

Lek. Beata Krystyna Rak

Mechanizm inwazyjności gruczolaków przysadki zależny od mikroRNA.

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

Promotor: Dr hab. n. med. Urszula Ambroziak

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Gruzołaki przysadki (pituitary adenomas, PAs) są nowotworami przedniego płata przysadki, która pełni rolę centralnego regulatora hormonalnej homeostazy w organizmie. Gruzołaki przysadki są trzecim co do częstości występowania nowotworem wewnątrzczaszkowym, tuż po glejakach i oponiakach. PAs w większości są łagodnymi zmianami, jednak zdarzają się również formy złośliwe, źle rokujące, które mają tendencję do częstych nawrotów. W tych szczególnych przypadkach kluczowa jest wczesna detekcja nowotworu oraz interwencja operacyjna doświadczonego neurochirurga, jak również monitoring pooperacyjny. Niestety brak jest dobrego biomarkera inwazyjności gruczołaków przysadki, a ich patogenezę molekularną pozostaje nie do końca poznana.

MikroRNA (miRNA, miRs) są małymi, niekodującymi polinukleotydami, które mają wpływ na potranskrypcyjną regulację genów. W najnowszych badaniach zmiany poziomu ekspresji wielu cząsteczek mikroRNA są korelowane nie tylko z występowaniem nowotworów, ale także z ich progresją oraz rokowaniem i przeżywalnością pacjentów onkologicznych. Dotychczasowe publikacje naukowe wskazują na znaczącą rolę cząsteczek mikroRNA w patogenezie gruczołaków przysadki.

Celem niniejszej pracy było zbadanie inwazyjnych oraz nieinwazyjnych gruczołaków przysadki pod kątem identyfikacji nowych cząsteczek m.in. wśród mikroRNA, które pomogłyby w różnicowaniu guzów inwazyjnych od nieinwazyjnych, oraz które mogłyby przybliżyć patogenezę PAs.

Rozprawę podzielono na dwie główne części. W pierwszej części przeprowadzono retrospektywną analizę danych obecnie dostępnych w standardowych ocenach histopatologicznych w celu poszukiwania markerów inwazyjności PAs. Analiza została przeprowadzona na grupie 2348 guzów przysadki operowanych w latach 2010-2018 w Klinice Neurochirurgii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie. Wszystkie oceny patologiczne zostały przeprowadzone w Zakładzie Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie. Szczegółową analizę dostępnych parametrów, w tym fenotypu w badaniu mikroskopii elektronowej (electron microscopy, ME), inwazyjności mierzonej za pomocą skali Knospa oraz indeksu proliferacyjnego Ki-67 wykonano na przykładzie gruczołaków kortykotropowych (n=348).

W drugiej części rozprawy skupiono się na poszukiwaniu nowych cząsteczek wśród mikroRNA, które mogłyby odpowiadać za inwazyjny charakter PAs. W badaniu przesiewowym z użyciem mikromacierzy oceniono poziom ekspresji 754 cząsteczek mikroRNA w 12 PAs, w celu odpowiedzi na pytanie czy istnieją cząsteczki mikroRNA, których poziom różni się między inwazyjnymi i nieinwazyjnymi PAs. W dalszej kolejności przeprowadzono także eksperymenty *in vitro* w celu oceny wpływu cząsteczek mikroRNA na inwazyjność linii komórkowej gruczolaka przysadki.

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że w badanej grupie najczęściej występowały gruczolaki nieczynne hormonalnie, a spośród czynnych hormonalnie gruczolaki somatotropowe i kortykotropowe. Gruczolaki kortykotropowe występowały 4-krotnie częściej u kobiet niż u mężczyzn. Ocena ultrastrukturalna w ME gruczolaków kortykotropowych pozwoliła na korelację fenotypów bogatoziarnistego (DG) i skąpoziarnistego (SG) z różnymi parametrami. Stwierdzono, że w fenotypie SG częściej występuje inwazyjność oraz większa objętość guza, a także wyższy indeks proliferacyjny Ki-67.

W części poświęconej oryginalnym badaniom laboratoryjnym stwierdzono, że istnieją 22 cząsteczki mikroRNA, których poziom istotnie różni się między gruczolakami inwazyjnymi i nieinwazyjnymi. Wybrano spośród nich 9, których poziom ekspresji określono metodą PCR w czasie rzeczywistym na większej grupie PAs (n=75) i wykazano, że poziom ekspresji mikroRNA-191-5p był istotnie mniejszy w gruczolakach inwazyjnych (p=0,0062**). Ponadto zaobserwowano, że w dwóch najczęstszych typach gruczolaków przysadki, czyli w guzach gonadotropowych i somatotropowych, poziom ekspresji mikroRNA-186-5p i mikroRNA-191-5p różni się istotnie statystycznie (odpowiednio p=0,0264* i p=0,0368*). Dodatkowo dla kilku cząsteczek mikroRNA zaobserwowano silną korelację koekspresji w tych samych tkankach PAs. Następnie poziomy ekspresji cząsteczek mikroRNA skorelowano z poziomami ekspresji docelowych genów (PTEN, HIF1 α , EPAS1, TGFB1, VEGFA oraz TIMP2), w których cząsteczki te mają potencjalne miejsca wiązania. Zaobserwowano istotne statystycznie korelacje dla genów: PTEN, TGFB1 oraz TIMP2, co świadczy o możliwym zaangażowaniu wymienionych genów w mechanizm inwazyjności gruczolaków przysadki.

W eksperymentach *in vitro* wykazano, że mikroRNA-454-3p i mikroRNA-590-5p zwiększają inwazyjność modelowej linii komórkowej gruczolaka przysadki RC-4B/C. Dodatkowo mikroRNA-93-3p i mikroRNA-590-5p zwiększały zdolność do tworzenia kolonii linii RC-4B/C. Transfekcje syntetycznymi cząsteczkami mikroRNA nie miały jednak wpływu na migrację komórek.

Przeprowadzone retrospektywne analizy pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że fenotyp SG częściej występuje w inwazyjnych gruczolakach kortykotropowych. Wykonane badania laboratoryjne wykazały, że istnieją cząsteczki mikroRNA, których poziom różnił się istotnie statystycznie w gruczolakach inwazyjnych i nieinwazyjnych. Co więcej w układzie *in vitro* zaobserwowano zwiększoną inwazyjność linii RC-4B/C pod wpływem dwóch cząsteczek mikroRNA. Mechanizmem zależnym od cząsteczek mikroRNA, który jest odpowiedzialny za inwazyjność gruczolaków przysadki może być zmniejszony poziom ekspresji mRNA dla białek supresorowych t.j. PTEN oraz TIMP2.

Beata Rak
lekarz 3161658

Urszula Ambroziak
8716462 dr hab. n. med. Urszula Ambroziak
specjalista chorób wewnętrznych
ENDOKRYNOLOG

