

Olga Sieniawska-Buccella

**Rola mikroRNA w patogenezie i prognostyce raka krtani
(streszczenie)**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w zakresie medycyny**

Promotor: Dr hab. n. med. Ewa Osuch-Wójcikiewicz

Katedra i Klinika Otolaryngologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik Katedry i Kliniki:
Prof. dr hab. n. med. Kazimierz Niemczyk



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą I Wydziału Lekarskiego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2018

Material i metodyka badań

Analizą retrospektywną objęto grupę 230 pacjentów ze zweryfikowanym rakiem płaskonabłonkowym krtani, którzy byli leczeni chirurgicznie w Katedrze i Klinice Otolaryngologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2010-2013. Do prowadzonych badań zakwalifikowano: 48 pacjentów do analizy poziomu ekspresji mikroRNA i 135 pacjentów do analizy występowania wariantów polimorficznych genów (SNP) kodujących białka szlaku obróbki mikroRNA.

Badania molekularne zrealizowano we współpracy z Zakładem Chemii i Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w ramach projektu badawczego NCBiR nr 13-0101-10 pt. "Opracowanie i wdrożenie diagnostyki i leczenia raka krtani w Polsce na podstawie badań wieloośrodkowych". Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (nr KB0/7/10).

Materiał do badań molekularnych obejmował utrwalone w bloczkach parafinowych tkanki pochodzące z guza krtani, pobrane od pacjentów podczas zabiegu operacyjnego. Wykonano w prowadzonych badaniach ocenę poziomu ekspresji wybranych mikroRNA (miR-29a-3p, miR-202-3p, miR-548aa, miR-3713 i miR-4768-3p). Stosowano analizę ilościową produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym (reakcja real-time RT-PCR). Dla ustalenia występowania wariantów polimorficznych genów (SNP): DROSHA, DICER1, DGCR8, RAN, TARBP2 i XPO5 kodujących białka szlaku obróbki mikroRNA prowadzono genotypowanie w celu oznaczenia SNP (TaqMan® SNP Genotyping Assays - Applied Biosystems).

Wyniki

Analiza uzyskanych wyników badań wykazała, że określone poziomy ekspresji miR-29a i miR-548aa cechuje dodatnia korelacja zarówno ze stopniem zaawansowania miejscowego raka płaskonabłonkowego krtani jak również z występującymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych. Ekspresja miR-4768-3p była natomiast ujemnie skorelowana z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych. Stwierdzono ponadto, że ekspozycja na dym tytoniowy zmienia stopień ekspresji badanych mikroRNA w raku płaskonabłonkowym krtani. Ustalono, że poziom ekspresji miR-202-3p był znacznie zwiększony u pacjentów palących w porównaniu z pacjentami niepalącymi. Natomiast stopień ekspresji 4768-3p, miR-548aa i miR-3713 ulega znacznemu obniżeniu.

Analiza wyników badań w zakresie charakteryzacji wariantów polimorficznych genów kodujących białka szlaku biosyntezy mikroRNA w raku płaskonabłonkowym krtani, pozwoliła stwierdzić, że częstotliwość występowania polimorficznych wariantów GT i TT genu XPO5 była większa u pacjentów z rakiem krtani w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wstęp

Rak płaskonabłonkowy jest najczęściej występującym nowotworem krtani. Postęp w diagnostyce choroby, rozwój metod operacyjnych i rekonstrukcyjnych oraz metod napromieniowania chorych nie wpłynął istotnie na zmniejszenie zachorowalności, skrócenie okresu diagnozowania choroby i na jej wyleczalność. Od lat prowadzone są badania dotyczące podstaw genetycznych rozwoju raka krtani, powstawania przerzutów i wznów choroby. Jednak mimo rozszerzenia wiedzy i uzyskania wielu istotnych rezultatów tych badań nie zidentyfikowano zmian typowych dla raka płaskonabłonkowego krtani, które miałyby znaczenie w codziennej praktyce klinicznej, a więc również w postępowaniu terapeutycznym. Analiza wyników wielokierunkowych badań ostatnich kilku lat wykazuje wyraźnie, że tylko ścisła współpraca specjalistów w zakresie laryngologii, onkologii klinicznej, biologii molekularnej i patomorfologii umożliwi uzyskanie istotnego postępu zarówno w metodach diagnostyki i prognozowania, jak również w przebiegu leczenia chorób nowotworowych głowy i szyi.

Realizacja badań dotyczących przyczyn powstawania nowotworów, w ostatnich dwudziestu latach, doprowadziła m.in. do odkrycia i ustalenia roli mikroRNA. Wyniki tych badań wskazują na występowanie zależności między mikroRNA, a inicjacją i rozwojem chorób nowotworowych głowy i szyi. Istnieje więc wyraźna potrzeba ustalenia roli określonych mikroRNA w patogenezie raka płaskonabłonkowego krtani. Rozszerzony zakres wiedzy dotyczący tych zagadnień pozwoli na opracowanie metod wykonywania szybkiej i dokładnej diagnostyki, przede wszystkim umożliwi ustalenie poziomu złośliwości choroby nowotworowej. Jednocześnie więc stworzy podstawy do zwiększenia stopnia pewności w prognozowaniu rozwoju ewentualnych wznów miejscowych złośliwych nowotworów krtani i ich przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych oraz do opracowania schematów standardowych w celu skuteczniejszego procesu leczenia.

Cel pracy

Celem prowadzonych badań była charakteryzacja dwóch zjawisk występujących w patogenezie nowotworów krtani:

1. zaburzenia poziomu ekspresji mikroRNA,
2. zmiany genetyczne (SNP, warianty polimorficzne genów) białek biorących udział w obróbce mikroRNA.

Przyjęto hipotezę-założenie, że zaburzenia w szlaku obróbki mikroRNA mogą prowadzić do zmiany w ekspresji mikroRNA oraz że jest możliwość ustalenia zależności pomiędzy stopniem tych zmian a występowaniem i progresją raka krtani.

Stwierdzono również, że częstotliwość występowania heterozygoty CT genu RAN jest większa w grupie kontrolnej niż u pacjentów z rakiem krtani. Wykazano zależność obecności genotypów TT i AG genu DICER1 a także genotypów AG i GG genu TARBP2 z większym ryzykiem rozwoju raka płaskonabłonkowego krtani. Stąd analiza uzyskanych wyników badań pozwala przyjąć założenie, że uzyskany poziom charakterystyki polimorfizmu genów przetwarzania mikroRNA umożliwi ich wprowadzenie do grupy czynników użytecznych jako czynniki predykcyjne rozwoju raka krtani.

Wnioski

Analiza wyników prowadzonych badań pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

- występuje korelacja pomiędzy poziomem ekspresji niektórych, badanych mikroRNA i stopniem rozwoju raka płaskonabłonkowego krtani – m.in. miR-29a i miR-548aa działają jako onkogeny, natomiast miR-4768-3p jako supresor raka płaskonabłonkowego krtani; również występuje zależność pomiędzy poziomem ekspresji mikroRNA i paleniem tytoniu,
- warianty polimorficzne genów kodujących białka szlaku biosyntezy mikroRNA przyjęte w badaniach, można skojarzyć z ryzykiem wystąpienia raka płaskonabłonkowego krtani, także ze stopniem jego progresji - zależnym od zaawansowania miejscowego i węzłowego procesu nowotworowego,
- wykazano możliwość praktycznego wprowadzenia mikroRNA i SNP genów kodujących białka biosyntezy mikroRNA jako istotnych biomarkerów dla zastosowania w diagnostyce, prognozowaniu oraz opracowaniu standardów w procesie leczenia raka płaskonabłonkowego krtani,
- występuje potrzeba kontynuowania badań przede wszystkim dla ustalenia dokładnego udziału i roli mikroRNA w patologicznych mechanizmach regulatorowych odpowiadających za rozwój raka płaskonabłonkowego krtani.

E. Amjath

Olga Gieniewska-Bucelle