

lek. Iwona Elżbieta Sontowska

**Zbadanie aktywacji wybranych szlaków przekazywania sygnałów w
komórkach dysembrioplastycznych nowotworów
neuroepitelialnych.**

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

Promotor: dr hab. n. med. Wiesława Grajkowska, prof. IPCZD

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury,
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2019

Streszczenie

Dysembrioplastyczny nowotwór neuroepitelialny (DNT) jest nowotworem glejowo-neuronalnym o niskim stopniu złośliwości (I stopień złośliwości wg WHO). Lokalizuje się najczęściej w płacie skroniowym, dając objawy w postaci napadów padaczkowych, często lekoopornych. Guz ten występuje głównie u dzieci i młodych dorosłych. Podstawową formą leczenia jest resekcja guza ze strefą epileptogenną. Całkowita resekcja zwykle powoduje ustąpienie objawów u około 80% pacjentów. Niemniej jednak zdarzają się nawroty, niekiedy po wielu latach.

DNT to niejednorodna grupa nowotworów, ponieważ w literaturze można spotkać opisy czterech wariantów histopatologicznych: prostego, złożonego, niespecyficznego i rozlanego. Najczęstsze to wariant prosty i złożony, czasem określane wspólną nazwą jako specyficzne formy DNT. W ich obrazie histopatologicznym dominują charakterystyczne elementy glejowo-neuronalne i tak zwane „floating neurons”.

Obecnie, w literaturze światowej sugeruje się potrzebę wprowadzenia nowego podziału nowotworów związanych z długotrwałą padaczką (w tym DNT), który opierałby się również na ocenie zmian molekularnych.

Zaburzenia molekularne leżące u podstaw rozwoju DNT wciąż nie są dokładnie poznane. Wydaje się, że istotne znaczenie w patogenezie nowotworu mają zaburzenia wewnątrzkomórkowego szlaku MAPK/ERK oraz mTOR. Szlaki te, w przypadku nadmiernej aktywacji mogą wpływać na wzrost proliferacji komórkowej, a tym samym na rozwój nowotworu.

W DNT wykryto obecność mutacji aktywującej p.V600E w genie *BRAF*. Gen ten koduje białko B-RAF, należące do szlaku MAPK/ERK. Opisana częstość powyższej mutacji różni się dość znacznie w poszczególnych pracach badawczych (od 0 do nawet 51%). Jednak ostatnio, sugeruje się, że nie jest to często występująca zmiana w typowym DNT.

W niniejszej pracy przeprowadzono badania na 47 przypadkach DNT, zaklasyfikowanych jako forma histopatologiczna prosta, uzyskanych od pacjentów pediatrycznych. Kontrolnym materiałem badawczym były prawidłowe fragmenty kory i istoty białej pobrane w trakcie autopsji oraz materiał pochodzący z operacji neurochirurgicznych, w którym nie stwierdzono zaburzeń strukturalnych.

Celem pracy była ocena występowania (zwykle form aktywnych) głównych białek szlaków, które mogą promować proliferację komórkową nowotworu. Do wybranych szlaków, na które zwrócono uwagę w niniejszej pracy, należą: MAPK/ERK, mTOR, WNT, Hedgehog. W przypadku białka AKT, kojarzonego przede wszystkim ze szlakiem PI3K/AKT, ograniczono się do oceny jednej z form aktywnych, która może wpływać na wzrost przeżycia komórek.

Kolejnym celem była ocena występowania mutacji aktywującej p.V600E oraz zwiększenia liczby kopii genu *BRAF* w badanym materiale. Natomiast, badanie szlaku WNT zostało poszerzone o ocenę obecności mutacji punktowych we fragmencie eksonu 3 genu kodującego β -kateninę - *CTNNB1*.

Zebrane dane kliniczne pacjentów oraz uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej.

W pracy zastosowano techniki immunohistochemiczne, Western Blot, sekwencjonowanie DNA metodą Sanger oraz Real-Time PCR.

W niniejszej pracy wykazano silną oraz umiarkowaną ekspresję aktywnej (ufosforylowanej) formy białka ERK we wszystkich badanych tkankach nowotworowych. Zwiększenie liczby kopii genu *BRAF* zostało znalezione w 15,8% przebadanych próbek. Natomiast mutacja p.V600E w genie *BRAF* została wykryta tylko w jednej próbce DNT z 36 przebadanych (2,8%).

Wyraźnie dodatnia reakcja cytoplazmatyczna aktywnych form rybosomalnego białka S6 (S6rp), powszechnie uważanego za marker aktywności szlaku mTOR, została zaobserwowana w ponad 80% badanych nowotworów.

W 10,6% badanych guzów wykazano immunoreaktywność białka AKT ufosforylowanego na reszcie serynowej 473.

Zaobserwowano zwiększoną obecność β -kateniny w stosunku do tkanki kontrolnej, zarówno w reakcjach immunohistochemicznych jak i w 10 próbkach przebadanych metodą Western Blot. Jednak, uwidoczniono głównie ekspresję cytoplazmatyczną. Nie wykryto mutacji w sekwencjonowanym fragmencie eksonu 3 genu *CTNNB1*.

Aktywację szlaku Hedgehog badano immunohistochemicznie z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko: transbłonowemu białku Smoothed (SMO) oraz czynnikom transkrypcyjnym GLI1 i GLI3. Wykazano silną i umiarkowaną, jądrową ekspresję białka SMO w 87,2% guzów. Wyraźnie dodatnia, jądrowa ekspresja GLI1 została odnotowana w 65,9% badanych DNT. Natomiast, ekspresja GLI3 w ponad połowie przypadków (55,3%) była porównywalna z dodatnią, umiarkowaną reakcją obserwowaną w kontrolnej tkance nerwowej.

Wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy uzyskaną ekspresją aktywnej formy białka ERK a ekspresją jądrową GLI1 (R Spearman=0,303064; $p=0,038384$). Ekspresja aktywnego ERK korelowała również dodatnio z ekspresją jądrową SMO (R Spearman=0,465079; $p=0,000988$). Podobnie, istotna statystycznie dodatnia korelacja została odnotowana pomiędzy ekspresją jądrową SMO a ekspresją jądrową GLI1 (R Spearman=0,314730; $p=0,031188$). Oprócz tego, ekspresja jądrowa SMO korelowała dodatnio z ekspresją S6rp z fosforylacją na resztach serynowych 235 i 236 (R Spearman=0,344576; $p=0,017700$), jak również z ekspresją S6rp z fosforylacją na resztach serynowych 240 i 244 (R Spearman=0,291174; $p=0,047068$).

Analiza statystyczna danych klinicznych wykazała, że istnieje zależność pomiędzy doszczętnością zabiegu operacyjnego a brakiem lub występowaniem napadów padaczkowych 6 miesięcy po zabiegu operacyjnym (dokładny test Fishera; $p=0,0199$). Obliczony iloraz szans (OR) na występowanie napadów padaczkowych po tym okresie dla grupy pacjentów z niecałkowicie usuniętą zmianą wyniósł 10,8 w stosunku do pacjentów z doszczętną resekcją guza ocenianą w badaniu metodą rezonansu magnetycznego.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na występowanie zaburzeń w obrębie szlaków MAPK/ERK, mTOR oraz Hedgehog w komórkach nowotworów typu DNT. Mniejsze znaczenie mają zaburzenia związane ze szlakiem WNT czy białkiem AKT ufosforylowanym na reszcie serynowej 473.

Jwona Sontowska