

Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel.: 22 629 52 82; 601 342 781
jacek.malejczyk@wum.edu.pl

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ LEK. GABRIELI MILEWSKIEJ PT. „MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA PROGESTERONU I SELEKTYWNEGO MODULATORA RECEPTORA PROGESTERONOWEGO W MIĘŚNIAKACH MACICY”

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu lek. med. Gabrieli Milewskiej została przygotowana w postaci 99 stronicowej monografii w języku polskim. Pracę wykonano w Klinice Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku kierowanej przez Prof. dr hab. Sławomira Wołczyńskiego. Promotorem rozprawy jest Prof. dr hab. Nafis Rahman. Tematyka pracy wpisuje się w profil badawczy Kliniki Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku zaś osoba promotora jest gwarancją badań na wysokim poziomie merytorycznym.

Mięśniaki macicy to bardzo istotne zagadnienie zarówno od strony klinicznej jak i badawczej. Wprawdzie posiadamy dużą wiedzę na temat etiopatogenezy i leczenia mięśniaków, jednak wiele aspektów choroby ciągle pozostaje niejasne. Wiadomo, że progesteron jest istotnym czynnikiem mającym wpływ na rozwój mięśniaków. Dowodzi tego między innymi fakt, że octan ulipristalu (ulipristal acetate, UA), selektywny modulator receptorów progesteronowych wywiera skuteczne działanie kliniczne w leczeniu choroby. Jak dotąd jednak mechanizmy działania UA w hamowaniu wzrostu mięśniaków nie zostały w pełni wyjaśnione. Mając to na uwadze oraz fakt, że mięśniaki macicy stanowią istotny problem kliniczny i społeczny uważam, że podjęcie przez Doktorantkę tej tematyki było ze wszelkich miar zasadne i godne zainteresowania.

Monografia lek. Gabrieli Milewskiej ma układ typowy dla tradycyjnych rozpraw doktorskich. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, listę skrótów, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metodykę badań, wyniki, dyskusję, wnioski, wykaz rycin i tabel oraz wykaz piśmiennictwa. Do monografii dołączone są w formie aneksów zgody lokalnej komisji bioetycznej.

Streszczenie w języku polskim i angielskim jest podzielone na sekcje i opisuje przesłanki podjęcia badań, cel pracy, materiały i metody, uzyskane wyniki i płynące z nich wnioski. Opis jest zwięzły i stanowi bardzo dobre kompendium rozprawy.

We wstępie Doktorantka bardzo obszernie przedstawia problematykę mięśniaków macicy poczynając od opisu obrazu i objawów klinicznych oraz epidemiologii. Następnie odnosi się do

najnowszej wiedzy dotyczącej budowy histologicznej z uwzględnieniem ultrastruktury i, co szczególnie istotne w kontekście całej rozprawy, budowy i organizacji macierzy pozakomórkowej. W tej części skupiła się na roli transformującego czynnika wzrostu β (TGF β), metaloproteinaz i ich inhibitorów oraz mechanizmów włóknienia w przebiegu wzrostu mięśniaków. Dalsza część wstępu poświęcona jest progesteronowi i jego receptorom w patogenezie mięśniaków oraz octanu uliprystalu i jego miejsca w leczeniu farmakologicznym tej choroby. Ostatnia część wstępu dotyczy aspektów leczenia mięśniaków, co istotne, ze szczególnym uwzględnieniem roli selektywnych modulatorów receptora progesteronowego.

Podane we wstępie informacje są oparte o najnowszą wiedzę. Całość jest przedstawiona w logiczny i czytelnie sposób oraz zilustrowana tabelą i pięcioma doskonałymi, kolorowymi rycinami. Wiedza zawarta we wstępie jest bardzo dobrym wprowadzeniem do tematyki badań i logicznie uzasadnia cel pracy oraz konieczność podjęcia badań.

Biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy oraz potrzebę jej pogłębiania Doktorantka sformułowała ogólne założenia i cel pracy, którym było scharakteryzowanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw działania progesteronu i selektywnego modulatora receptora progesteronowego octanu uliprystalu w mięśniakach macicy w porównaniu do mięśniaków nieleczonych octanu uliprystalu oraz do prawidłowej mięśniówki macicy. Aby zrealizować ten cel lek. Gabriela Milewska postanowiła:

1. Scharakteryzować profil ekspresji genów i białek progesteronowych receptorów jądrowych i błonowych w mięśniakach macicy.
2. Określić wpływ progesteronu i octanu uliprystalu na zmiany ekspresji genów/białek receptorów progesteronowych oraz żywotność komórek mięśniaków macicy.
3. Określić wpływ progesteronu i octanu uliprystalu na ścieżki sygnalizacyjne zaangażowane w syntezę i odkładanie się składników macierzy zewnątrzkomórkowej mięśniaków.
4. Ustalić mechanizmy wyjaśniające terapeutyczny wpływ octanu uliprystalu na kontrolę wzrostu mięśniaków macicy.

Wymienione wyżej cele szczegółowe stanowią logiczny ciąg zadań mający doprowadzić do realizacji głównego celu postawionego przez Doktorantkę.

Rozdział Materiały i metodyka badań zawiera bardzo szczegółowy opis pobieranego materiału klinicznego oraz kryteria włączenia i wyłączenia pacjentek oraz schemat terapii octanem uliprystalu. Wszystkie opisane badania uzyskały aprobatę komisji bioetycznej.

Doktorantka wymieniła również wszystkie czynniki użyte do stymulacji tkanek i komórek *in vitro*. Prawdopodobnie przez pomyłkę podrozdział, gdzie opisano w/w czynniki został zatytułowany „Leczenie” choć z leczeniem nie ma to nic wspólnego.

Dalej Doktorantka opisała obszernie metodykę pozyskiwania eksplantów badanych tkanek, ich hodowli i stymulacji wymienionymi wcześniej czynnikami. Na uwagę zasługuje również fakt, że pokusiła się również o wykonanie eksperymentów na izolowanych i hodowanych komórkach prawidłowej mięśniówki macicy i komórkach mięśniaków. Wszystkie opisy przeprowadzonych badań *in vitro* są poprawne i zawierają wszystkie konieczne informacje umożliwiające ocenę prawidłowości wykonanych eksperymentów. Opis stymulacji eksplantów i komórek został w sposób przejrzysty podsumowany w tabeli 2.

Żywotność komórek Doktorantka oceniała testem opartym na redukcji soli tetrazolowej (MTT). Pomimo powszechnego stosowania tego i podobnych mu testów uważam, że nie jest on właściwą metodą do oceny żywotności i proliferacji komórek. W rzeczywistości test ten mierzy potencjał oksydoredukcyjny komórek, który może być modyfikowany przez wiele różnych czynników i w rezultacie skutkować fałszywie dodatnimi wynikami. Ponieważ zastosowanie tego testu nie ma w mojej ocenie dużego wpływu na całokształt wyników i wyciągnięte z nich wnioski, moja uwaga ma raczej charakter porządkowy.

Ekspresję genów Doktorantka analizowała metodą ilościowej reakcji polimerazy (qRT-PCR). Z opisu wynika, że posługiwała się metodą SYBR-green, która nie jest uważana za najlepszą dostępną metodę do tego rodzaju badań. Opis metody jest nieco lakoniczny i byłoby lepiej, gdyby został przygotowany w bardziej szczegółowej formie. Lista zastosowanych starterów została przedstawiona w tabeli 3. W tym momencie ciekawi mnie, co zdecydowało o wyborze takiego a nie innego genu referencyjnego. Byłoby dobrze, gdyby taka decyzja była poparta stosowną pozycją piśmiennictwa. Doktorantka nie podała również jaką metodą była obliczana względna ekspresja mRNA i w jakich jednostkach jest przedstawiana na wykresach.

Ekspresję na badanych czynnikach na poziomie białka Doktorantka oceniała ilościową metodą ELISA oraz metodą barwienia immunohistochemicznego. Wszystkie procedury, zostały dobrze i wyczerpująco opisane. Nie mam również zastrzeżeń do wyboru metod analizy statystycznej, chociaż stosowanie przy przedstawianiu wyników średniej \pm SEM jest metodą, która odrobinę fałszuje rzeczywistość. W mojej opinii raczej należy używać wartości odchylenia standardowego (SD) gdyż lepiej ilustruje rozrzut wyników.

Wyniki zostały przedstawione na licznych wykresach i mikrofotografiach i szczegółowo opisane w tekście. Sugerują one, że progesteron i octan uliprystalu przeciwstawnie wpływają na żywotność komórek mięśniaków i modyfikują ekspresję receptorów dla progesteronu oraz wpływają na ich lokalizację. Najciekawsza według mnie część pracy dotyczy oceny wpływu progesteronu i octan uliprystalu na ścieżki sygnałowe TGF β i ich związek z ekspresją i wydzielaniem VEGF i IL-6. Doktorantka zbadała również wpływ obu czynników na ścieżkę sygnałową RHOA. Wyniki te są uzupełnione badaniem ekspresji panelu cytokin o charakterze zapalnym. Doktorantka dowiodła, że octan uliprystalu hamuje szlak TGF β i funkcje białka

SMAD3 indukowane przez progesteron, co ma istotne przełożenie na procesy włóknienia oraz uwalniania cytokin.

Na koniec omówienia wyników Doktorantka dokonała podsumowania wskazując na istnienie dwóch różnych mechanizmów działania progesteronu i octanu uliprystalu w mięśniakach macicy. Według niej progesteron dodatkowo aktywuje w mięśniakach nieklasyczny szlak sygnałowania związany z jego receptorami błonowymi i aktywacją szlaku sygnałowego TGF β /SMAD3. Octan uliprystalu hamuje ten szlak zmniejszając ekspresję receptorów błonowych, co przekłada się na hamowanie proliferacji, wzrost oraz syntezę składników macierzy pozakomórkowej. Doktorantka doskonale zilustrowała ten mechanizm na ryc. 28, która stanowi swego rodzaju podsumowanie wyników jej pracy.

Nie mam większych zastrzeżeń do przedstawionych wyników i sposobu ich prezentacji i interpretacji, chociaż zauważyłem, że w wielu doświadczeniach różnice między grupami mimo istotności statystycznej były w rzeczywistości bardzo niewielkie (różnice rzędu kilkanaście – dwadzieścia procent). Może to budzić uzasadnioną wątpliwość, czy obserwowane różnice mają jakiegokolwiek znaczenie biologiczne.

W dyskusji Doktorantka skupiła się na analizie swoich wyników w kontekście wiedzy z piśmiennictwa światowego. Dyskusja poprowadzona jest właściwie i można powiedzieć, że jest popisem erudycji Doktorantki. Dowodzi ona, że udało się jej dostarczyć dowody na istnienie dwóch mechanizmów działania progesteronu, które mają znaczenie w patogenezie mięśniaków. Ma to istotne znaczenie, ponieważ dostarcza przesłanek do poszukiwania skuteczniejszych metod terapii.

Na podstawie uzyskanych wyników i dyskusji Doktorantka sformułowała 9 wniosków w rzeczywistości będących jednocześnie podsumowaniem osiągnięć niniejszej pracy. Uważam te wnioski za uzasadnione i mające pokrycie w uzyskanych wynikach.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam rozprawę lek. Gabrieli Milewskiej ze względu na bardzo ciekawe wyniki, które rzucają nowe światło na patogenezę mięśniaków macicy oraz pokazują nowy, interesujący mechanizm terapeutycznego działania octanu uliprystalu. Krytyczne uwagi, które narzuciły mi się w trakcie lektury monografii nie mają istotnego znaczenia i nie wpłynęły na moją pozytywną ocenę całej pracy. Ponadto stwierdzam, że Doktorantka dysponuje bogatym warsztatem badawczym i szeroką wiedzą w temacie prowadzonych badań i nie mam wątpliwości, że osiągnęła stopień dojrzałości i samodzielności naukowej uprawniającej ją do ubiegania się o stopień doktora.

Monografia lek. Gabrieli Milewskiej jest jej samodzielnym, oryginalnym i interesującym osiągnięciem oraz spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktorski określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i

Nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zmianami). W związku z tym wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Gabrieli Milewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponieważ jestem pod dużym wrażeniem umiejętności Doktorantki i wysiłku jaki włożyła w wykonanie licznych eksperymentów i przygotowanie tak znakomitej monografii oraz wartości uzyskanych wyników ośmielam się zwrócić się również do Wysokiego Senatu o rozważenie możliwości wyróżnienia jej pracy doktorskiej.

Warszawa, 15/09/2023

prof. dr hab. Jacek Malejczyk