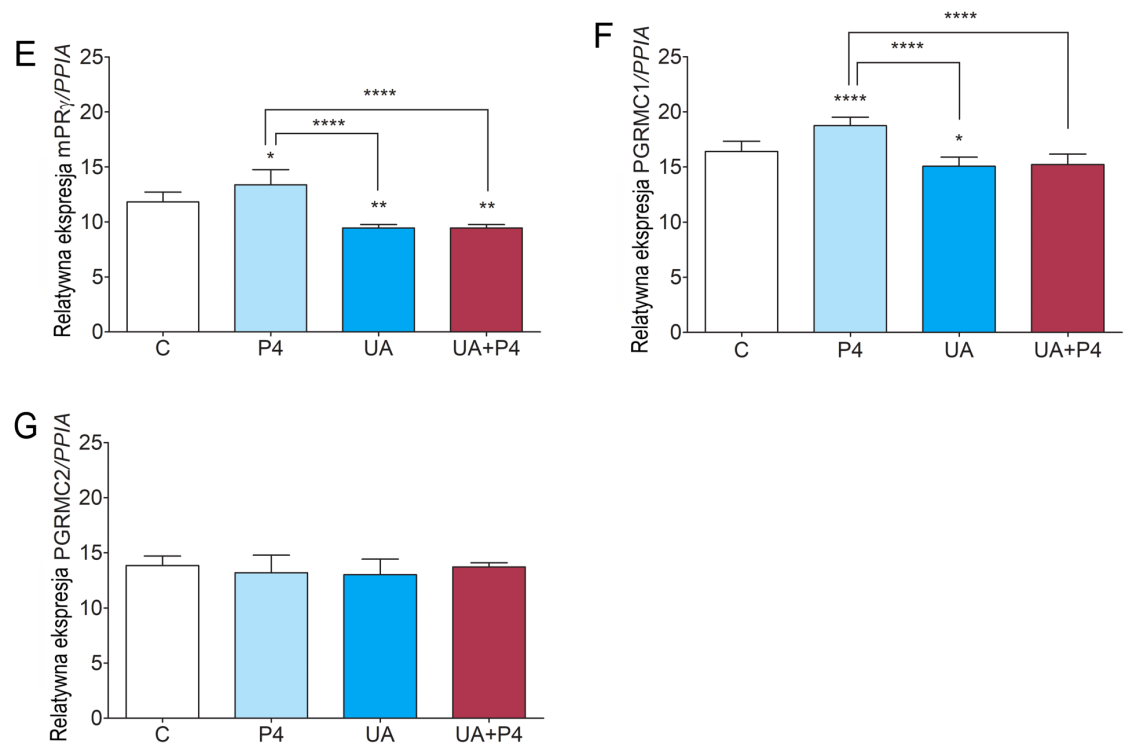
Żywotność komórek mięśniaków macicy po leczeniu progesteronem (**Rycina 6 A**), octanem uliprystalu (**Rycina 6 B**) lub progesteronem i octanem uliprystalu jednocześnie (**Rycina 6 C**). Za 100% proliferacji przyjęto wartość odpowiadającą proliferacji w próbie kontrolnej. Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Linie łączące kolumny przedstawiają grupy różniące się istotnie statystycznie ($p < 0.05$). Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupą nieleczoną, a grupami leczonymi (*, $P < 0,05$; ****, $P < 0,0001$). C, kontrola; P4, progesteron; UA, octan uliprystalu.

4.2. Wpływ progesteronu i octan uliprystalu na profil ekspresji receptorów progesteronowych w prawidłowej mięśniówce macicy i w mięśniakach macicy

4.2.1. Wpływ progesteronu i octan uliprystalu na profil ekspresji receptorów progesteronowych w eksplantach mięśniakach macicy

Ekspresja PGRA/B była znacząco podwyższona w eksplantach mięśniaków macicy po leczeniu progesteronem i octanem uliprystalu, a progesteron nie wykazywał żadnych efektów addytywnych do działania octanu uliprystalu (**Rycina 7 A**). W przeciwieństwie do tego, ekspresja PGRB była podwyższona po leczeniu progesteronem, a obniżona po leczeniu octanem uliprystalu. Leczenie progesteronem nie znosiło efektu wywołanego przez octan uliprystalu (**Rycina 7 B**). Podobnie, ekspresja mPR α , mPR β , mPR γ i PGRMC1 była znacząco podwyższona po leczeniu progesteronem, a obniżona po leczeniu octanem uliprystalu. Progesteron nie odwrócił tego działania octanu uliprystalu (**Rycina 7 C – F**). Leczenie progesteronem ani octanem uliprystalu nie wpłynęły na ekspresję PGRMC2 w eksplantach mięśniaków macicy (**Rycina 7 G**).



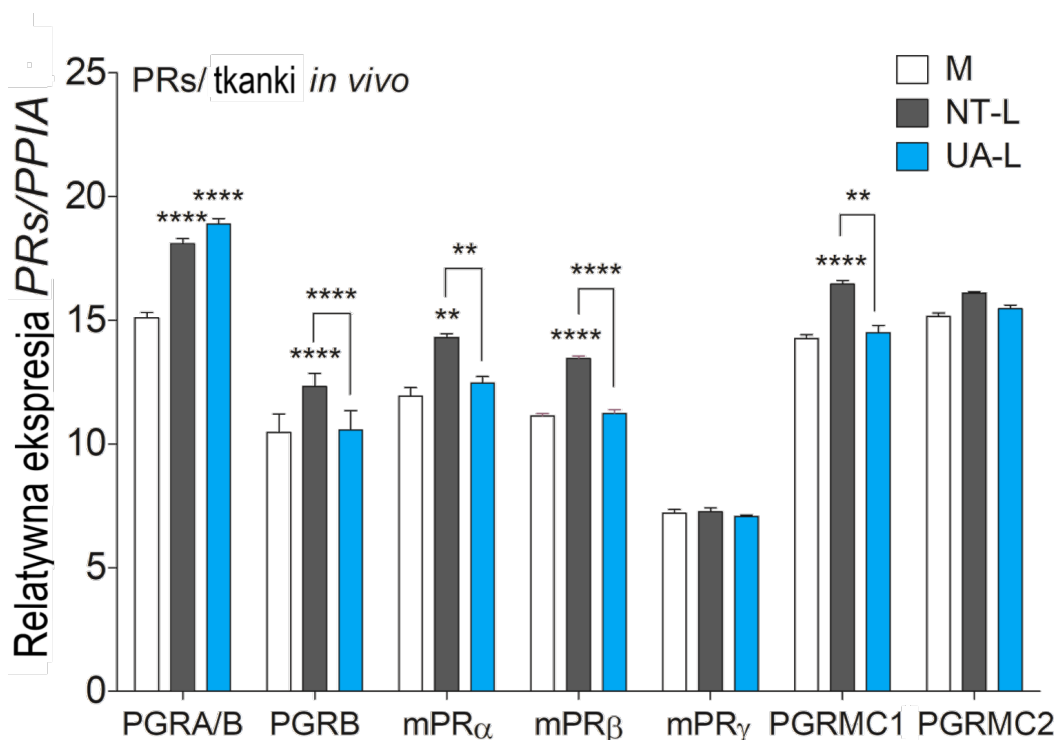


Rycina 7. Charakterystyka ekspresji receptorów progesteronowych w eksplantach mięśniaków macicy.

Analiza qPCR ekspresji PGRA/B, PGRB, mPR α , mPR β , mPR γ , PGRMC1, PGRMC2 (**Rycina 7 A – G**) w eksplantach mięśniaków macicy w kontroli, po leczeniu progesteronem, octanem uliprystalu lub progesteronem i octanem uliprystalu jednocześnie. Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupą kontrolną, a grupą leczoną (*, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001; ****, P <0,0001) C, kontrola; mPR α , błonowy receptor progesteronu α ; mPR β , błonowy receptor progesteronu β ; mPR γ , błonowy receptor progesteronu γ ; PGRA, izoforma A jądrowego receptora progesteronu; PGRA/B, izoforma A/B jądrowego receptora progesteronu; PGRMC1, błonowy receptor progesteronowy 1; PGRMC2, błonowy receptor progesteronowy 2; PRs, receptory progesteronowe; P4, progesteron; UA, octan uliprystalu.

4.2.2. Profil ekspresji oraz lokalizacja receptorów progesteronowych w prawidłowej mięśniówce macicy i w mięśniakach macicy przed i po leczeniu octanem uliprystalu

Profil ekspresji receptora jądrowego (PGRA, PGRA/B) i wszystkich błonowych podtypów receptorów progesteronowych ($mPR\alpha$, $mPR\beta$, $mPR\gamma$, PGRMC1, PGRMC2) w tkankach mięśniaków macicy leczony ($n=100$) i nieleczonych mięśniaków macicy ($n=150$), jak również w tkankach prawidłowej mięśniówki macicy ($n=100$). Ekspresja PGRA/B, PGRB, $mPR\alpha$, $mPR\beta$ i PGRMC1 była znacznie wyższa w tkankach mięśniaków nieleczonych octanem uliprystalu w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy (**Rycina 8**). W przeciwieństwie do tego, tylko ekspresja PGRA/B była podwyższona w tkankach mięśniaków macicy leczonych octanem uliprystalu, podczas gdy ekspresja PGRB, $mPR\alpha$, $mPR\beta$ i PGRMC1 była podobna do tej w prawidłowej mięśniówce macicy. Ekspresja $mPR\gamma$ i PGRMC2 była podobna we wszystkich badanych grupach (**Rycina 8**).



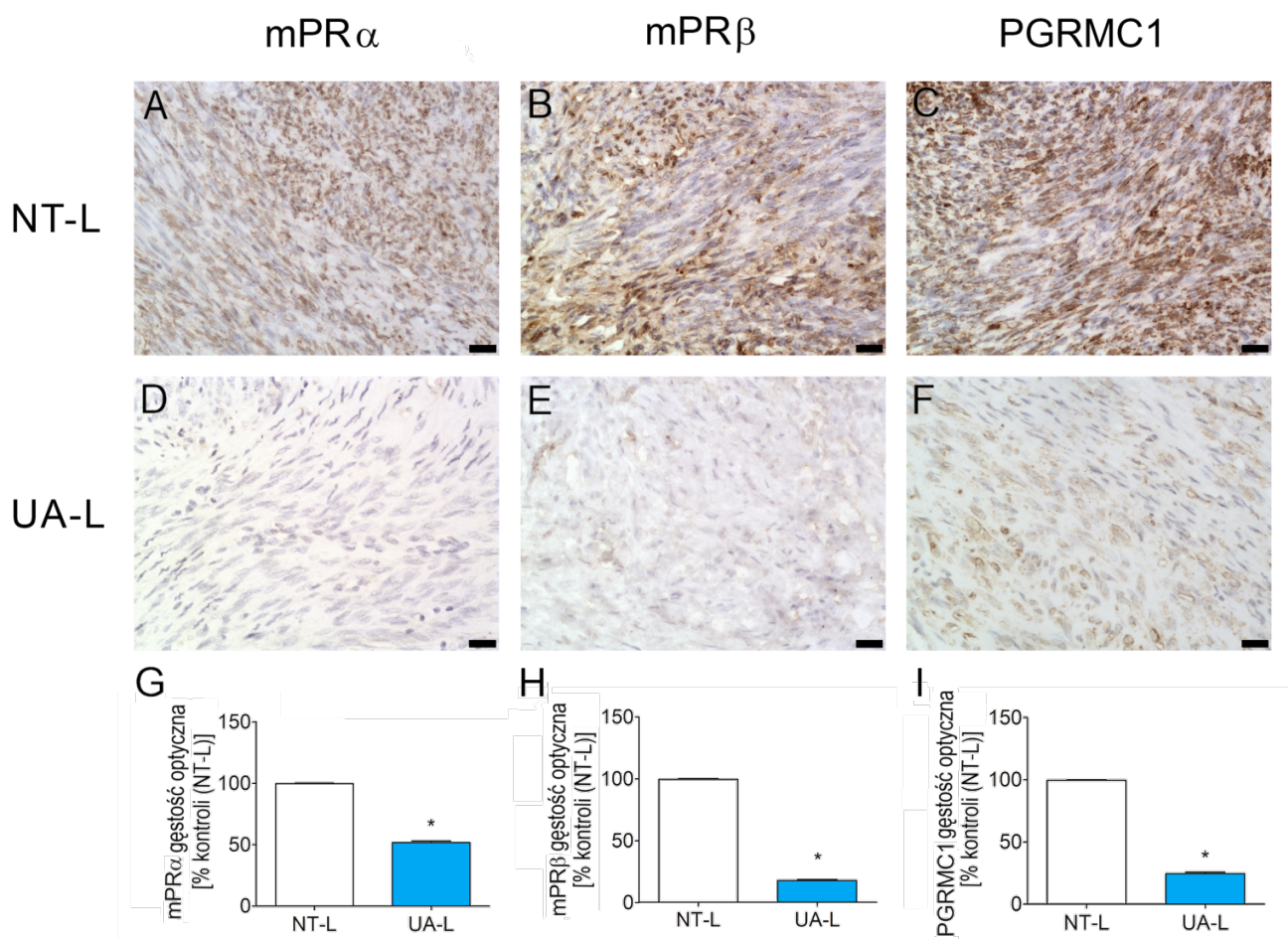
Rycina 8. Charakterystyka profilu ekspresji receptorów progesteronowych w mięśniakach macicy po leczeniu octanem uliprystalu i progesteronem.

Analiza qPCR ekspresji receptora jądrowego (PGRA, PGRA/B) oraz błonowych receptorów progesteronu ($mPR\alpha$, $mPR\beta$, $mPR\gamma$, PGRMC1, PGRMC2) w prawidłowej mięśniówce macicy

(n=100) i mięśniakach macicy nieleczonych (NT-L) (n=150) i leczonych octanem uliprystalu (UA-L) (n=100) (**Rycina 8**). Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupą kontrolną, a grupą leczoną (**, P <0,01; ****, P<0,0001). NT-L, mięśniaki macicy nieleczone; M, prawidłowa mięśniówka macicy; mPR α , błonowy receptor progesteronu α ; mPR β , błonowy receptor progesteronu β ; mPR γ , błonowy receptor progesteronu γ ; PGRA, izoforma A jądrowego receptora progesteronu; PGRA/B, izoforma A/B jądrowego receptora progesteronu; PGRMC1, błonowy receptor progesteronowy 1; PGRMC2, błonowy receptor progesteronowy 2; PRs, receptory progesteronowe; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu.

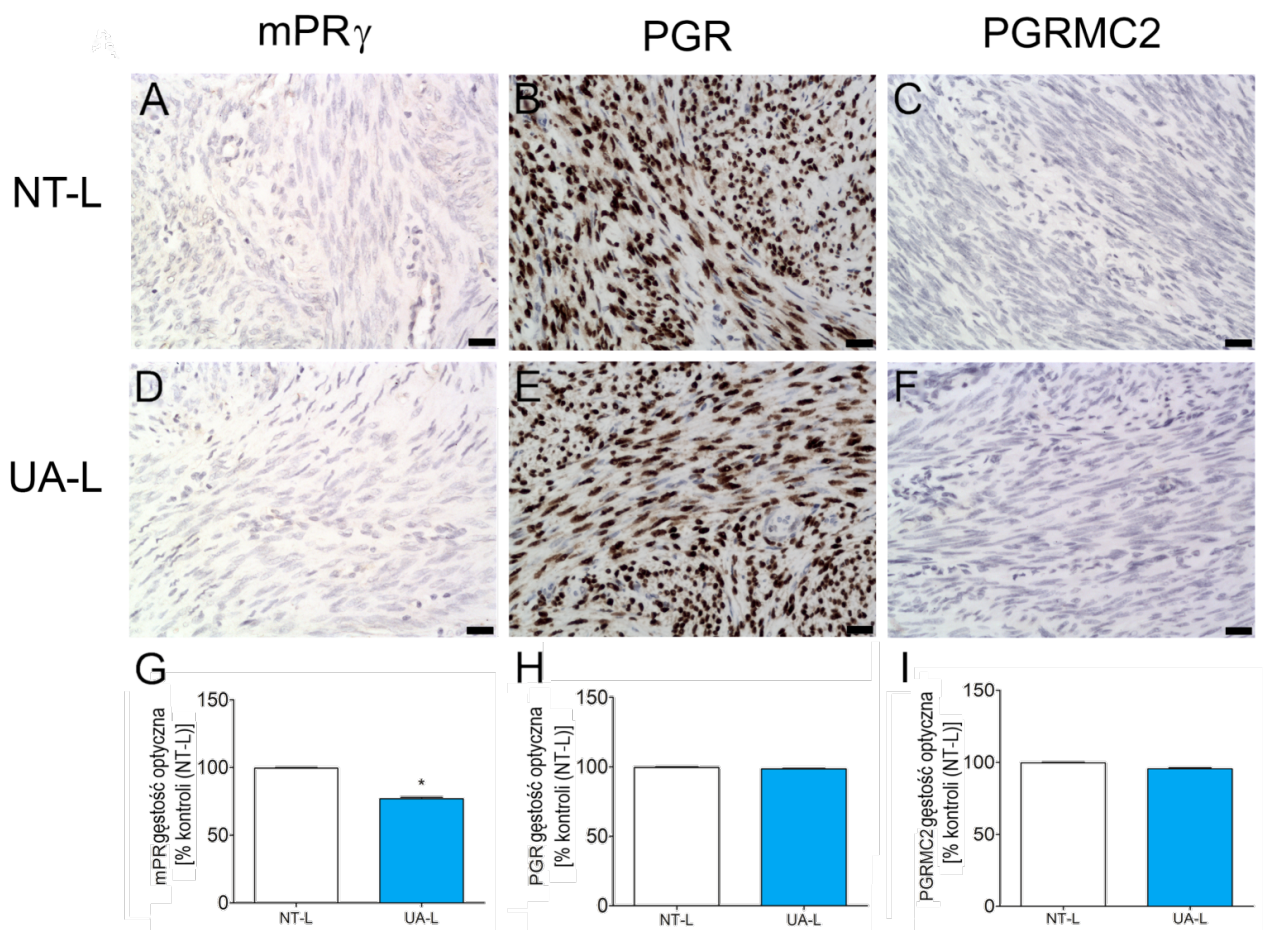
4.2.3. Lokalizacja receptorów progesteronowych w mięśniakach przed i po leczeniu octanem uliprystalu

Badania immunohistochemiczne wykazały silnie pozytywne barwienie cytoplazmatyczne dla mPR α , mPR β i PGRMC1 w nieleczonych kontrolnych mięśniakach macicy (NT – L) (**Rycina 9 A – C**), w porównaniu do mięśniaków leczonych octanem uliprystalu (UA – L) (**Rycina 9 D – F**). Ocena ilościowa barwienia immunohistochemicznego i ocena gęstości optycznej (OD) ujawniły znacznie zmniejszony procentowy stosunek barwień mPR α , mPR β i PGRMC1 w mięśniakach leczonych octanem uliprystalu do mięśniaków nieleczonych (**Rycina 9 G – I**). W porównaniu do mięśniaków nieleczonych (**Rycina 10 A – C**) leczenie octanem uliprystalu nie miało wpływu na barwienie jądrowe mPR γ , PGR i PGRMC2 (**Rycina 10 D – F**). Ocena ilościowa barwienia immunohistochemicznego i ocena gęstości optycznej (OD) ujawniły zmniejszony procentowy stosunek barwień tylko w przypadku mPR γ w mięśniakach leczonych octanem uliprystalu do mięśniaków nieleczonych, ocena PGR i PGRMC2 nie wykazała zmian (**Rycina 10 G – H**).



Rycina 9. Lokalizacja receptorów progesteronowych mPR α , mPR β i PGRMC1 w mięśniakach macicy leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu.

Immunohistochemiczne barwienie mPR α , mPR β i PGRMC1 u pacjentek z mięśniakami macicy nieleczonych (**Rycina 9 A – C**) oraz leczonych octanem uliprystalu (**Rycina 9 D – F**). Ocena ilościowa barwienia immunohistochemicznego mPR α , mPR β i PGRMC1 (**Rycina 9 G – I**) była dokonana przez oprogramowanie Fiji (ImageJ). Z każdej barwionej sekcji losowo wybrano sześć obszarów, które zostały automatycznie ocenione ilościowo przez oprogramowanie Fiji, i oceniono ich gęstość optyczną (OD). Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. (* P < 0, 05) w porównaniu z nieleczoną kontrolą. mPR α , błonowy receptor progesteronu α ; mPR β , błonowy receptor progesteronu β , NT-L, nielezione mięśniaki macicy; PGRMC1, składnik błony receptora progesteronu 1; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu. Pasek skali, 200 μ m.



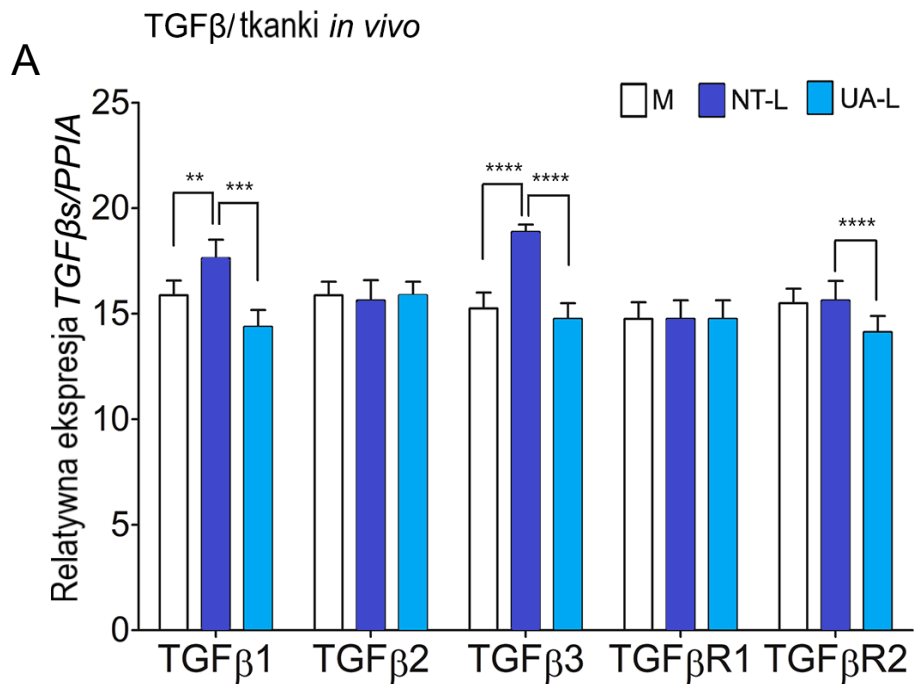
Rycina 10. Lokalizacja receptorów progesteronowych mPR γ , PGR i PGRMC2 w mięśniakach macicy leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu.

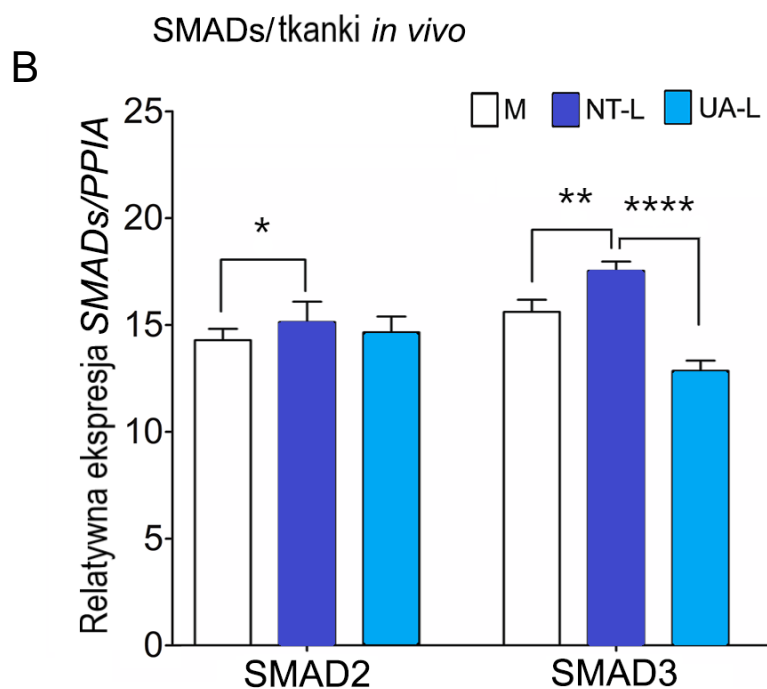
Immunohistochemiczne barwienie mPR γ , PGR i PGRMC2 u pacjentek z mięśniakami macicy nieleczonych (**Rycina 10 A – C**) oraz leczonych octanem uliprystalu (**Rycina 10 D – F**). Ocena ilościowa barwienia immunohistochemicznego mPR γ , PGR i PGRMC2 (**Rycina 10 G – I**) była dokonana przez oprogramowanie Fiji (ImageJ). Z każdej barwionej sekcji losowo wybrano sześć obszarów, które zostały automatycznie ocenione ilościowo przez oprogramowanie Fiji, i oceniono ich gęstość optyczną (OD). Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. (* $P < 0,05$) w porównaniu z nieleczoną kontrolą. mPR γ , błonowy receptor progesteronu γ ; NT-L, nielezione mięśniaki macicy; PGR, jądrowy receptor progesteronu; PGRMC2, składnik błony receptora progesteronu 2; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu. Pasek skali, 200 μ m.

4.3. Rola progesteronu i octanu uliprystalu w szlaku sygnałowego TGF- β w mięśniakach macicy

4.3.1. Charakterystyka profilu ekspresji szlaku sygnałowego TGF- β w prawidłowej mięśniówce i mięśniakach macicy przed i po leczeniu octanem uliprystalu

Profil ekspresji szlaku sygnałowego TGF- β w tkankach mięśniaków macicy. Ekspresja TGF- β 1, TGF- β 3, SMAD2 i SMAD3 w mięśniakach macicy były znacząco podwyższone w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy (**Rycina 11 A – B**). Leczenie octanem uliprystalu obniżało ekspresję TGF- β 1, TGF- β 3, TGF- β R2 i SMAD3 w tkankach mięśniaków macicy (**Rycina 11 A – B**).



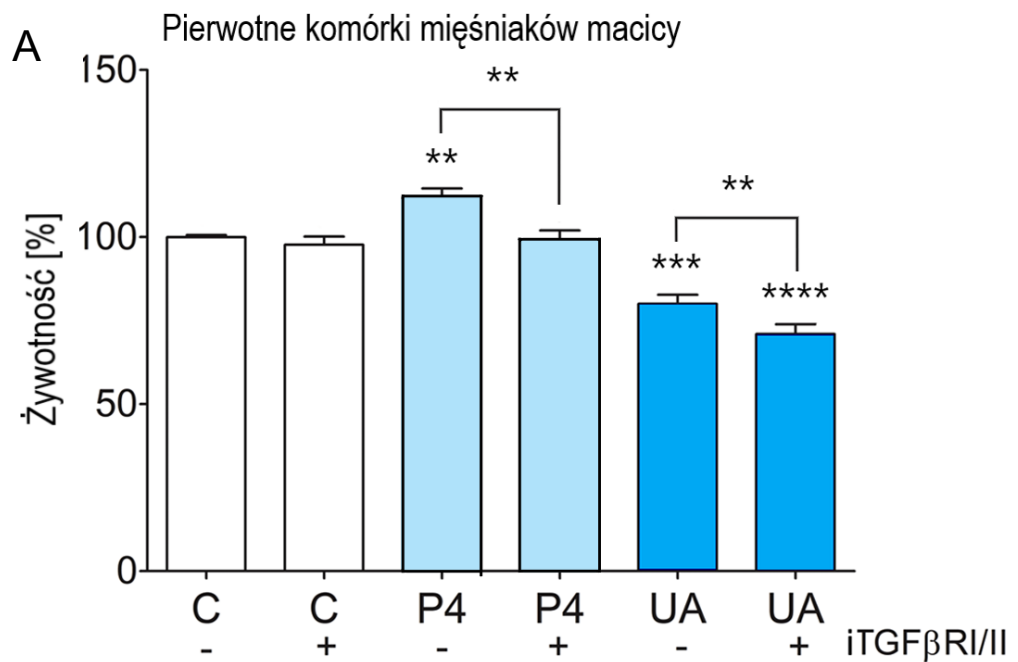


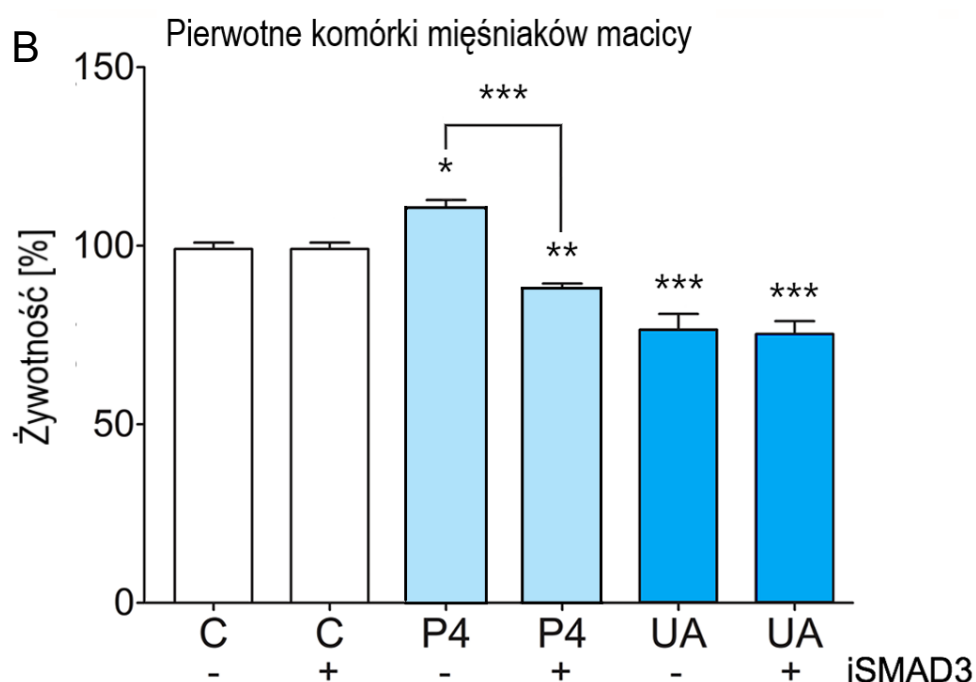
Rycina 11. Charakterystyka profilu ekspresji szlaku sygnałowego TGF- β w tkankach prawidłowej mięśniówki macicy i tkankach mięśniaków macicy przed i po leczeniu octanem uliprystalu.

Analiza qPCR ekspresji izoform transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) i ich receptorów (TGF- β R1, TGF- β R2) (**Rycina 11 A**) oraz przekaźników sygnału (SMAD2, SMAD3) (**Rycina 11 B**) w tkankach prawidłowej mięśniówki macicy (n=100) oraz mięśniaków macicy pochodzących od kobiet nieleczonych (NT-L) (n=150) i leczonych octanem uliprystalu (UA-L) (n=100). Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupami nieleczonymi i leczonymi (*, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001; ****, P <0,0001). M, prawidłowa mięśniówka macicy; NT-L, nielezione mięśniaki macicy; TGF- β 1, transformujący czynnik wzrostu β 1; TGF- β 2, transformujący czynnik wzrostu β 2; TGF- β 3, transformujący czynnik wzrostu β 3; TGF- β R1, receptor 1 transformującego czynnika wzrostu β ; TGF- β R2, receptor 2 transformującego czynnika wzrostu β ; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu.

4.3.2. Rola progesteronu i octanu uliprystalu w regulacji szlaku sygnałowego TGF- β w mięśniakach macicy

Dodanie inhibitora TGF- β RI/II (iTGF- β RI/II) do octanu uliprystalu lub progesteronu znacznie wzmocniło działanie hamujące octanu uliprystalu na żywotność komórek mięśniaków macicy i zahamowało stymulujące działanie progesteronu na żywotność komórek mięśniaków macicy (**Rycina 12 A**). Ponadto, sam iTGF- β RI/II nie wpływał na żywotność komórek mięśniaków macicy (**Rycina 12 A**). Gdy inhibitor SMAD3 (iSMAD3) został dodany do progesteronu lub octanu uliprystalu, zniósł on zależną od progesteronu stymulację żywotności pierwotnych komórek mięśniaków macicy, ale nie wykazywał żadnych efektów addytywnych do działania octanu uliprystalu (**Rycina 12 B**).



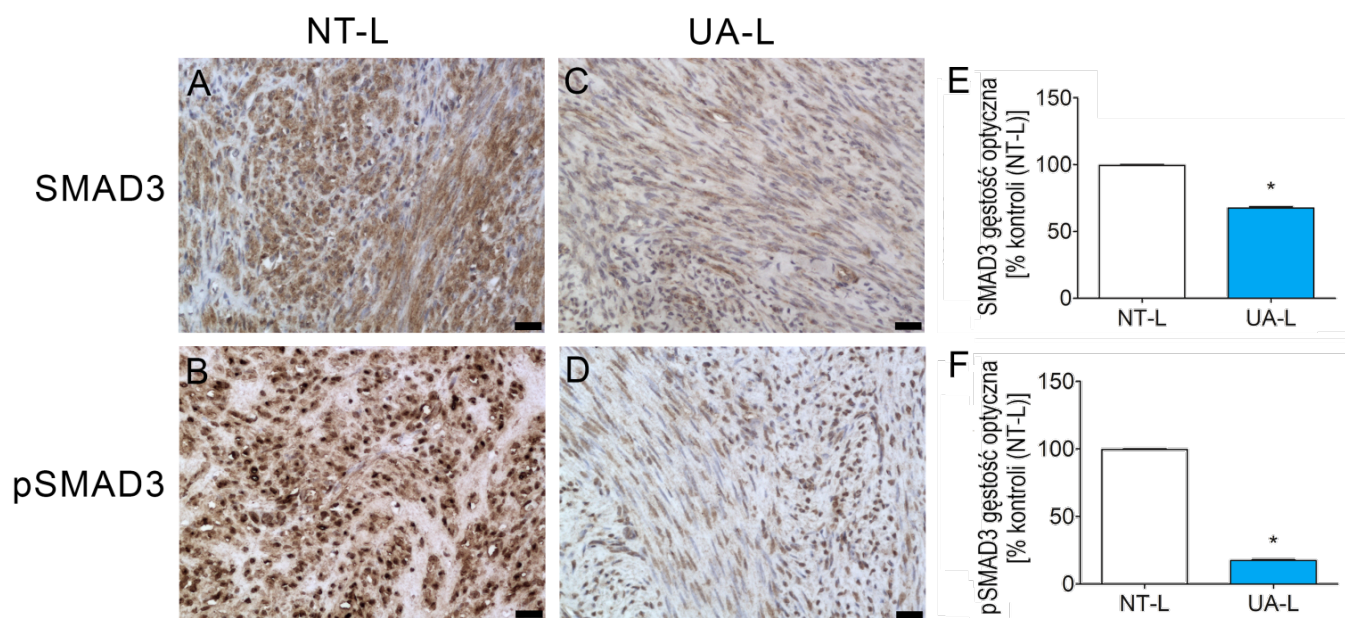


Rycina 12. Wpływ octanu uliprystalu i progesteronu oraz inhibitorów szlaku sygnalizacyjnego TGF- β na żywotność komórek mięśniaków macicy.

Wpływ octanu uliprystalu i progesteronu z/bez inhibitora receptorów TGF- β R1/II (**Rycina 12 A**) lub z/bez inhibitora SMAD3 (**Rycina 12 B**) lub na żywotność komórek pierwotnych komórek mięśniaków macicy (n=30) po 24-godzinnym leczeniu. Pomiarów dokonano za pomocą testu MTT. Za 100% proliferacji przyjęto wartość odpowiadającą proliferacji w próbie kontrolnej. Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupami nieleczonymi i leczonymi (*, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001; ****, P < 0,0001). C, kontrolne mięśniaki macicy; iSMAD3, SMAD3 inhibitor; iTGF- β R1/II, inhibitor receptora I/II TGF- β ; P4, progesteron; UA, octan uliprystalu.

4.3.3. Rola progesteronu i octanu uliprystalu w aktywacji szlaku sygnałowego TGF- β w mięśniakach macicy

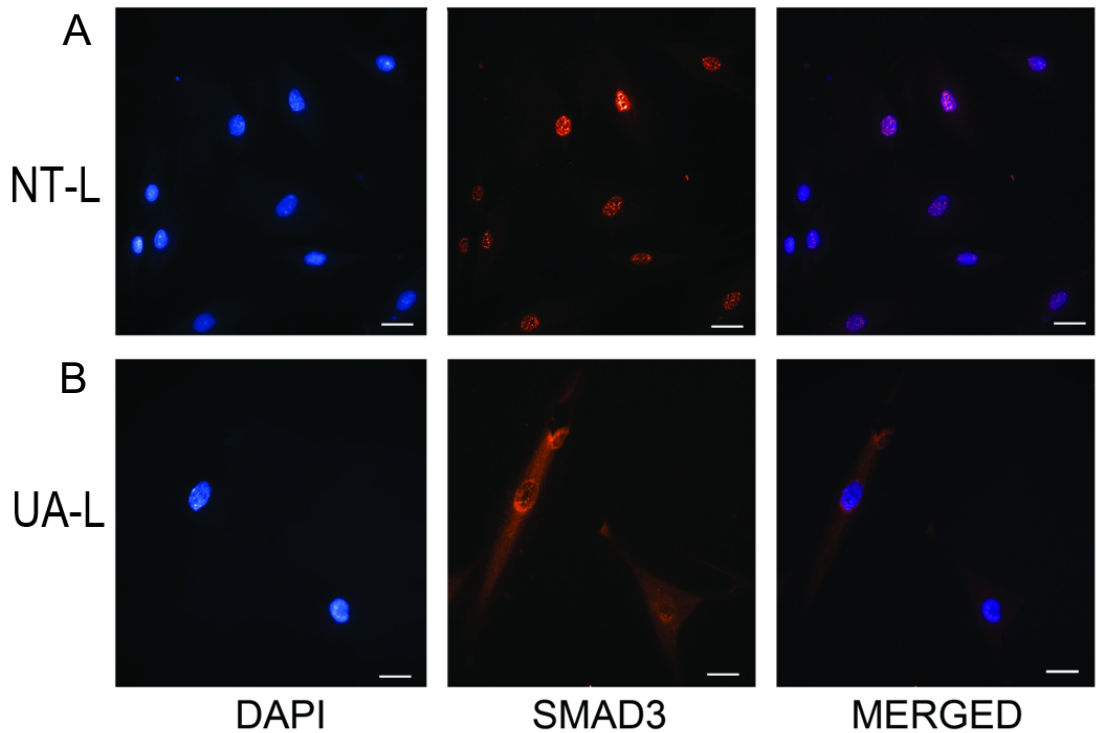
TGF- β może promować wzrost guza poprzez szlaki zależne i/lub niezależne od SMAD. Aby ustalić, czy progesteron i octan uliprystalu aktywują sygnalizację TGF- β 1/SMAD, zbadaliśmy ich wpływ na stosunek fosforylowanego (pSMAD3) i niefosforylowanego SMAD3 w mięśniakach macicy. Grupa mięśniaków nieleczonych (NT-L) wykazywała silnie pozytywne barwienie SMAD3 (**Rycina 13 A**) i pSMAD3 (**Rycina 13 B**), podczas gdy grupa mięśniaków leczonych octanem uliprystalu wykazywały wyraźnie słabsze cytoplazmatyczne barwienie SMAD3 (**Rycina 13 C**) i jądrowe barwienie pSMAD3 (**Rycina 13 D**). Automatyczna ocena ilościowa i ocena OD wykazały istotnie statystycznie słabsze barwienie SMAD3 i pSMAD3 w mięśniakach macicy leczonych octanem uliprystalu w porównaniu z nieleczonymi mięśniakami macicy (**Rycina 13 E – F**). Immunocytochemia wykazała lokalizację jądrową pSMAD3 tylko w nieleczonych mięśniakach macicy (**Rycina 14 A**), natomiast w mięśniakach macicy leczonych octanem uliprystalu nie stwierdzono translokacji pSMAD3 (**Rycina 14 B**).



Rycina 13. Wpływ octanu uliprystalu na SMAD3 w mięśniakach macicy.

Barwienie immunohistochemiczne (IHC) białka SMAD3 i pSMAD3 w mięśniakach macicy od pacjentek nieleczonych (NT-L) (n=150) (**Rycina 13 A – B**) i leczonych octanem uliprystalu (UA-L) (n=100) (**Rycina 13 C – D**). Pasek skali, 200 μ m. Ocena ilościowa barwienia

immunohistochemicznego SMAD3 i pSMAD3 (**Rycina 13 E – F**) była dokonana przez oprogramowanie Fiji (ImageJ). Z każdej barwionej sekcji losowo wybrano sześć obszarów, które zostały automatycznie ocenione ilościowo przez oprogramowanie Fiji, i oceniono ich gęstość optyczną (OD). Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. (* $P < 0,05$), w porównaniu z nieleczoną kontrolą. NT-L, kontrolne/nieleczone mięśniaki macicy; pSMAD3, fosforylowany SMAD3; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu.



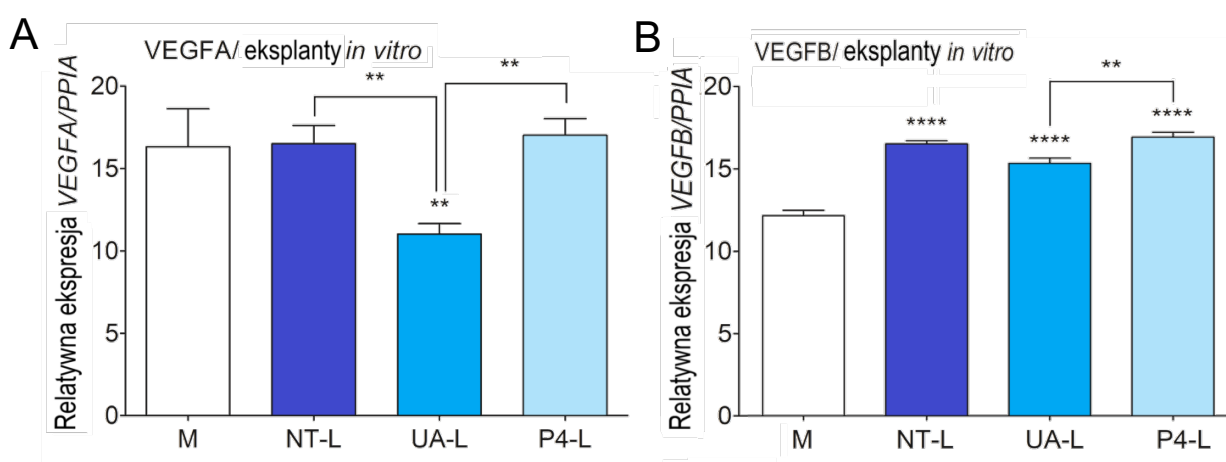
Rycina 14. Wpływ octanu uliprystalu na translokację jądrową SMAD3 w mięśniakach macicy.

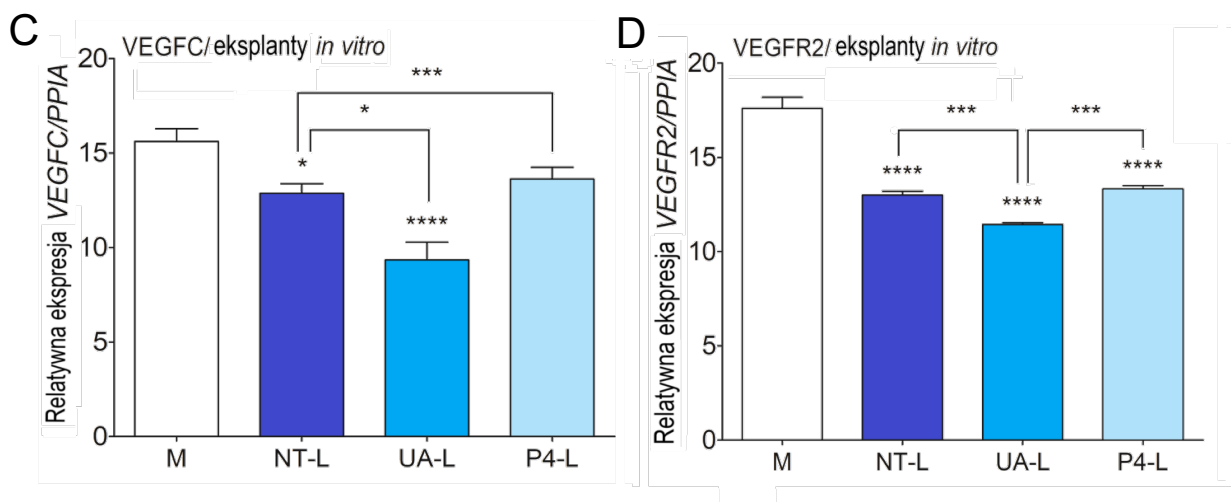
Immunocytochemiczna lokalizacja białka SMAD3 w komórkach pierwotnych mięśniaków macicy (n=30) nieleczonych (**Rycina 14 A**) lub leczonych octanem uliprystalu (**Rycina 14 B**). Pasek skali - 20 μ m. NT-L, nielezione mięśniaki macicy; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu.

4.4. Mechanizm działania progesteronu i octanu uliprystalu w regulacji VEGF w mięśniakach macicy

4.4.1. Charakterystyka profilu ekspresji rodziny VEGF w prawidłowej mięśniówce i mięśniakach macicy

Ekspresja VEGFA w prawidłowej mięśniówce macicy nie różniła się w porównaniu do nieleczonych mięśniaków macicy. Progesteron nie miał wpływu na ekspresję VEGFA, natomiast ekspresja VEGFA była istotnie niższa po leczeniu octanem uliprystalu (**Rycina 15 A**). Ekspresja VEGFB była istotnie wyższa w mięśniakach macicy w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy, progesteron nie miał wpływu na jego ekspresję w mięśniakach macicy, podczas gdy leczenie octanem uliprystalu obniżało jego ekspresję (**Rycina 15 B**). Ekspresja VEGFC i VEGFR2 była obniżona w nieleczonych mięśniakach macicy w porównaniu do prawidłowej mięśniówki macicy. Progesteron zwiększał ekspresję VEGFC, ale nie miała wpływu na VEGFR2, podczas gdy octan uliprystalu obniżał ekspresję obu tych genów (**Rycina 15 C – D**).



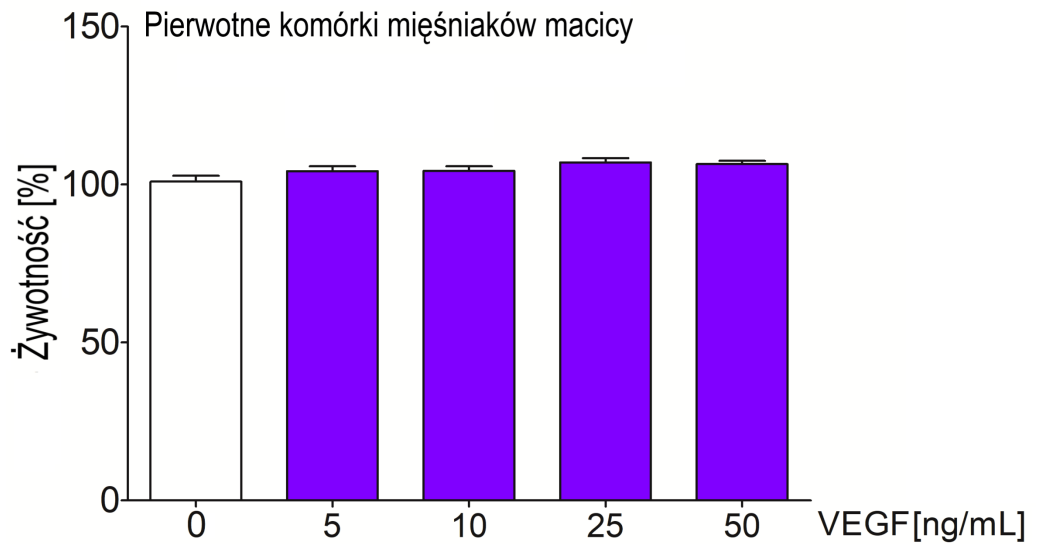


Rycina 15. Charakterystyka czynników rodziny VEGF.

Analiza qPCR ekspresji VEGFA, VEGFB, VEGFC i VEGFR2 (**Rycina 15 A – D**) w eksplantach mięśniaków macicy (n=30) leczonych progesteronem lub octanem uliprystalu. Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupami kontrolnymi i grupami leczonymi (*, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001; ****, P <0,0001). M, prawidłowa mięśniówka macicy; NT-L, nielezione mięśniaki macicy; P4, progesteron; P4-L, mięśniaki macicy leczone progesteronem; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu; VEGFA, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego A; VEGFB, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego B; VEGFC, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego C; VEGFR2, receptor 2 czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego.

4.4.2. Wpływ VEGF na żywotność komórek mięśniaków macicy

Stymulacja ludzkim rekombinowanym VEGF (przy 0–50 ng/ml) nie wykazała wpływu na żywotność komórek mięśniaków macicy (**Rycina 16**).



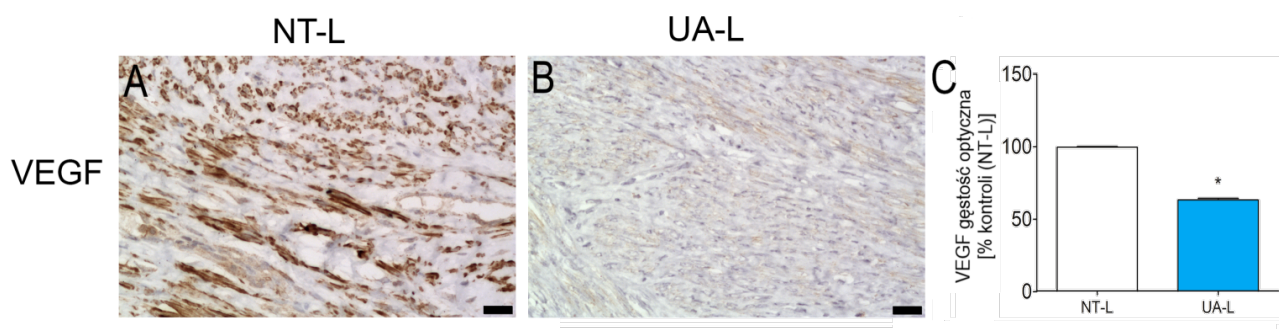
Rycina 16. Wpływ VEGF na żywotność komórek mięśniaków macicy.

Wpływ leczenia rekombinowanym ludzkim VEGF (**Rycina 16**) na żywotność komórek mięśniaków macicy (n=30). Za 100% proliferacji przyjęto wartość odpowiadającą proliferacji w próbie kontrolnej. VEGF, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego.

4.4.3. Rola progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 w regulacji ekspresji i wydzielania VEGF w mięśniakach macicy

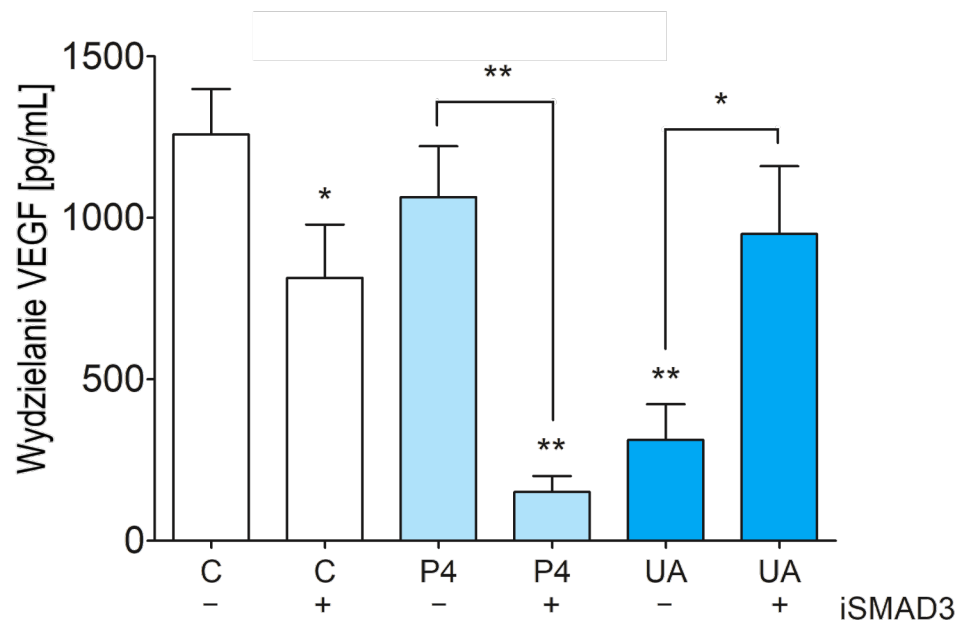
W nieleczonych mięśniakach macicy obserwowano silnie pozytywne barwienie VEGF (**Rycina 17 A**), podczas gdy barwienie VEGF było bardzo słabe w mięśniakach od kobiet leczonych octanem uliprystalu (**Rycina 17 B**). Automatyczna ocena ilościowa i ocena OD wykazały istotnie statystycznie słabsze barwienie VEGF w mięśniakach po leczeniu octanem uliprystalu w porównaniu z mięśniakami macicy bez leczenia (**Rycina 17 C**).

Octan uliprystalu hamował uwalnianie VEGF z eksplantów mięśniaków macicy, podczas gdy iSMAD3 znosił ten efekt indukowany przez octan uliprystalu (**Rycina 18**).



Rycina 17. Lokalizacja VEGF w mięśniakach leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu.

Barwienie immunohistochemiczne białka VEGF w mięśniakach macicy od pacjentek nieleczonych (NT-L) (n=150) (**Rycina 17 A**) i leczonych octanem uliprystalu (UA-L) (n=100) (**Rycina 17 B**). Ocena ilościowa barwienia immunohistochemicznego VEGF (**Rycina 17 C**) była dokonana przez oprogramowanie Fiji (ImageJ). Z każdej barwionej sekcji losowo wybrano sześć obszarów, które zostały automatycznie ocenione ilościowo przez oprogramowanie Fiji, i oceniono ich gęstość optyczną (OD). Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. (* $P < 0,05$), w porównaniu z nieleczoną kontrolą. Pasek skali, 200 μ m. NT-L, mięśniaki macicy nielezione; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu; VEGF, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego.



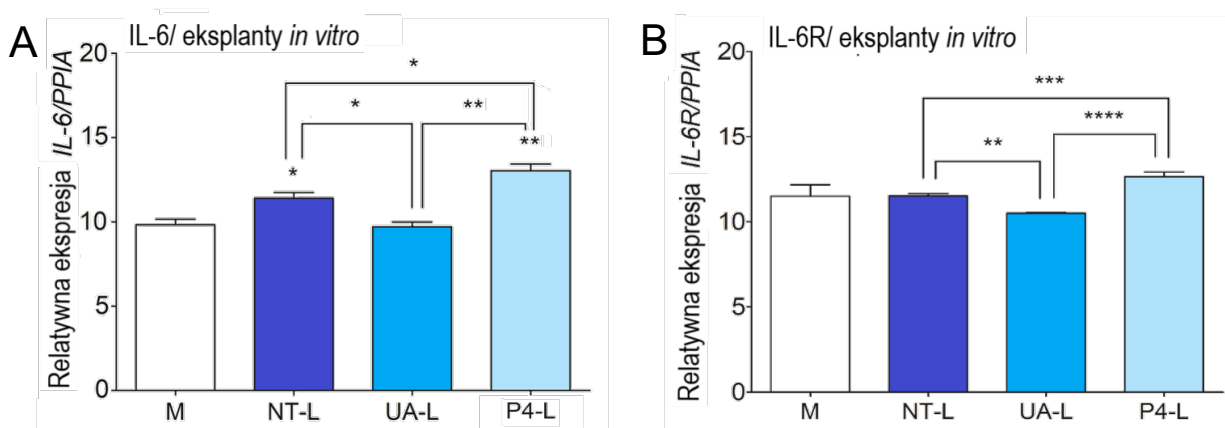
Rycina 18. Wpływ progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 na wydzielania VEGF w mięśniakach macicy.

Uwalnianie VEGF (**Rycina 18**) do medium komórkowego przez eksplanty mięśniaków macicy (n=30) w obecności lub bez iSMAD3 w grupach: kontrolnej, leczonej progesteronem i leczonej octanem uliprystalu. Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupami nieleczonymi i leczonymi (*, P < 0,05; **, P < 0,01). iSMAD3, inhibitor SMAD3; C, kontrola (nielezione mięśniaki macicy); P4, progesteron; UA, octan uliprystalu; VEGF, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego.

4.5. Mechanizm działania progesteronu i octanu uliprystalu w regulacji IL-6 w mięśniakach macicy

4.5.1. Charakterystyka profilu ekspresji rodziny IL-6 w prawidłowej mięśniówce i mięśniakach macicy

Ekspresja IL-6 była istotnie wyższa w eksplantach mięśniaków macicy w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy (**Rycina 19 A**). Ekspresja IL-6R w prawidłowej mięśniówce macicy nie różniła się w porównaniu do nieleczonych mięśniaków macicy (**Rycina 19 B**). Leczenie progesteronem zwiększało ekspresję IL-6 oraz IL-6R w mięśniakach macicy, podczas gdy octan uliprystalu obniżał ekspresję tych genów (**Rycina 19 A – B**).

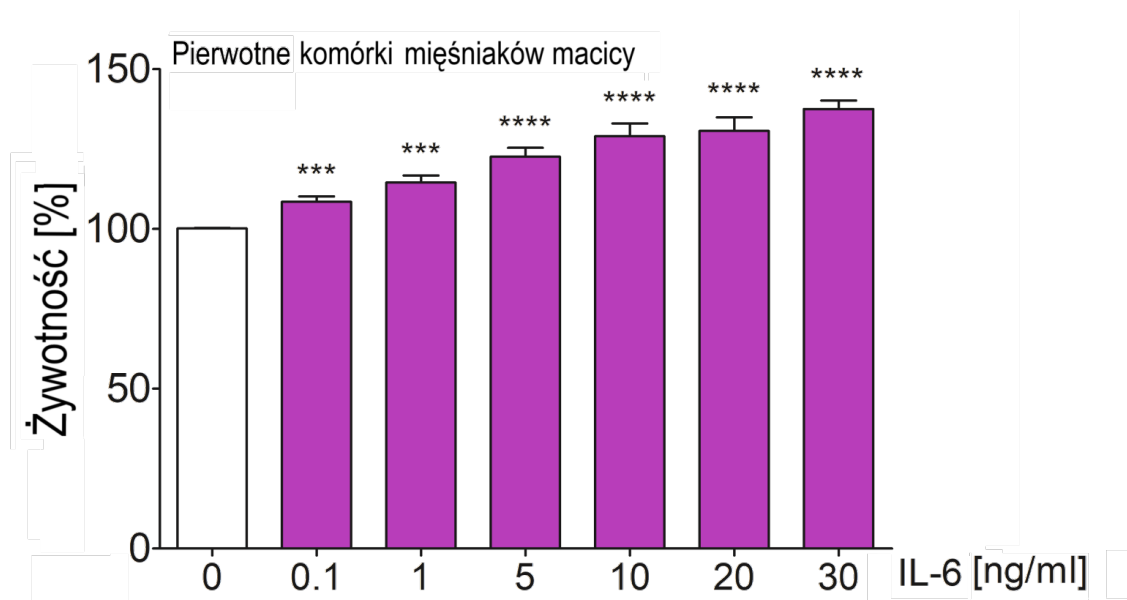


Rycina 19. Charakterystyka czynników rodziny IL-6.

Analiza qPCR ekspresji IL-6 oraz IL-6R (**Rycina 19 A – B**) w eksplantach mięśniaków macicy (n=30) leczonych progesteronem lub octanem uliprystalu. Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM (n=50). Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupą kontrolną a grupą leczoną (*, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001; ****, P <0,0001). IL-6, interleukina 6; IL-6R, receptor interleukiny 6; M, prawidłowa mięśniówka macicy; NT-L, nielezione mięśniaki macicy; P4, progesteron; P4-L, mięśniaki macicy leczone progesteronem; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu.

4.5.2. Wpływ IL-6 na żywotność komórek mięśniaków macicy

Leczenie ludzką rekombinowaną IL-6 (0 – 30 ng/ml) znacznie zwiększało żywotność komórek mięśniaków macicy (**Rycina 20**).



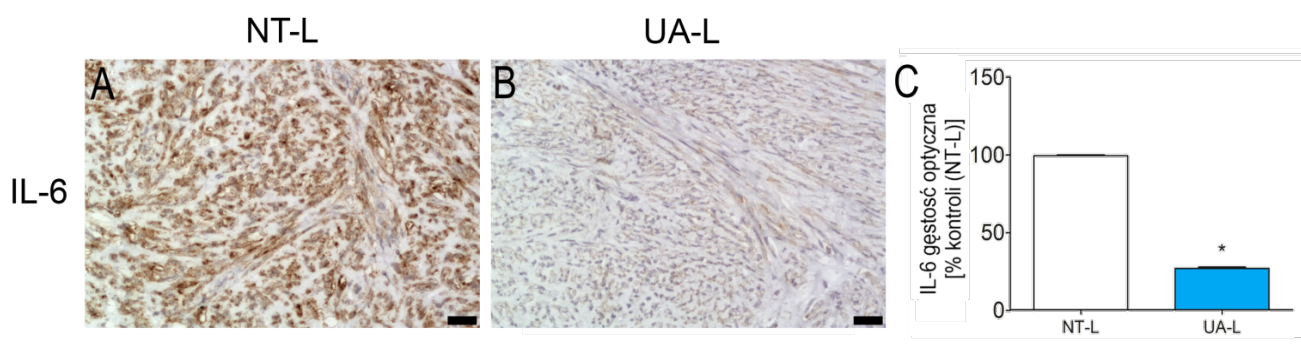
Rycina 20. Wpływ IL-6 na żywotność komórek mięśniaków macicy.

Wpływ leczenia ludzką rekombinowaną IL-6 (**Rycina 20**) na żywotność komórek mięśniaków macicy. Za 100% proliferacji przyjęto wartość odpowiadającą proliferacji w próbie kontrolnej. Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupami kontrolnymi i grupami leczonymi (***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$). IL-6, interleukina 6.

4.5.3. Rola progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 w regulacji ekspresji i wydzielania IL-6 w mięśniakach macicy

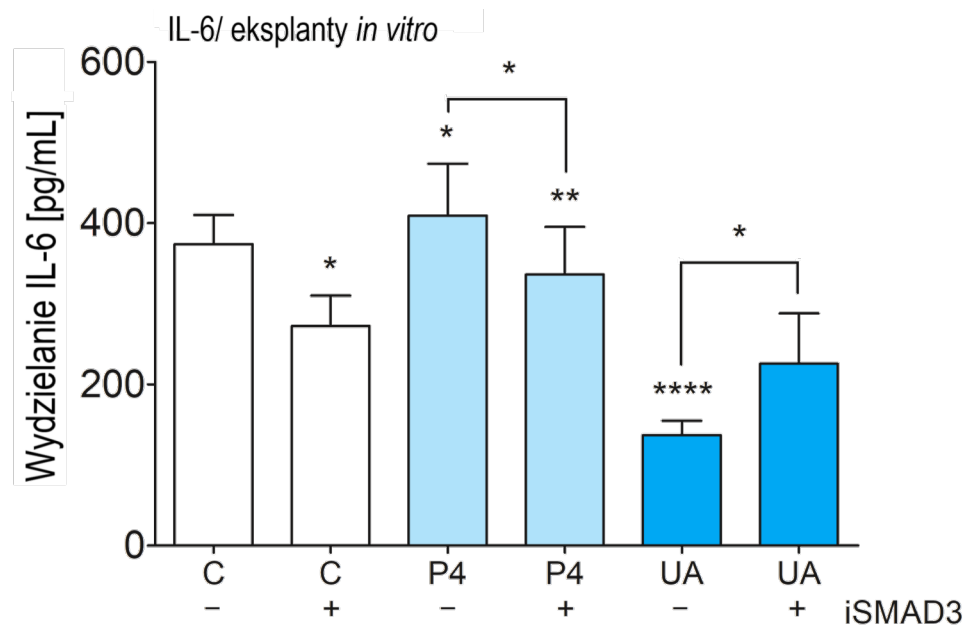
W nieleczonych mięśniakach macicy obserwowano silnie pozytywne barwienie IL-6 (**Rycina 21 A**), podczas gdy barwienie IL-6 było bardzo słabe w mięśniakach od kobiet leczonych octanem uliprystalu (**Rycina 21 B**). Automatyczna ocena ilościowa i ocena OD wykazały istotnie statystycznie słabsze barwienie IL-6 w mięśniakach po leczeniu octanem uliprystalu w porównaniu z mięśniakami macicy bez leczenia (**Rycina 21 C**).

Leczenie octanem uliprystalu eksplantów mięśniaków macicy znacznie zmniejszyło wydzielanie przez nie IL-6, podczas gdy dodanie iSMAD3 częściowo zniósł ten efekt octanu uliprystalu (**Rycina 22**). Ponadto, iSMAD3 zmniejszył również wydzielanie IL-6 stymulowane przez progesteron (**Rycina 22**).



Rycina 21. Lokalizacja IL-6 w mięśniakach leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu.

Barwienie immunohistochemiczne białka IL-6 w mięśniakach macicy od pacjentek nieleczonych (NT-L) (n=150) i leczonych octanem uliprystalu (UA-L) (n=100) (**Rycina 21 A – B**). Ocena ilościowa barwienia immunohistochemicznego IL-6 (**Rycina 21 C**) była dokonana przez oprogramowanie Fiji (ImageJ). Z każdej barwionej sekcji losowo wybrano sześć obszarów, które zostały automatycznie ocenione ilościowo przez oprogramowanie Fiji, i oceniono ich gęstość optyczną (OD). Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. (* $P < 0,05$), w porównaniu z nieleczoną kontrolą. Pasek skali, 200 μ m. IL-6, interleukina 6; NT-L, mięśniaki macicy nielezione; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu.



Rycina 22. Wpływ progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 na wydzielania IL-6 w mięśniakach macicy.

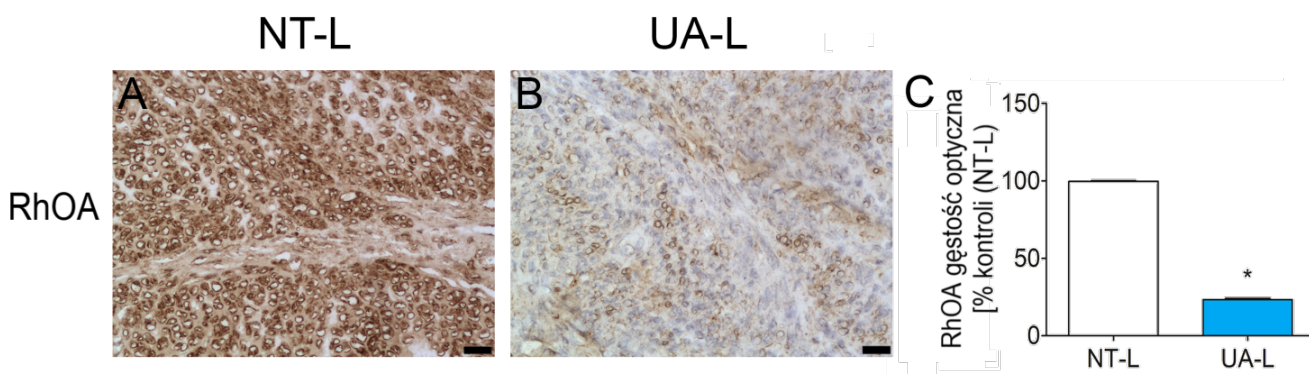
Uwalnianie IL-6 (**Rycina 22**) do medium komórkowego przez eksplanty mięśniaków macicy (n=30) w obecności lub bez iSMAD3 w grupach: kontrolnej, leczonej progesteronem i leczonej octanem uliprystalu. Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupami nieleczonymi i leczonymi (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ****, $P < 0,0001$). C, kontrola (nielezione mięśniaki macicy); IL-6, interleukina 6; iSMAD3, inhibitor SMAD3; P4, progesteron; UA, octan uliprystalu.

4.6. Rola progesteronu i octanu uliprystalu w regulacji ścieżki sygnałowej RhOA w mięśniakach macicy

4.6.1 Charakterystyka profilu ekspresji RhoA i jego lokalizacja w mięśniakach macicy

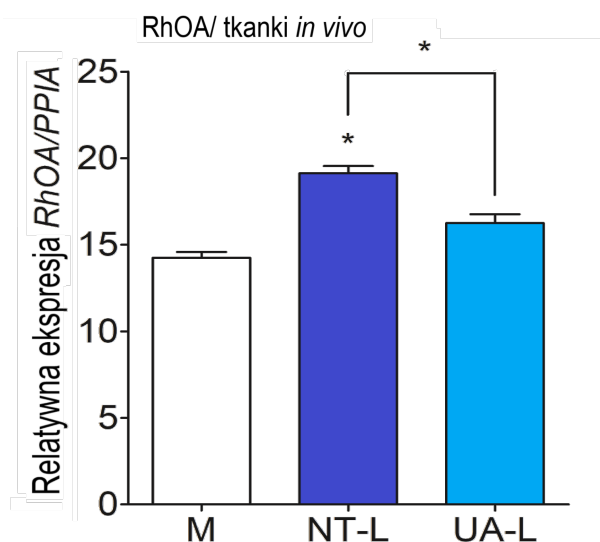
W nieleczonych mięśniakach macicy obserwowano silnie pozytywne barwienie RhOA (**Rycina 23 A**), podczas gdy barwienie RhOA było bardzo słabe w mięśniakach od kobiet leczonych octanem uliprystalu (**Rycina 23 B**). Automatyczna ocena ilościowa i ocena OD wykazały istotnie statystycznie słabsze barwienie RhOA w mięśniakach po leczeniu octanem uliprystalu w porównaniu z mięśniakami macicy bez leczenia (**Rycina 23 C**).

Ekspresja RhOA była istotnie podwyższona w mięśniakach macicy w porównaniu do prawidłowej mięśniówki macicy. Ponadto, ekspresja RhOA była istotnie niższa w mięśniakach kobiet leczonych w porównaniu do mięśniaków kobiet nieleczonych octanem uliprystalu przed zabiegiem (**Rycina 24 A**).



Rycina 23. Lokalizacja RhOA w mięśniakach macicy.

Barwienie immunohistochemiczne białka RhOA w mięśniakach macicy od pacjentek nieleczonych (NT-L) (n=150) (**Rycina 23 A**) i leczonych octanem uliprystalu (UA-L) (n=100) (**Rycina 23 B**). Ocena ilościowa barwienia immunohistochemicznego RhOA (**Rycina 23 C**) była dokonana przez oprogramowanie Fiji (ImageJ). Z każdej barwionej sekcji losowo wybrano sześć obszarów, które zostały automatycznie ocenione ilościowo przez oprogramowanie Fiji, i oceniono ich gęstość optyczną (OD). Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. (* P < 0, 05), w porównaniu z nieleczoną kontrolą. Pasek skali, 200µm. NT-L, mięśniaki macicy nielezione; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu.



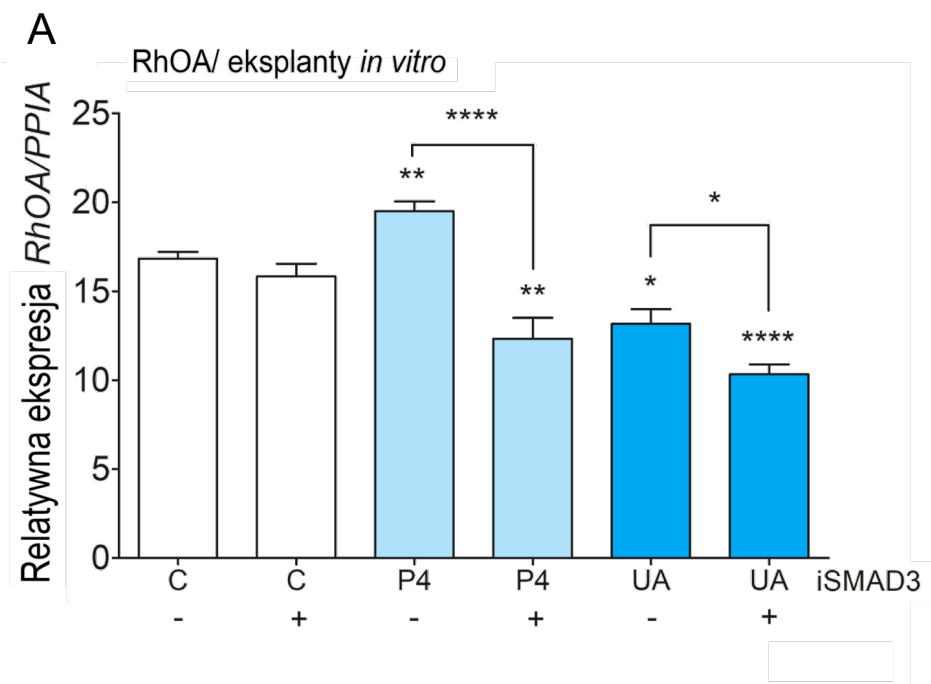
Rycina 24. Ekspresja RhOA w mięśniakach macicy.

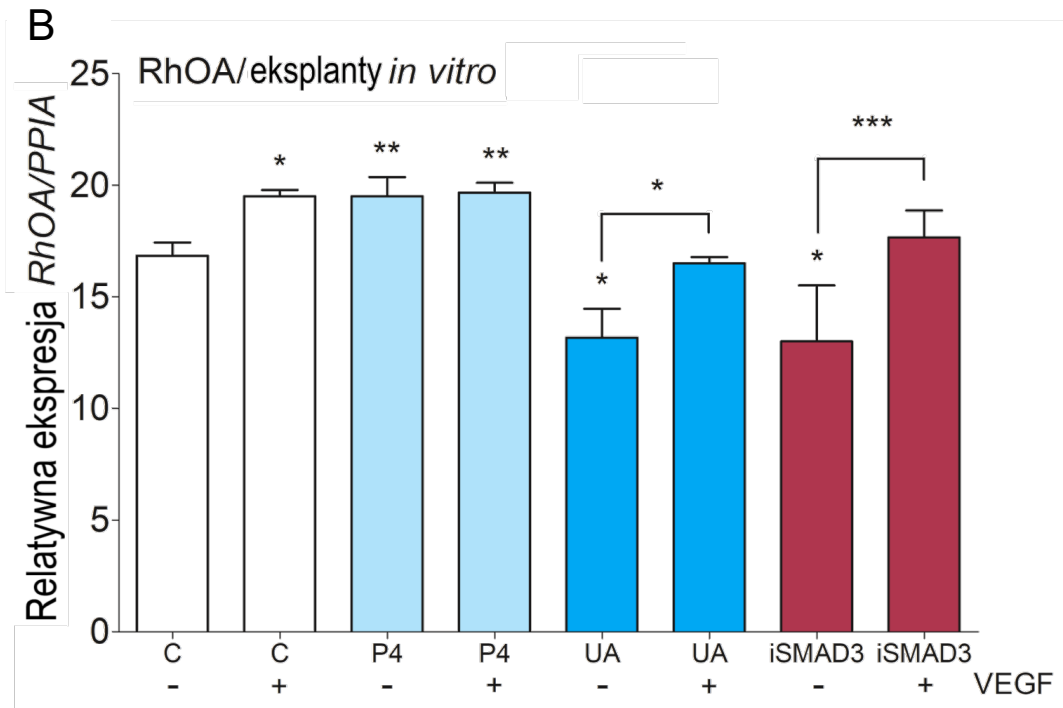
Analiza qPCR ekspresji genu RhoA w tkance mięśniaków macicy od kobiet nieleczonych (NT-L) (n=150) i leczonych octanem uliprystalu (UA-L) (n=100) oraz w prawidłowej mięśniówce macicy (n=100) (**Rycina 24**). Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między nietraktowanymi grupami kontrolnymi i leczonymi (*, $P < 0,05$). M, prawidłowa mięśniówka macicy; NT-L, nielezione mięśniaki macicy; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu.

4.6.2. Rola progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 w regulacji ekspresji i wydzielania RhOA w mięśniakach macicy

Octan uliprystalu znacząco obniżył ekspresję RhOA w eksplantach mięśniaków macicy (**Rycina 25 A**). Progesteron zwiększał ekspresję RhOA w eksplantach mięśniaków macicy, a efekt ten był znoszony przez iSMAD3 (**Rycina 25 A**). Dodanie iSMAD3 do octanu uliprystalu wykazało addytywny wpływ na obniżenie ekspresji RhoA w eksplantach mięśniaków macicy (**Rycina 25 A**).

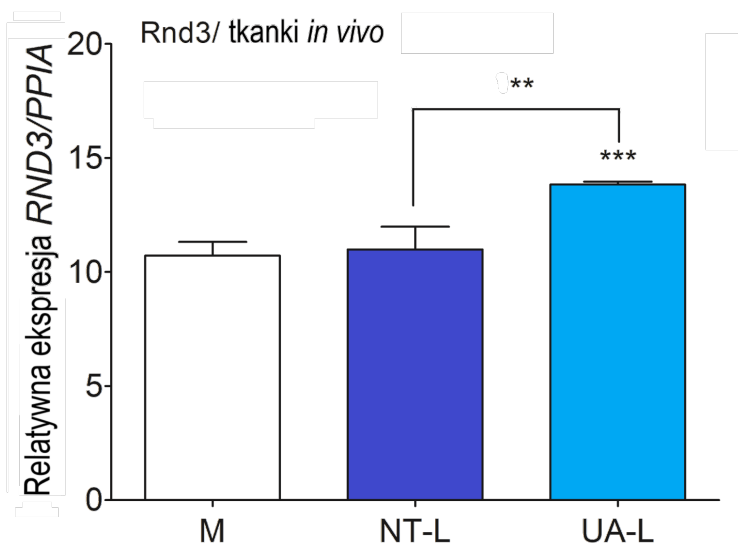
Jednoczesne leczenie eksplantów mięśniaków macicy VEGF z progesteronem nie zwiększyło stymulujących efektów progesteronu na ekspresję RhOA (**Rycina 25 B**). VEGF zniósł zależną od octanu uliprystalu i iSMAD3 regulację w dół ekspresji RhoA (**Rycina 25 B**). Ponadto, leczenie octanem uliprystalu zwiększało ekspresję antagonisty RhoA Rnd3 w tkankach mięśniaków macicy (**Rycina 25**).





Rycina 25. Ekspresja RhOA po leczeniu progesteronem, octanem uliprystalu w obecności lub bez iSMAD3 lub VEGF.

Analiza qPCR ekspresji RhoA w eksplantach mięśniaków macicy (n=30) po leczeniu progesteronem, octanem uliprystalu w obecności lub bez iSMAD3 (**Rycina 25 A**) lub VEGF (**Rycina 25 B**). Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między nietraktowanymi grupami kontrolnymi i leczonymi (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$). C, kontrola (nielezione mięśniaki macicy); iSMAD3, inhibitor SMAD3; P4, progesteron; UA, octan uliprystalu; VEGF, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego.

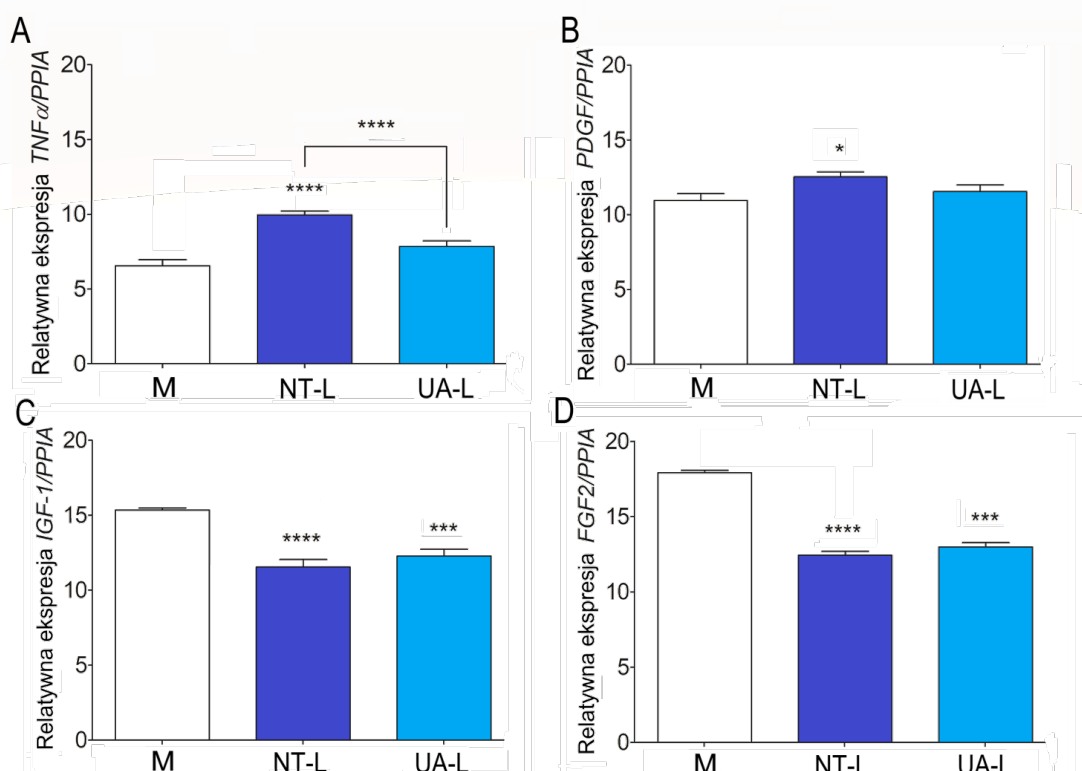


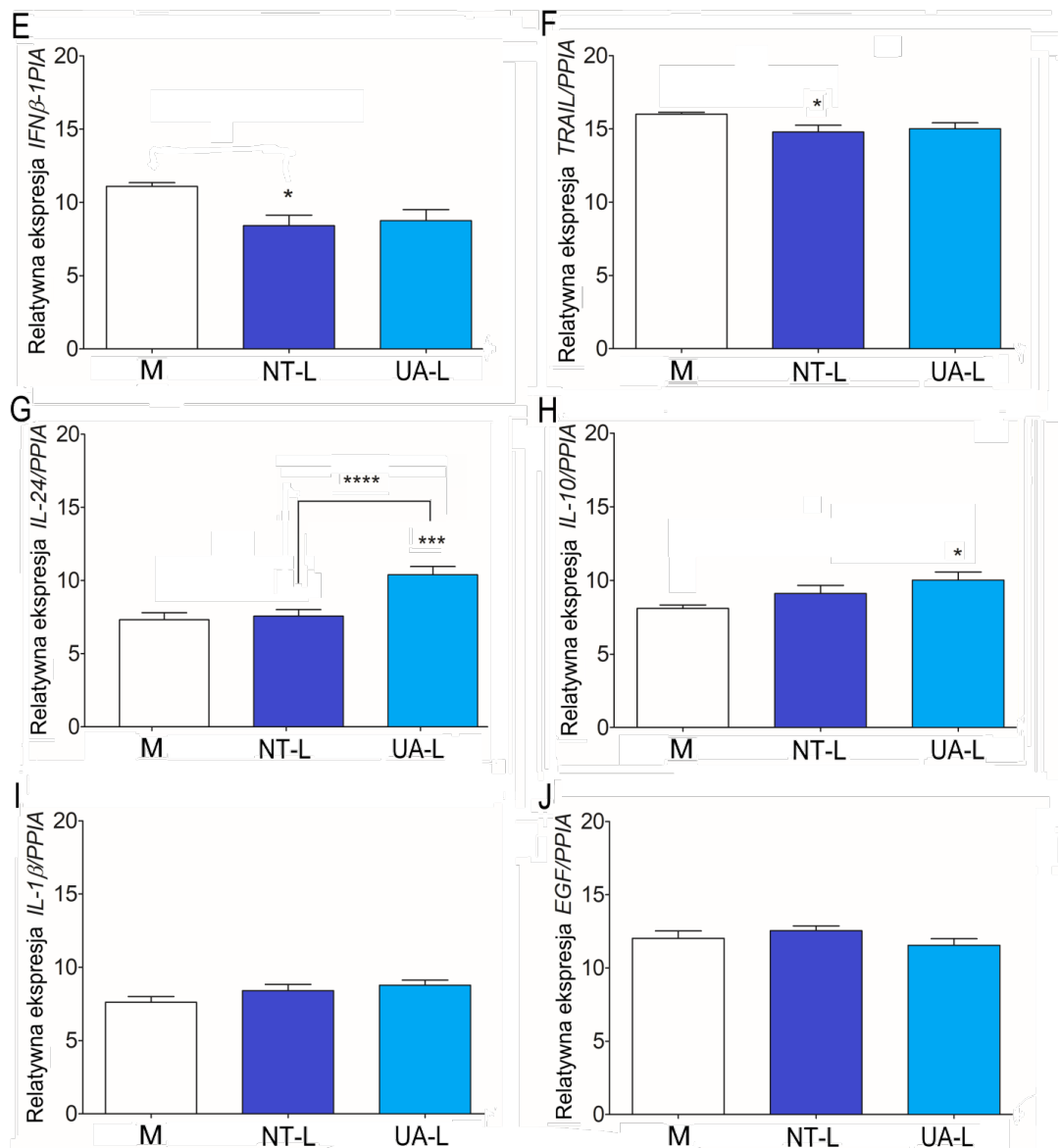
Rycina 26. Ekspresja Rnd3 w tkankach mięśniaków macicy.

Analiza qPCR ekspresji genu Rnd3 w tkance mięśniaków macicy od kobiet nieleczonych (NT-L) (n=150) i leczonych octanem uliprystalu (UA-L) (n=100) oraz w prawidłowej mięśniówce macicy (n=100) (**Rycina 26**). Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między nietraktowanymi grupami kontrolnymi i leczonymi (**, P <0,01; ***, P <0,001). M, prawidłowa mięśniówka macicy; NT-L, nielezione mięśniaki macicy; UA-L, mięśniaki macicy leczone octanem uliprystalu.

4.7. Ekspresja genów różnych typów interleukin i czynników wzrostu w prawidłowej mięśniówce macicy oraz mięśniakach macicy

Ekspresja TNF- α oraz PDGF (**Rycina 27 A – B**) była istotnie wyższa w mięśniakach macicy w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy. Po leczeniu octanem uliprystalu ekspresja TNF- α była niższa niż w mięśniakach nieleczonych, porównywalna do ekspresji w prawidłowej mięśniówce macicy (**Rycina 27 A**). Ekspresja IGF-1, FGF2, INF- β 1 oraz TRAIL (**Rycina 27 C – F**) była istotnie obniżona w mięśniakach macicy w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy. Ich ekspresja nie zmieniała się po leczeniu octanem uliprystalu. Ekspresja IL-24 (**Rycina 27 G**) w nieleczonych mięśniakach macicy była porównywalna do ekspresji w prawidłowej mięśniówce macicy, jednak po leczeniu octanem uliprystalu jej ekspresja była istotnie podwyższona w porównaniu do mięśniaków nieleczonych jak i prawidłowej mięśniówki macicy. Ekspresja IL-10 (**Rycina 27 H**) była również podwyższona w mięśniakach leczonych octanem uliprystalu w porównaniu do prawidłowej mięśniówki macicy, ale nie do mięśniaków przed leczeniem. Nie zaobserwowano istotnych statystycznych różnic w ekspresji IL-1 β oraz EGF (**Rycina 27 I – J**) w mięśniakach macicy przed i po leczeniu octanem uliprystalu oraz w prawidłowej mięśniówce macicy.





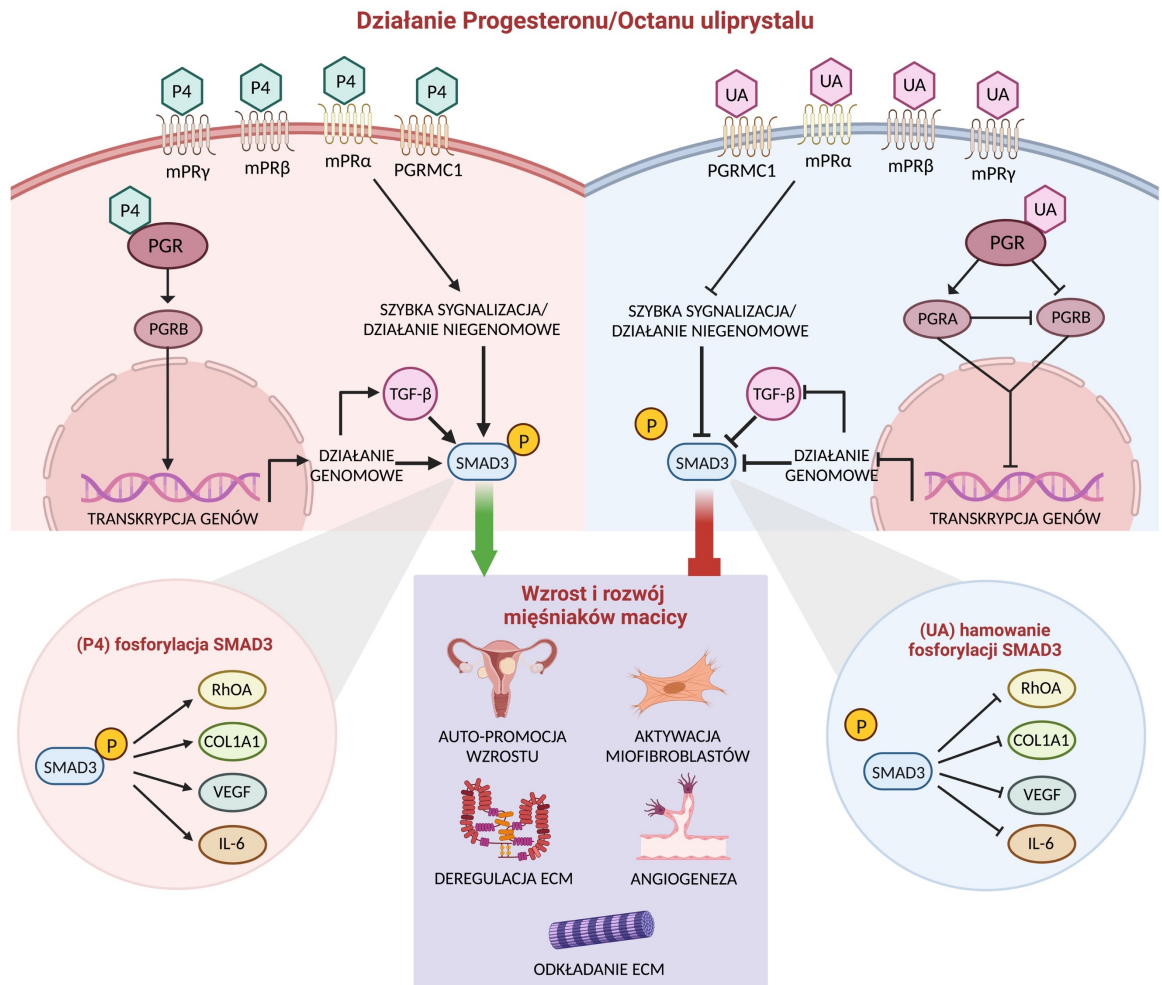
Rycina 27. Ekspresja różnych typów interleukin i czynników wzrostu w tkankach prawidłowej mięśniówki macicy oraz mięśniaków macicy.

Analiza qPCR ekspresji TNF- α , PDGF, IGF-1, FGF2, IFN- β 1, TRAIL, IL-24, IL-10, IL-1 β oraz EGF (**Rycina 27 A – J**) w tkance mięśniaków macicy od kobiet nieleczonych (NT-L) (n=150) i leczonych octanem uliprystalu (UA-L) (n=100) oraz w prawidłowej mięśniówce macicy (n=100). Każdy słupek reprezentuje stosunek badanego genu i genu referencyjnego PPIA \pm SEM. Gwiazdki wskazują istotne różnice między grupami kontrolnymi i grupami leczonymi (*, P <0,05; ***, P <0,001; ****, P <0,0001). IGF-1, insulinopodobny czynnik wzrostu 1; IL-1 β , interleukina 1 β ; IL-10, interleukina 10; IL-24, interleukina 24; IFN- β 1, interferon β 1; EGF, naskórkowy czynnik wzrostu; FGF2, czynnik wzrostu fibroblastów 2; PDGF, płytkopochodny czynnik wzrostu; TNF- α , czynnik martwicy nowotworów α ;

M, prawidłowa mięśniówka macicy; NT-L, nieleczone mięśniaki macicy; UA-L, mięśniaki leczone octanem uliprystalu.

4.8. Dwa różne mechanizmy działania progesteronu i selektywnego modulatora receptora progesteronowego, octanu uliprystalu, w mięśniakach macicy

Progesteron indukuje klasyczną sygnalizację poprzez wiązanie się z PGR zlokalizowanym w cytoplazmie. Ta konformacja aktywuje działanie genomowe poprzez transkrypcję docelowych genów w komórkach mięśniaków macicy. Jednym z efektów działania genomowego progesteronu jest fosforylacja SMAD3, która kontroluje wzrost i rozwój guza. Nielezione mięśniaki macicy mają wysoką ekspresję genów i białek błonowych receptorów progesteronowych, takich jak mPR α , mPR β i PGRMC1. Progesteron inicjuje szybką nieklasyczną sygnalizację błonowych receptorów progesteronowych poprzez aktywację dalszych szlaków prowadzących do wzrostu i rozwoju guza. Jednym z tych celów jest SMAD3, którego fosforylacja jest stymulowana przez progesteron. Przeciwnie, octan uliprystalu wykazał specyficzne działanie antagonistyczne na receptory progesteronowe. Octan uliprystalu zmniejsza ekspresję receptorów błonowych mPR α , mPR β , mPR γ i PGRMC1, ale nie wykazuje wpływu na PGR i PGRMC2 na poziomie genów i/lub białek w mięśniakach macicy. Poprzez blokowanie receptorów progesteronowych, octan uliprystalu hamował proliferację, wzrost lub akumulację macierzy zewnątrzkomórkowej mięśniaków macicy poprzez szlak sygnałowy TGF- β /SMAD3 i dalsze specyficzne szlaki.



Rycina 28. Przegląd działania progesteronu i octanu uliprystalu poprzez genomową i niegenomową sygnalizację w komórkach mięśniaków macicy.

COL1A1, kolagen typu I łańcuch alfa 1; ECM, macierz zewnątrzkomórkowa; IL-6, interleukina 6; mPR α , błonowy receptor progesteronowy α ; mPR β , błonowy receptor progesteronowy β ; mPR γ , błonowy receptor progesteronowy γ ; P4, progesteron; PGR, jądrowy receptor progesteronowy; PGRMC1, błonowy receptor progesteronowy 1; PGRMC2, błonowy receptor progesteronowy 2; PGRA, podjednostka A jądrowego receptora progesteronowego; PGRB, podjednostka B jądrowego receptora progesteronowego; TGF- β , UA, octan uliprystalu; VEGF, czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego. Rycina została przygotowana w Biorender.com.

5. DYSKUSJA

Mechanizm działania progesteronu oraz jego jądrowych i błonowych receptorów w biologii mięśniaków macicy jest nadal słabo poznany. Dotychczasowe badania wykazały podwyższoną ekspresję PGR w mięśniakach macicy [127]. Obserwacje te są spójne z wynikami badań własnych przedstawiającymi podwyższoną ekspresję PGR w mięśniakach macicy w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy.

Dotychczas, zidentyfikowano dwie izoformy jądrowego receptora progesteronowego tj. PGRA i PGRB. Obie te izoformy wywierają inny efekt transkrypcyjny na promotory zależne od progesteronu [128]. PGRB działa jako aktywator transkrypcji genów zależnych od progesteronu, podczas gdy PGRA jest inhibitorem receptorów hormonów steroidowych, jak również tworząc heterodimery z izoformą PGRB hamuje jej aktywność transkrypcyjną [101]. Wpływ octanu uliprystalu na wszystkie typy receptorów progesteronowych w mięśniakach macicy był słabo poznany [127, 129]. Octan uliprystalu wykazuje głównie aktywność antagonistyczną w stosunku do izoformy PGRB i agonistyczną w stosunku do izoformy PGRA. Wykazano również, że octan uliprystalu zwiększa ekspresję izoformy PGRA, a zmniejsza ekspresję izoformy PGRB w komórkach mięśniaków macicy, ale nie w komórkach prawidłowej mięśniówki macicy [127, 130]. Ponieważ sekwencje genów izoform PGRA i PGRB różnią się tylko tym, że PGRB ma dodatkowe 750 bp na początku pierwszego eksonu, nie jest możliwa bezpośrednia ocena ekspresji genów samej izoformy PGRA [131]. Badania własne wykazały, że ekspresja PGRB została obniżona po leczeniu octanem uliprystalu, a ekspresja całkowitego PGRA/B została zwiększona, co pośrednio sugeruje, że octan uliprystalu zwiększa ekspresję izoformy PGRA w mięśniakach macicy. Nasze wyniki wskazują zatem, że octan uliprystalu może hamować transkrypcyjne działanie PGRB poprzez efekt antagonistyczny. Octan uliprystalu może nasilać hamujące działanie PGRA jako jego agonisty, powodując podwójne hamowanie aktywności PGR w mięśniakach macicy. W badaniach własnych stwierdzono, że octan uliprystalu nie miał wpływu na ekspresję PGR i PGRMC2, natomiast obniżał ekspresję receptorów błonowych mPR α , mPR β , mPR γ i PGRMC1 na poziomie genów i białek. Te wyniki sugerują, że nie tylko PGR, ale także receptory błonowe mogą odgrywać kluczową rolę w biologii mięśniaków macicy, jak również w leczeniu z wykorzystaniem octanu uliprystalu.

Dotychczasowe badania wykazały, że progesteron aktywuje szlaki sygnałowe zaangażowane w odkładanie się macierzy zewnątrzkomórkowej i proliferacji komórek [132]. Sygnalizacja TGF- β została uznana za główną ścieżkę w rozwoju zwłóknienia tkanek [60]. Nadmierne nagromadzenie się składników macierzy zewnątrzkomórkowej pełni ważną rolę w tworzeniu struktury mięśniaków macicy [132]. Badania własne podkreślają kluczową rolę progesteronu w regulacji szlaku sygnałowego TGF- β związanego z włóknieniem w mięśniakach macicy. Dotychczasowe badania sugerowały, że podtypem dominującym w mięśniakach macicy jest izoforma TGF- β 3 [62, 63]. Badania własne wykazały, że leczenie octanem uliprystalu obniżało ekspresję izoform TGF- β 1, TGF- β 3, TGF- β 2, SMAD3 w mięśniakach macicy. Wcześniejsze badania również wykazały hamujący wpływ octanu uliprystalu na ekspresję TGF- β 3, TGF- β 2, pSMAD2 i pSMAD3 [133, 134]. Wyniki badań własnych sugerują, że receptory TGF- β są kluczowe dla działania progesteronu i octanu uliprystalu, ponieważ ich hamowanie wzmacnia działanie octanu uliprystalu i znosi efekt działania progesteronu, co znacznie zmniejsza żywotność pierwotnych komórek mięśniaków macicy. Zablokowanie translokacji jądrowej SMAD3 przez octan uliprystalu wskazuje, że efekt hamowania włóknienia przez octan uliprystalu może być wywołany poprzez zakłócenia transdukcji sygnału przez białka SMAD.

Oprócz SMAD, TGF- β jest w stanie aktywować także inne cząsteczki sygnałowe w celu modulowania dalszych odpowiedzi komórkowych [135, 136]. TGF- β mogą regulować GTPazy Rho, takie jak czynniki Ras, RhoA, Cdc42 i Rac1 inne niż SMAD, poprzez wpływ na fosforylację lub bezpośrednią interakcję [137]. Kinazy te mogą również aktywować kanoniczny szlak SMAD [135]. RhoA odgrywa ważną rolę w różnych procesach, w tym we wzroście komórek, proliferacji i modulacji cytoszkieletu aktynowego i macierzy zewnątrzkomórkowej [138, 139]. Dotychczas wykazano, że współdziałanie RhoA z białkami cytoszkieletu regulują wzrost mięśniaków macicy [132]. Stwierdzono podwyższoną ekspresję RhoA w mięśniakach macicy w porównaniu z prawidłową mięśniówką macicy [140]. Badania własne również wykazały nadekspresję RhoA w mięśniakach macicy. Progesteron i octan uliprystalu regulowały ekspresję RhoA w sposób zależny od SMAD3 - progesteron zwiększał ekspresję RhoA, natomiast octan uliprystalu obniżał, co sugerowało, że działanie RhoA w mięśniakach macicy może być również regulowane przez kanoniczną sygnalizację SMAD. W badaniach własnych octan

uliprystalu zwiększał ekspresję antagonisty RhoA Rnd3 w mięśniakach macicy co było nowym odkryciem z potencjałem przyszłego docelowego zastosowania.

Kolageny są kluczowymi zewnątrzkomórkowymi białkami które utrzymują strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej [141]. Zwiększona synteza kolagenu i jego nieprawidłowa struktura w mięśniakach macicy jest jednym z efektów działania TGF- β 1 na macierz zewnątrzkomórkową [132, 141]. Wiadomo, że przekaźnictwo sygnałowe SMAD3 odgrywa ważną rolę w indukowanej przez TGF- β transkrypcji genów związanych z włóknieniem, w tym kolagenów [142, 143]. Wcześniejsze badania sugerowały, że SMAD3 zaangażowany jest w zwłóknienie indukowane przez TGF- β w komórkach keloidowych [144]. Wykazano, że hamowanie SMAD3 może zmniejszać ekspresję genów prokolagenu typu I i III w fibroblastach [144]. Wyciszenie SMAD3 indukowało redukcję odkładania się macierzy zewnątrzkomórkowej i procesu włóknienia [144]. Badania własne dostarczają dodatkowych dowodów na to, że leczenie octanem uliprystalu może wpływać na kluczowe szlaki regulujące czynniki profibrotyczne, co jest związane z nieprawidłowym odkładaniem się macierzy zewnątrzkomórkowej w mięśniakach macicy.

Oprócz TGF- β inne czynniki wzrostu mogą regulować biologię mięśniaków macicy [145]. Na podstawie badań własnych spośród 14 przeanalizowanych różnych czynników wzrostu do dalszych analiz zostały wybrane IL-6 oraz VEGF, które wykazywały najistotniejsze zmiany w mięśniakach macicy przed i po leczeniu octanem uliprystalu.

Wykazano, że IL-6 reguluje przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej w twardzinie układowej lub idiopatycznym włóknieniu płuc [146, 147]. IL-6 może sprzyjać zwłóknieniu poprzez pośredniczenie w przewlekłym zapaleniu oraz poprzez aktywację szlaku TGF- β /SMAD [146, 148, 149]. Badania sugerują, że SMAD2/3 może być celem transdukcji sygnału IL-6 [146, 150]. Badania własne wykazały znacznie zwiększoną ekspresję IL-6 i IL-6R w mięśniakach macicy, którą dodatkowo stymulowało leczenie progesteronem. Obniżenie ekspresji IL-6 przez octan uliprystalu podkreśliło udział tej interleukiny w biologii mięśniaków macicy. Dotychczas wykazano, że wyciszenie SMAD3 osłabia indukowaną przez IL-6 syntezę kolagenu w fibroblastach skóry [146]. Zatem wykazane w badaniach własnych

hamowanie uwalniania IL-6 po zablokowaniu SMAD3 może sugerować kanoniczną regulację szlaku sygnałowego TGF- β i jego aktywności w mięśniakach macicy.

Ze względu na nadmierną produkcję i akumulację macierzy zewnątrzkomórkowej uważa się, że mięśniaki macicy mają słabe unaczynienie [151]. Jednak kilka badań wykazało wysoką ekspresję VEGF w mięśniakach macicy, co sugeruje ważną rolę lokalnej angiogenezy w ich rozwoju i wzroście [152]. Wykazano, że aktywacja kanonicznego szlaku TGF- β odgrywa kluczową rolę w regulacji uwalniania VEGF [153, 154]. W badaniach własnych stwierdzono, że octan uliprystalu obniżał wysoką ekspresję VEGF i jego wydzielanie w mięśniakach macicy. Nie zaobserwowano, aby progesteron stymulował produkcję VEGF w mięśniakach macicy. Jednakże, gdy w badaniach własnych blokowano SMAD3 w obecności progesteronu, wówczas obserwowano znaczne zmniejszenie wydzielania VEGF, co sugeruje, że progesteron może podtrzymywać aktywację VEGF poprzez szlak TGF- β /SMAD3. W raku płaskonabłonkowym jamy ustnej wykazano, że TGF- β 1 stymuluje komórki nowotworowe do wydzielania większej ilości VEGF poprzez szlak sygnałowy TGF- β RII/SMAD3 [155]. Podwyższone ekspresje zarówno TGF- β , jak i SMAD3 prowadzą do wydzielania VEGFA z komórek mięśni gładkich, który działa jako autokryny inhibitor apoptozy komórek [156]. Badania własne sugerują zatem istotne znaczenie kanonicznego szlaku TGF- β w produkcji VEGF w mięśniakach macicy. Wykazano również, że VEGF stymuluje angiogenezę w sposób zależny od GTPazy Rho w komórkach śródbłonna. Oś VEGFA/VEGFR2 stymuluje aktywację RhoA, Cdc42 i Rac1, prowadząc do rozwoju naczyń [157-159]. Wyniki badań własnych wykazały, że VEGF zwiększa ekspresję RhoA w eksplantach mięśniaków macicy, a efekt ten jest hamowany przez octan uliprystalu. Powyższe wyniki sugerują, że mięśniaki macicy uwalniają VEGF w celu stymulacji angiogenezy wewnątrz guza, która jest wzmacniana przez sygnalizację progesteronem poprzez sygnalizację SMAD3. Szlak RhoA jest najprawdopodobniej zaangażowany nie tylko w reorganizację macierzy zewnątrzkomórkowej, ale także w regulację procesów angiogenezy wewnątrz mięśniaka macicy. Poznanie mechanizmów regulujących syntezę i akumulację macierzy zewnątrzkomórkowej ma zatem kluczowe znaczenie dla rozwoju dalszych nowatorskich strategii terapeutycznych w farmakologicznym leczeniu mięśniaków macicy.

Należy rozważyć nowe strategie leczenia mięśniaków macicy celowane w szlaki sygnalizacyjne silnie zaangażowane we wzrost i rozwój tych guzów. Inhibitory ścieżki RhOA/ROCK są obecnie badane w kierunku hamowania progresji idiopatycznego włóknienia płuc. Celowanie w ścieżkę RhOA/ROCK nawet przy stosunkowo słabych inhibitorach jest skuteczne nie tylko w zapobieganiu włóknieniu, ale także w odwracaniu już obecnego zwłóknienia [160]. Możliwe jest użycie nieselektywnych inhibitorów ROCK, jak i selektywnych względem izoform ROCK1 i ROCK2, stąd też konieczne są dalsze badania celem lepszego poznania roli tej ścieżki w biologii mięśniaków macicy. Dotychczasowe badania wykazały, że leczenie chorób u podłoża których leży włóknienie ukierunkowane na hamowanie RhOA/ROCK jest dobrze tolerowane i ma ogromny potencjał, aby stać się w przyszłości potężnym narzędziem terapeutycznym [160]. Dostępne są również inhibitory IL-6, które są obecnie z powodzeniem wykorzystywane w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów [161]. Trwają również badania nad wykorzystaniem nowych inhibitorów szlaku IL-6/JAK/STAT3 w zahamowaniu procesu włóknienia m.in. w chorobach płuc czy nerek, a badania kliniczne wczesnej fazy są obecnie w toku [161]. Leczenie łączące działanie nowych selektywnych modulatorów receptora progesteronowego oraz dodatkowe wzmocnienie hamowania szlaku sygnalizacyjnego IL-6 może być obiecującą strategią terapeutyczną w leczeniu mięśniaków macicy. Istnieją również terapie wykorzystujące inhibitory VEGF w leczeniu nowotworów. Rola VEGF w licznych fizjologicznych procesach i jego potencjalne efekty plejotropowe powodują, że działania niepożądane mogą być bardziej nasilone niż korzyści wynikające z leczenia [162]. Dlatego wykorzystanie inhibitorów VEGF w leczeniu mięśniaków macicy może być ograniczone. Należałoby rozważyć leczenie miejscowe tak jak na przykład w zwyrodnienia plamki żółtej oka [163].

Podsumowując, powyższe badania własne dostarczyły nowych dowodów na funkcjonalne znaczenie w mięśniakach dwóch różnych mechanizmów działania progesteronu (**Rycina 28**), aktywację szlaku sygnałowego TGF- β /SMAD3 i stymulację proliferacji, wzrostu i przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej. Octan uliprystalu wykazał przeciwstawne działanie na proliferację i wzrost mięśniaków macicy oraz akumulację macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez szlak sygnałowy TGF- β /SMAD3 i hamujące działanie poprzez SMAD3, TGF- β RI/II, RhoA, VEGF. Długotrwałe blokowanie szlaków sygnałowych TGF- β może prowadzić do toksycznego

uszkodzenia narządów ze względu na jego działanie plejotropowe. Potencjalne nowe strategie terapeutyczne łączące nowe selektywne modulatory receptora progesteronowego

z bezpośrednim bądź pośrednim celowanym wpływem na macierz zewnątrzkomórkową mogą być skuteczniejszą, korzystniejszą i bezpieczniejszą strategią leczenia mięśniaków macicy. Taka terapia miałaby na celu zahamowania ich wzrostu i proliferacji, a także zablokowania syntezy i akumulacji macierzy zewnątrzkomórkowej.

6. WNIOSKI

1. Octan uliprystalu może hamować transkrypcyjne działanie PGRB poprzez efekt antagonistyczny, natomiast octan uliprystalu może aktywować hamujące działanie PGRA jako jego agonisty, powodując podwójne hamowanie aktywności PGR w mięśniakach macicy.
2. Octan uliprystalu działa antagonistycznie w stosunku do progesteronu, hamuje szlak sygnałowy TGF- β poprzez obniżanie ekspresji genów tego szlaku oraz hamowanie fosforylacji białka SMAD3 i jego translokacji do jądra komórkowego.
3. Receptory TGF- β są kluczowe dla działania progesteronu i octanu uliprystalu, ponieważ ich hamowanie wzmacnia działanie octanu uliprystalu i znosi efekt działania progesteronu, co znacznie zmniejsza żywotność pierwotnych komórek mięśniaków macicy.
4. Zablokowanie translokacji jądrowej SMAD3 przez octan uliprystalu dowiodło, że może wpływać na szlaki związane ze zwłóknieniem w mięśniakach macicy poprzez zakłócenia transdukcji sygnału SMAD.
5. Działanie profibrotyczne progesteronu jest zależne od sygnalizacji SMAD3.
6. Leczenie octanem uliprystalu może wpływać na kluczowe szlaki regulujące czynniki profibrotyczne, co jest związane z nieprawidłowym odkładaniem się macierzy zewnątrzkomórkowej w mięśniakach macicy.
7. Produkcja oraz działanie RhoA, IL-6 oraz VEGF w mięśniakach macicy może być również regulowane przez kanoniczną sygnalizację SMAD.
8. Progesteron może podtrzymywać aktywację i uwalnianie VEGF poprzez szlak TGF- β -SMAD3.
9. Nowe strategie terapeutyczne powinny łączyć nowe selektywne modulatory receptora progesteronowego z bezpośrednim bądź pośrednim celowaniem w macierz zewnątrzkomórkową co może być skuteczniejszą, korzystniejszą i bezpieczniejszą strategią leczenia mięśniaków macicy.

7. WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Typy mięśniaków macicy. Utworzono za pomocą BioRender.com.....	18
Rycina 2. Czynniki chroniące i czynniki ryzyka mięśniaków macicy. Utworzono za pomocą BioRender.com.....	19
Rycina 3. Schemat sygnalizacji TGF- β przez SMAD2/3. Utworzono za pomocą BioRender.com.....	25
Rycina 4. Działanie progesteronu w komórce. Utworzono za pomocą BioRender.com.....	31
Rycina 5. Działanie octanu uliprystalu w komórce. Utworzono za pomocą BioRender.com.....	33
Rycina 6. Wpływ progesteronu i octanu uliprystalu na żywotność komórek pierwotnej linii komórkowej mięśniaków macicy po 72-godzinnej stymulacji.....	47
Rycina 7. Charakterystyka ekspresji receptorów progesteronowych w eksplantach mięśniaków macicy.....	49
Rycina 8. Charakterystyka profilu ekspresji receptorów progesteronowych w mięśniakach macicy po leczeniu octanem uliprystalu i progesteronem.....	51
Rycina 9. Lokalizacja receptorów progesteronowych mPR α , mPR β i PGRMC1 w mięśniakach macicy leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu.....	54
Rycina 10. Lokalizacja receptorów progesteronowych PGR, mPR γ i PGRMC2 w mięśniakach macicy leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu.....	55

Rycina 11. Charakterystyka profilu ekspresji szlaku sygnałowego TGF- β w tkankach prawidłowej mięśniówki macicy i tkankach mięśniaków macicy przed i po leczeniu octanem uliprystalu.....	56
Rycina 12. Wpływ octanu uliprystalu i progesteronu oraz inhibitorów szlaku sygnalizacyjnego TGF- β na żywotność komórek mięśniaków macicy.....	58
Rycina 13. Wpływ octanu uliprystalu na SMAD3 w mięśniakach macicy.....	60
Rycina 14. Wpływ octanu uliprystalu na translokację jądrową SMAD3 w mięśniakach macicy.....	61
Rycina 15. Charakterystyka czynników rodziny VEGF.....	62
Rycina 16. Wpływ VEGF na żywotność komórek mięśniaków macicy.....	64
Rycina 17. Lokalizacja VEGF w mięśniakach leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu.....	65
Rycina 18. Wpływ progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 na wydzielania VEGF w mięśniakach macicy.....	66
Rycina 19. Charakterystyka czynników rodziny IL-6.....	67
Rycina 20. Wpływ IL-6 na żywotność komórek mięśniaków macicy.....	68
Rycina 21. Lokalizacja IL-6 w mięśniakach leczonych i nieleczonych octanem uliprystalu.....	69
Rycina 22. Wpływ progesteronu, octanu uliprystalu i inhibitora SMAD3 na wydzielania IL-6 w mięśniakach macicy.....	70
Rycina 23. Lokalizacja RhOA w mięśniakach macicy.....	71

Rycina 24. Ekspresja RhOA w mięśniakach macicy.....	72
Rycina 25. Ekspresja RhOA po leczeniu progesteronem, octanem uliprystalu w obecności lub bez iSMAD3 lub VEGF.....	73
Rycina 26. Ekspresja Rnd3 w tkankach mięśniaków macicy.....	75
Rycina 27. Ekspresja różnych typów interleukin i czynników wzrostu w tkankach prawidłowej mięśniówki macicy oraz mięśniaków macicy.....	76
Rycina 28. Przegląd działania progesteronu i octanu uliprystalu poprzez genomową i niegenomową sygnalizację w komórkach mięśniaków macicy.....	80

8. WYKAZ TABEL

Tabela I. Cechy ultrastrukturalne mięśniaka macicy w porównaniu do prawidłowej mięśniówki macicy.....	21
Tabela II. Szczegółowe dane dotyczące warunków przeprowadzonych stymulacji...41	
Tabela III. Sekwencja starterów użytych w reakcji q-PCR.....	43

9. WYKAZ PIŚMIENNICTWA

1. Stewart, E.A., et al., *Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review*. Bjog, 2017. **124**(10): p. 1501-1512.
2. Walker, C.L. and E.A. Stewart, *Uterine fibroids: the elephant in the room*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1589-92.
3. Stewart, E.A., et al., *Uterine fibroids*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16043.
4. Marshall, L.M., et al., *Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race*. Obstet Gynecol, 1997. **90**(6): p. 967-73.
5. Mendelson, E.B., et al., *Gynecologic imaging: comparison of transabdominal and transvaginal sonography*. Radiology, 1988. **166**(2): p. 321-4.
6. Nelson, A.L. and J.J. Ritchie, *Severe anemia from heavy menstrual bleeding requires heightened attention*. Am J Obstet Gynecol, 2015. **213**(1): p. 97 e1-97 e6.
7. Worldwide, A.A.M.I.G., et al., *AAGL Practice Report: Practice Guidelines for the Management of Hysteroscopic Distending Media: (Replaces Hysteroscopic Fluid Monitoring Guidelines. J Am Assoc Gynecol Laparosc. 2000;7:167-168.)*. J Minim Invasive Gynecol, 2013. **20**(2): p. 137-48.
8. Bulun, S.E., *Uterine fibroids*. N Engl J Med, 2013. **369**(14): p. 1344-55.
9. Levens, E.D., et al., *Magnetic resonance imaging and transvaginal ultrasound for determining fibroid burden: implications for research and clinical care*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **200**(5): p. 537 e1-7.
10. Donnez, J. and M.M. Dolmans, *Uterine fibroid management: from the present to the future*. Hum Reprod Update, 2016. **22**(6): p. 665-686.
11. Drayer, S.M. and W.H. Catherino, *Prevalence, morbidity, and current medical management of uterine leiomyomas*. Int J Gynaecol Obstet, 2015. **131**(2): p. 117-22.
12. Gupta, S., J. Jose, and I. Manyonda, *Clinical presentation of fibroids*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2008. **22**(4): p. 615-26.
13. Spies, J.B., et al., *The UFS-QOL, a new disease-specific symptom and health-related quality of life questionnaire for leiomyomata*. Obstet Gynecol, 2002. **99**(2): p. 290-300.
14. Sunkara, S.K., et al., *The effect of intramural fibroids without uterine cavity involvement on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod, 2010. **25**(2): p. 418-29.
15. Yan, L., et al., *Effect of fibroids not distorting the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization treatment: a retrospective cohort study*. Fertil Steril, 2014. **101**(3): p. 716-21.
16. Somigliana, E., et al., *Fibroids and female reproduction: a critical analysis of the evidence*. Hum Reprod Update, 2007. **13**(5): p. 465-76.
17. Donnez, J. and P. Jadoul, *What are the implications of myomas on fertility? A need for a debate?* Hum Reprod, 2002. **17**(6): p. 1424-30.
18. Sinclair, D.C., A. Mastroyannis, and H.S. Taylor, *Leiomyoma simultaneously impair endometrial BMP-2-mediated decidualization and anticoagulant expression through secretion of TGF-beta3*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(2): p. 412-21.
19. Galliano, D., et al., *ART and uterine pathology: how relevant is the maternal side for implantation?* Hum Reprod Update, 2015. **21**(1): p. 13-38.
20. Stout, M.J., et al., *Leiomyomas at routine second-trimester ultrasound examination and adverse obstetric outcomes*. Obstet Gynecol, 2010. **116**(5): p. 1056-63.
21. Klatsky, P.C., et al., *Fibroids and reproductive outcomes: a systematic literature review from conception to delivery*. Am J Obstet Gynecol, 2008. **198**(4): p. 357-66.

22. Zimmermann, A., et al., *Prevalence, symptoms and management of uterine fibroids: an international internet-based survey of 21,746 women*. BMC Womens Health, 2012. **12**: p. 6.
23. Templeman, C., et al., *Risk factors for surgically removed fibroids in a large cohort of teachers*. Fertil Steril, 2009. **92**(4): p. 1436-1446.
24. Wise, L.A., et al., *Age-specific incidence rates for self-reported uterine leiomyomata in the Black Women's Health Study*. Obstet Gynecol, 2005. **105**(3): p. 563-8.
25. Wise, L.A., et al., *Reproductive factors, hormonal contraception, and risk of uterine leiomyomata in African-American women: a prospective study*. Am J Epidemiol, 2004. **159**(2): p. 113-23.
26. Baird, D.D., et al., *High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **188**(1): p. 100-7.
27. Selo-Ojeme, D., et al., *The incidence of uterine leiomyoma and other pelvic ultrasonographic findings in 2,034 consecutive women in a north London hospital*. J Obstet Gynaecol, 2008. **28**(4): p. 421-3.
28. Bassaw, K. and K. Gangar, *Protective effect of depot-medroxyprogesterone acetate on surgically treated uterine leiomyomas: a multicentre case-control study*. Br J Obstet Gynaecol, 1997. **104**(6): p. 758-9.
29. Chiaffarino, F., et al., *Use of oral contraceptives and uterine fibroids: results from a case-control study*. Br J Obstet Gynaecol, 1999. **106**(8): p. 857-60.
30. Shen, Y., et al., *Environmental exposure and risk of uterine leiomyoma: an epidemiologic survey*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17**(23): p. 3249-56.
31. Lumbiganon, P., et al., *Protective effect of depot-medroxyprogesterone acetate on surgically treated uterine leiomyomas: a multicentre case--control study*. Br J Obstet Gynaecol, 1996. **103**(9): p. 909-14.
32. Samadi, A.R., et al., *Risk factors for self-reported uterine fibroids: a case-control study*. Am J Public Health, 1996. **86**(6): p. 858-62.
33. Downes, E., et al., *The burden of uterine fibroids in five European countries*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2010. **152**(1): p. 96-102.
34. Stewart, E.A., et al., *Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(3): p. 900-6.
35. Arici, A. and I. Sozen, *Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation*. Fertil Steril, 2000. **73**(5): p. 1006-11.
36. Norian, J.M., et al., *Transforming growth factor beta3 regulates the versican variants in the extracellular matrix-rich uterine leiomyomas*. Reprod Sci, 2009. **16**(12): p. 1153-64.
37. Malik, M., J. Segars, and W.H. Catherino, *Integrin beta1 regulates leiomyoma cytoskeletal integrity and growth*. Matrix Biol, 2012. **31**(7-8): p. 389-97.
38. Aleksandrovych, V., et al., *Uterine fibroid: common features of widespread tumor (Review article)*. Folia Med Cracov, 2015. **55**(1): p. 61-75.
39. Ferenczy, A., R.M. Richart, and T. Okagaki, *A comparative ultrastructural study of leiomyosarcoma, cellular leiomyoma, and leiomyoma of the uterus*. Cancer, 1971. **28**(4): p. 1004-18.
40. Wortham, N.C., et al., *Aberrant expression of apoptosis proteins and ultrastructural aberrations in uterine leiomyomas from patients with hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma*. Fertil Steril, 2006. **86**(4): p. 961-71.

41. Sivakumar, P., et al., *New insights into extracellular matrix assembly and reorganization from dynamic imaging of extracellular matrix proteins in living osteoblasts*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 7): p. 1350-60.
42. Richards, P.A., P.D. Richards, and A.J. Tiltman, *The ultrastructure of fibromyomatous myometrium and its relationship to infertility*. Hum Reprod Update, 1998. **4**(5): p. 520-5.
43. Leppert, P.C., et al., *Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium*. Fertil Steril, 2004. **82 Suppl 3**(0 3): p. 1182-7.
44. Jones, J.L. and R.A. Walker, *Integrins: a role as cell signalling molecules*. Mol Pathol, 1999. **52**(4): p. 208-13.
45. Pickering, J.G., *Regulation of vascular cell behavior by collagen : form is function*. Circ Res, 2001. **88**(5): p. 458-9.
46. Malik, M., et al., *Why leiomyomas are called fibroids: the central role of extracellular matrix in symptomatic women*. Semin Reprod Med, 2010. **28**(3): p. 169-79.
47. Pankov, R. and K.M. Yamada, *Fibronectin at a glance*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 20): p. 3861-3.
48. Kleinman, H.K., et al., *Biological activities of laminin*. J Cell Biochem, 1985. **27**(4): p. 317-25.
49. Gallagher, W.M., C.A. Currid, and L.C. Whelan, *Fibulins and cancer: friend or foe?* Trends Mol Med, 2005. **11**(7): p. 336-40.
50. Albig, A.R., J.R. Neil, and W.P. Schiemann, *Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2621-9.
51. Marsh, E.E., et al., *Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 expression and regulation in uterine leiomyoma*. Fertil Steril, 2016. **105**(4): p. 1070-5.
52. Berto, A.G., et al., *Galactosaminoglycans from normal myometrium and leiomyoma*. Braz J Med Biol Res, 2001. **34**(5): p. 633-7.
53. Mitropoulou, T.N., et al., *Identification, quantification and fine structural characterization of glycosaminoglycans from uterine leiomyoma and normal myometrium*. Biochimie, 2001. **83**(6): p. 529-36.
54. Wolanska, M., et al., *Extracellular matrix components in uterine leiomyoma and their alteration during the tumour growth*. Mol Cell Biochem, 1998. **189**(1-2): p. 145-52.
55. Levens, E., et al., *Fibromodulin is expressed in leiomyoma and myometrium and regulated by gonadotropin-releasing hormone analogue therapy and TGF-beta through Smad and MAPK-mediated signalling*. Mol Hum Reprod, 2005. **11**(7): p. 489-94.
56. Carrino, D.A., et al., *Proteoglycans of uterine fibroids and keloid scars: similarity in their proteoglycan composition*. Biochem J, 2012. **443**(2): p. 361-8.
57. Barker, N.M., et al., *Proteoglycans in Leiomyoma and Normal Myometrium: Abundance, Steroid Hormone Control, and Implications for Pathophysiology*. Reprod Sci, 2016. **23**(3): p. 302-9.
58. Droguett, R., et al., *Extracellular proteoglycans modify TGF-beta bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation*. Matrix Biol, 2006. **25**(6): p. 332-41.
59. Prud'homme, G.J., *Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations*. Lab Invest, 2007. **87**(11): p. 1077-91.
60. Ren, L.L., et al., *Transforming growth factor-beta signaling: From tissue fibrosis to therapeutic opportunities*. Chem Biol Interact, 2023. **369**: p. 110289.

61. Miyazono, K., P. ten Dijke, and C.H. Heldin, *TGF-beta signaling by Smad proteins*. Adv Immunol, 2000. **75**: p. 115-57.
62. Lee, B.S. and R.A. Nowak, *Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor-beta 3 (TGF beta 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF beta*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 913-20.
63. Joseph, D.S., et al., *Myometrial cells undergo fibrotic transformation under the influence of transforming growth factor beta-3*. Fertil Steril, 2010. **93**(5): p. 1500-8.
64. Leppert, P.C., W.H. Catherino, and J.H. Segars, *A new hypothesis about the origin of uterine fibroids based on gene expression profiling with microarrays*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **195**(2): p. 415-20.
65. Sozen, I. and A. Arici, *Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata*. Fertil Steril, 2002. **78**(1): p. 1-12.
66. Bogusiewicz, M., et al., *Activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 and contents of their tissue inhibitors in uterine leiomyoma and corresponding myometrium*. Gynecol Endocrinol, 2007. **23**(9): p. 541-6.
67. Palmer, S.S., et al., *Increased expression of stromelysin 3 mRNA in leiomyomas (uterine fibroids) compared with myometrium*. J Soc Gynecol Investig, 1998. **5**(4): p. 203-9.
68. Wolanska, M., et al., *Matrix metalloproteinases of human leiomyoma in various stages of tumor growth*. Gynecol Obstet Invest, 2004. **58**(1): p. 14-8.
69. Dimitrova, I.K., et al., *Gene expression profiling of multiple leiomyomata uteri and matched normal tissue from a single patient*. Fertil Steril, 2009. **91**(6): p. 2650-63.
70. Tsigkou, A., et al., *Expression Levels of Myostatin and Matrix Metalloproteinase 14 mRNAs in Uterine Leiomyoma are Correlated With Dysmenorrhea*. Reprod Sci, 2015. **22**(12): p. 1597-602.
71. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
72. Giannandrea, M. and W.C. Parks, *Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis*. Dis Model Mech, 2014. **7**(2): p. 193-203.
73. Bergers, G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 737-44.
74. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease*. Nature, 1992. **359**(6397): p. 693-9.
75. Qiang, W., et al., *Down-regulation of miR-29b is essential for pathogenesis of uterine leiomyoma*. Endocrinology, 2014. **155**(3): p. 663-9.
76. Wang, Y., et al., *Differential effects of tumor necrosis factor-alpha on matrix metalloproteinase-2 expression in human myometrial and uterine leiomyoma smooth muscle cells*. Hum Reprod, 2015. **30**(1): p. 61-70.
77. Wegienka, G., *Are uterine leiomyoma a consequence of a chronically inflammatory immune system?* Med Hypotheses, 2012. **79**(2): p. 226-31.
78. Protic, O., et al., *Possible involvement of inflammatory/reparative processes in the development of uterine fibroids*. Cell Tissue Res, 2016. **364**(2): p. 415-27.
79. Santulli, P., et al., *Increased serum oxidative stress markers in women with uterine leiomyoma*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72069.
80. Wynn, T.A., *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 524-9.

81. Marshall, L.M., et al., *A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata*. Fertil Steril, 1998. **70**(3): p. 432-9.
82. Borahay, M.A., et al., *Estrogen Receptors and Signaling in Fibroids: Role in Pathobiology and Therapeutic Implications*. Reprod Sci, 2017. **24**(9): p. 1235-1244.
83. Kim, J.J. and E.C. Sefton, *The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **358**(2): p. 223-31.
84. Moravek, M.B., et al., *Ovarian steroids, stem cells and uterine leiomyoma: therapeutic implications*. Hum Reprod Update, 2015. **21**(1): p. 1-12.
85. Reis, F.M., E. Bloise, and T.M. Ortega-Carvalho, *Hormones and pathogenesis of uterine fibroids*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2016. **34**: p. 13-24.
86. Rosati, P., C. Exacoustos, and S. Mancuso, *Longitudinal evaluation of uterine myoma growth during pregnancy. A sonographic study*. J Ultrasound Med, 1992. **11**(10): p. 511-5.
87. Kawaguchi, K., et al., *Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle*. Am J Obstet Gynecol, 1989. **160**(3): p. 637-41.
88. Nisolle, M., et al., *Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy*. Hum Reprod, 1999. **14**(11): p. 2844-50.
89. Maruo, T., et al., *Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis*. Steroids, 2000. **65**(10-11): p. 585-92.
90. Chegini, N., et al., *Effects of GnRH analogues, 'add-back' steroid therapy, antiestrogen and antiprogestins on leiomyoma and myometrial smooth muscle cell growth and transforming growth factor-beta expression*. Mol Hum Reprod, 2002. **8**(12): p. 1071-8.
91. Yamaguchi, Y., D.M. Mann, and E. Ruoslahti, *Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 281-4.
92. Hoekstra, A.V., et al., *Progestins activate the AKT pathway in leiomyoma cells and promote survival*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(5): p. 1768-74.
93. Kovacs, K.A., et al., *Phosphorylation of PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) protein is enhanced in human fibromyomatous uteri*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **103**(2): p. 196-9.
94. Islam, M.S., et al., *Uterine leiomyoma: available medical treatments and new possible therapeutic options*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(3): p. 921-34.
95. Leonhardt, S.A., V. Boonyaratanakornkit, and D.P. Edwards, *Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms*. Steroids, 2003. **68**(10-13): p. 761-70.
96. Boonyaratanakornkit, V. and D.P. Edwards, *Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids*. Semin Reprod Med, 2007. **25**(3): p. 139-53.
97. Boonyaratanakornkit, V., et al., *Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases*. Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 269-80.
98. Tsigkou, A., et al., *Increased progesterone receptor expression in uterine leiomyoma: correlation with age, number of leiomyomas, and clinical symptoms*. Fertil Steril, 2015. **104**(1): p. 170-5 e1.
99. Englund, K., et al., *Sex steroid receptors in human myometrium and fibroids: changes during the menstrual cycle and gonadotropin-releasing hormone treatment*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(11): p. 4092-6.

100. Islam, M.S., et al., *Selective Progesterone Receptor Modulators-Mechanisms and Therapeutic Utility*. *Endocr Rev*, 2020. **41**(5).
101. Wen, D.X., et al., *The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(12): p. 8356-64.
102. Krietsch, T., et al., *Human homologs of the putative G protein-coupled membrane progestin receptors (mPR α , β , and γ) localize to the endoplasmic reticulum and are not activated by progesterone*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(12): p. 3146-64.
103. Valadez-Cosmes, P., et al., *Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer*. *Mol Cell Endocrinol*, 2016. **434**: p. 166-75.
104. Bouchard, P., N. Chabbert-Buffet, and B.C. Fauser, *Selective progesterone receptor modulators in reproductive medicine: pharmacology, clinical efficacy and safety*. *Fertil Steril*, 2011. **96**(5): p. 1175-89.
105. Bestel, E. and J. Donnez, *The potential of selective progesterone receptor modulators for the treatment of uterine fibroids*. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2014. **9**(1): p. 79-92.
106. Chabbert-Buffet, N., et al., *Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications*. *Hum Reprod Update*, 2005. **11**(3): p. 293-307.
107. Donnez, J., et al., *Ulipristal acetate versus placebo for fibroid treatment before surgery*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(5): p. 409-20.
108. Donnez, J., et al., *Ulipristal acetate versus leuprolide acetate for uterine fibroids*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(5): p. 421-32.
109. Talaulikar, V.S. and I.T. Manyonda, *Ulipristal acetate: a novel option for the medical management of symptomatic uterine fibroids*. *Adv Ther*, 2012. **29**(8): p. 655-63.
110. Spitz, I.M., *Clinical utility of progesterone receptor modulators and their effect on the endometrium*. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2009. **21**(4): p. 318-24.
111. Xu, Q., et al., *Progesterone receptor modulator CDB-2914 induces extracellular matrix metalloproteinase inducer in cultured human uterine leiomyoma cells*. *Mol Hum Reprod*, 2008. **14**(3): p. 181-91.
112. Lumsden, M.A., et al., *Fibroids: diagnosis and management*. *BMJ*, 2015. **351**: p. h4887.
113. Stewart, E.A., *Clinical practice. Uterine fibroids*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(17): p. 1646-55.
114. Zupi, E., et al., *Nonsurgical Alternatives for Uterine Fibroids*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016. **34**: p. 122-31.
115. Flynn, M., et al., *Health care resource use for uterine fibroid tumors in the United States*. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **195**(4): p. 955-64.
116. Donnez, J., et al., *Long-term treatment of uterine fibroids with ulipristal acetate* ☆. *Fertil Steril*, 2014. **101**(6): p. 1565-73 e1-18.
117. Donnez, J., O. Donnez, and M.M. Dolmans, *With the advent of selective progesterone receptor modulators, what is the place of myoma surgery in current practice?* *Fertil Steril*, 2014. **102**(3): p. 640-8.
118. Donnez, J., et al., *Treatment of uterine fibroids with implants of gonadotropin-releasing hormone agonist: assessment by hystero-graphy*. *Fertil Steril*, 1989. **51**(6): p. 947-50.
119. Lethaby, A., B. Vollenhoven, and M. Sowter, *Pre-operative GnRH analogue therapy before hysterectomy or myomectomy for uterine fibroids*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2001(2): p. CD000547.

120. Gutmann, J.N. and S.L. Corson, *GnRH agonist therapy before myomectomy or hysterectomy*. J Minim Invasive Gynecol, 2005. **12**(6): p. 529-37; quiz 528, 538-9.
121. Metwally, M., C.M. Farquhar, and T.C. Li, *Is another meta-analysis on the effects of intramural fibroids on reproductive outcomes needed?* Reprod Biomed Online, 2011. **23**(1): p. 2-14.
122. Pritts, E.A., W.H. Parker, and D.L. Olive, *Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence*. Fertil Steril, 2009. **91**(4): p. 1215-23.
123. Yoon, E.L. and J.S. Yuk, *Use of ulipristal acetate and risk of liver disease: a nationwide cohort study*. J Clin Endocrinol Metab, 2021.
124. Mozzanega, B., *Ulipristal acetate and liver-injuries: while Esmya is revoked, EllaOne is allowed in repeated self-administrations possibly exceeding UPA toxic-dosing with Esmya*. J Hepatol, 2021. **74**(3): p. 750-751.
125. Carballo-Folgoso, L., C. Alvarez-Navascues, and M. Rodriguez, *Acute Liver Failure Associated With Ulipristal Acetate: A Case Report*. Am J Gastroenterol, 2020. **115**(9): p. 1542-1544.
126. Kriplani, A., et al., *Efficacy of the levonorgestrel-releasing intrauterine system in uterine leiomyoma*. Int J Gynaecol Obstet, 2012. **116**(1): p. 35-8.
127. Szydłowska, I., et al., *Markers of Cellular Proliferation, Apoptosis, Estrogen/Progesterone Receptor Expression and Fibrosis in Selective Progesterone Receptor Modulator (Ulipristal Acetate)-Treated Uterine Fibroids*. J Clin Med, 2021. **10**(4).
128. Horwitz, K.B. and P.S. Alexander, *In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation*. Endocrinology, 1983. **113**(6): p. 2195-201.
129. Demura, T.A., et al., *[The molecular mechanisms and morphological manifestations of leiomyoma reduction induced by selective progesterone receptor modulators]*. Arkh Patol, 2017. **79**(3): p. 19-26.
130. Agency, E.M., *CHMP ASSESSMENT REPORT FOR Ellaone Procedure No. EMEA/H/C/001027*, in *Evaluation of Medicines for Human Use*. 2009. p. 9/49.
131. Kastner, P., et al., *Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B*. EMBO J, 1990. **9**(5): p. 1603-14.
132. Islam, M.S., et al., *Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: a potential target for future therapeutics*. Hum Reprod Update, 2018. **24**(1): p. 59-85.
133. Ciebiera, M., et al., *Ulipristal acetate decreases transforming growth factor beta3 serum and tumor tissue concentrations in patients with uterine fibroids*. Fertil Steril, 2018. **109**(3): p. 501-507 e2.
134. Lewis, T.D., et al., *Ulipristal acetate decreases active TGF-beta3 and its canonical signaling in uterine leiomyoma via two novel mechanisms*. Fertil Steril, 2019. **111**(4): p. 806-815.e1.
135. Zhang, Y.E., *Non-Smad pathways in TGF-beta signaling*. Cell Res, 2009. **19**(1): p. 128-39.
136. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
137. Moustakas, A. and C.H. Heldin, *Non-Smad TGF-beta signals*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 16): p. 3573-84.
138. Amano, M., M. Nakayama, and K. Kaibuchi, *Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. **67**(9): p. 545-54.

139. Clements, R.T., et al., *RhoA and Rho-kinase dependent and independent signals mediate TGF-beta-induced pulmonary endothelial cytoskeletal reorganization and permeability*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(2): p. L294-306.
140. Norian, J.M., et al., *Characterization of tissue biomechanics and mechanical signaling in uterine leiomyoma*. Matrix Biol, 2012. **31**(1): p. 57-65.
141. Ignatz, R.A., T. Endo, and J. Massague, *Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta*. J Biol Chem, 1987. **262**(14): p. 6443-6.
142. Furukawa, F., et al., *p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts*. Hepatology, 2003. **38**(4): p. 879-89.
143. Cao, Q., K.M. Mak, and C.S. Lieber, *DLPC decreases TGF-beta1-induced collagen mRNA by inhibiting p38 MAPK in hepatic stellate cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(5): p. G1051-61.
144. Wang, Z., et al., *Inhibition of Smad3 expression decreases collagen synthesis in keloid disease fibroblasts*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2007. **60**(11): p. 1193-9.
145. Islam, M.S., et al., *Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma*. Fertil Steril, 2013. **100**(1): p. 178-93.
146. O'Reilly, S., et al., *Interleukin-6 (IL-6) trans signaling drives a STAT3-dependent pathway that leads to hyperactive transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling promoting SMAD3 activation and fibrosis via Gremlin protein*. J Biol Chem, 2014. **289**(14): p. 9952-60.
147. Dufour, A.M., et al., *Interleukin-6 and Type-I Collagen Production by Systemic Sclerosis Fibroblasts Are Differentially Regulated by Interleukin-17A in the Presence of Transforming Growth Factor-Beta 1*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1865.
148. Fielding, C.A., et al., *Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 40-50.
149. Gauldie, J., et al., *TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 4): p. 661-4.
150. Milara, J., et al., *JAK2 mediates lung fibrosis, pulmonary vascular remodelling and hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis: an experimental study*. Thorax, 2018. **73**(6): p. 519-529.
151. Farrer-Brown, G., J.O. Beilby, and M.H. Tarbit, *The vascular patterns in myomatous uteri*. J Obstet Gynaecol Br Commonw, 1970. **77**(11): p. 967-75.
152. Gentry, C.C., et al., *Quantification of vascular endothelial growth factor-A in leiomyomas and adjacent myometrium*. Clin Sci (Lond), 2001. **101**(6): p. 691-5.
153. Noma, K., et al., *The essential role of fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis*. Gastroenterology, 2008. **134**(7): p. 1981-93.
154. Seystahl, K., et al., *Differential regulation of TGF-beta-induced, ALK-5-mediated VEGF release by SMAD2/3 versus SMAD1/5/8 signaling in glioblastoma*. Neuro Oncol, 2015. **17**(2): p. 254-65.
155. Sun, H., et al., *TGF-beta1/TbetaRII/Smad3 signaling pathway promotes VEGF expression in oral squamous cell carcinoma tumor-associated macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **497**(2): p. 583-590.
156. Shi, X., et al., *TGF-beta/Smad3 inhibit vascular smooth muscle cell apoptosis through an autocrine signaling mechanism involving VEGF-A*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1317.
157. El Baba, N., et al., *The Role of Rho GTPases in VEGF Signaling in Cancer Cells*. Anal Cell Pathol (Amst), 2020. **2020**: p. 2097214.

158. Zahra, F.T., et al., *Endothelial RhoA GTPase is essential for in vitro endothelial functions but dispensable for physiological in vivo angiogenesis*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 11666.
159. Shimizu, A., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor-A Exerts Diverse Cellular Effects via Small G Proteins, Rho and Rap*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(4).
160. Knipe, R.S., A.M. Tager, and J.K. Liao, *The Rho kinases: critical mediators of multiple profibrotic processes and rational targets for new therapies for pulmonary fibrosis*. *Pharmacol Rev*, 2015. **67**(1): p. 103-17.
161. Li, Y., et al., *The Role of IL-6 in Fibrotic Diseases: Molecular and Cellular Mechanisms*. *Int J Biol Sci*, 2022. **18**(14): p. 5405-5414.
162. Barratt, S.L., et al., *VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and Fibrotic Lung Disease*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(5).
163. Kaiser, S.M., S. Arepalli, and J.P. Ehlers, *Current and Future Anti-VEGF Agents for Neovascular Age-Related Macular Degeneration*. *J Exp Pharmacol*, 2021. **13**: p. 905-912.

10. ANEKS ZAWIERAJĄCY SKAN ZGODY KOMISJI BIOETYCZNEJ


KOMISJA BIOETYCZNA
UNIwersytetu Medycznego w Białymstoku
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. (085) 748 54 07, fax. (085) 748 55 08
prorektorki@umb.edu.pl

Białystok, 30-11-2017

Uchwała nr: R-I-002/482/2017

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Funkcjonalny wpływ jądrowych i błonowych receptorów progesteronowych na biologię mięśniaków macicy” przez dr hab. Nafisa Rahman.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej UMB


prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

11. ANEKS ZAWIERAJĄCY SKAN ZGODY KOMISJI BIOETYCZNEJ

KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 28.01.2021 r.

Uchwała nr: APK.002.4.2021

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Mechanizm molekularny działania progesteronu w mięśniakach macicy” przez lek. Gabrielę Sokółowską wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 28.01.2021 r. do 1.02.2024 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kował-Bielecka

Powinno:

1. *Odwwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:*

- 1) *wniósłodawca;*
 - 2) *kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;*
 - 3) *komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wielośrodkowym eksperymencie medycznym.*
2. *Odwwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.*