

Prof. dr hab. med. Katarzyna Łącka
Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii
i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny
im. K. Marcinkowskiego
w Poznaniu

Poznań, 15.08.2020

O c e n a

rozprawy doktorskiej mgr Jadwigi Żebrackiej-Gali pt.: "Profil ekspresji genów w gruczolakach przysadki".

Patogeneza gruczolaków przedniego płata przysadki, stanowiących około 10% wszystkich guzów wewnątrzczaszkowych, nadal nie jest do końca wyjaśniona.

Od czasu pierwszych doniesień naukowych dotyczących molekularnych podstaw guzów przysadki nastąpił znaczny postęp w poznaniu mechanizmów ich rozwoju. Istnieje kilka teorii dotyczących ich powstawania, z których dwie są najbardziej uznane. Są to: 1 teoria: gruczolaki przysadki powstają w wyniku nadmiernej stymulacji komórek przez neurohormony (GnRH, GHRH, TRH, CRH), hormony obwodowych gruczołów dokrewnych, czy czynniki wzrostowe (bFGF, FGF4, TGF α i β , NGF) oraz 2. teoria, według której guzy przysadki powstają w wyniku mutacji somatycznych np. w genie *GNAS*, *CCND1*, *HRAS* czy genów supresorowych *p53*, *p27*, *RB* związanych z bardziej złośliwym przebiegiem guzów.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono określeniu profilu ekspresji genów w gruczolakach przedniego płata przysadki i poznania molekularnych podstaw prowadzących do proliferacji komórek nabłonkowych i powstawania nowotworów przysadki. Obok znaczenia poznawczego, miałyby to aspekt kliniczny i znaczenie w

rozwoju metod terapeutycznych tych, w większości łagodnych guzów; np. uzyskanie specyficznych inhibitorów hamujących sekrecję hormonów.

Stosunkowo wolne prowadzenie badań związane jest przede wszystkim z małą dostępnością materiału biologicznego, a więc ludzkich przysadek i odpowiednich linii komórkowych. Zagadnienie to stanowi bardzo ciekawy, a zarazem wyjątkowo trudny zakres badań.

Stąd temat pracy Doktorantki, zarówno ze względów poznawczych jak i klinicznych jest bardzo istotny, a jego wybór celowy i uzasadniony.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma klasyczny układ i zawiera 148 stron maszynopisu, 37 rycin, 20 tabel, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz 129 pozycji piśmiennictwa. W oddzielnym rozdziale (11) Doktorantka przedstawiła spis skrótów (tabela 19) oraz wykaz wszystkich genów (ich symboli i nazw angielskich) wymienionych w rozprawie.

Założenia i cel pracy został określony jasno i precyzyjnie i polegał na określeniu profilu ekspresji genów przy użyciu macierzy oligonukleotydowych w różnych typach guzów przedniego płata przysadki oraz porównanie profilu genów w guzach hormonalnie czynnych i hormonalnie nieczynnych. Ponadto Doktorantka podjęła się próby wypracowania metod transkryptomicznych dla analizy profilu ekspresji genów w guzach przysadki poprzez 2 modele analizy: 1. badanie ekspresji transkryptów potencjalnie charakterystycznych dla poszczególnych typów przysadki: *POMC*, *GH*, *PRL*, *TSHb*, *LHb*, *FSH*, i *αSU*, oraz 2. Porównanie profilu ekspresji genów guzów przysadki do gruczołaków innych narządów wydzielania wewnętrznego. Dodatkowym celem była ocena ekspresji dotąd mało poznanych genów: *FOLR1*, *BAG1*, *LAPTM4B* (Evans i wsp. 2001; Morris i wsp., 2005).

Celowość podjętych badań Doktorantka uzasadnia w dobrze opracowanym wstępie. Doktorantka przedstawia informacje dot podziału guzów przysadki uwzględniający rozmiary guza, ich inwazyjność, barwliwość, podział anatomiczno-radiologiczny oraz podział czynnościowy uwzględniający barwienie immunohistochemiczne, a także podaje dokładną charakterystykę czynnych hormonalnie gruczołaków przysadki.

Jednak przede wszystkim Doktorantka koncentruje się na opisie molekularnego podłoża guzów przysadki i informacji dot. metod wysokoprzepustowych do badań molekularnych. Uwzględniając najnowsze dane z piśmiennictwa szczegółowo opisuje wyniki badań mikromacierzowych i profilu ekspresji genów w guzach przysadki.

Badania zostały przeprowadzone u 147 osób, w tym, u 76 kobiet i 71 mężczyzn. Materiał do badań stanowiły przysadki pobrane śródoperacyjnie od pacjentów operowanych transfenoidalnie w Klinice Neurochirurgii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. W każdym przypadku wykonano badanie histopatologiczne potwierdzające łagodny charakter guza oraz badanie immunohistochemiczne. To ostatnie umożliwiło podział materiału klinicznego na dwie grupy. Pierwszą stanowiły 73 gruczolaki nieczynne klinicznie (NFA) immunohistochemicznie ujemne „0” (38), wykazujące obecność LH „LH+” (29) i wykazujące obecność FSH „FSH+” (6). Natomiast druga grupa obejmowała 74 gruczolaki przysadki hormonalnie czynne wykazujące obecność prolaktyny „PRL+” (35), obecność hormonu wzrostu „GH+” (23), ACTH „ACTH+” (8) i TSH „TSH+” (8).

Ponadto w drugiej części swoich badań dot. porównania ekspresji genów w gruczolakach przysadki do gruczolaków innych gruczołów dokrewnych, Doktorantka wykorzystła przysadki z immunohistochemicznie ujemnym gruczolakiem (12 przypadków), 12 gruczolaków pęcherzykowych tarczycy (FTA) oraz 12 gruczolaków przytarczyc (ParA).

Materiał kliniczny wykorzystany w badaniach został doskonale dobrany. Liczba i różnorodność immunohistochemiczna analizowanych przysadek, zważywszy na rzadkie występowanie guzów tego gruczołu w populacji, jest dodatkowym argumentem wzmacniającym wagę uzyskanych wyników.

Cześć metodyczna została prawidłowo zaprojektowana i przedstawiona. Przy realizacji założeń rozprawy Doktorantka zastosowała następujące metody: izolację RNA dwoma metodami: Chomczyńskiego i Sacchi oraz przy użyciu Rneasy MicroKit z oceną ilościową i jakościową uzyskanego RNA i podaniem współczynnika RIN, syntezę cDNA przy użyciu zestawu Omiscript, ilościowe reakcje PCR w czasie rzeczywistym (QPCR) oraz badanie ekspresji genów metodą mikromacierzy.

Metodyka została bardzo wnikliwie opisana, a sekwencje starterów i sond do ilościowej reakcji PCR oraz wykaz genów użytych do reakcji bardzo precyzyjnie przedstawione w tabelach (tab 3A i 3B). Doktorantka zamieściła również w pracy wykaz odczynników i aparatury wykorzystanych w eksperymencie, a także dokładny skład mieszanin użytych do reakcji.

Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica. Zgodność rozkładu ekspresji badanych genów z rozkładem normalnym oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka, a ze względu na odchylenie od rozkładu normalnego analizę przeprowadzono przy użyciu nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya.

Uzyskane wyniki badań Doktorantka przedstawiła bardzo klarownie w odpowiednim rozdziale, na 41 czytelnych i przejrzystych (kolorowych) rycinach i w 18 tabelach.

Spośród wielu uzyskanych wyników najważniejsze to:

1. wyższa ekspresja genu *FOLR1* w gruczolakach hormonalnie nieczynnych NFA oraz gruczolakach immunohistochemicznie ujemnych („0”) w porównaniu do wszystkich guzów hormonalnie czynnych,
2. śladowa ekspresja genu *FOLR1* w gruczolakach immunohistochemicznie dodatnich w zakresie GH (gruczolakach GH+),
3. znamienne wyższa ekspresja genu *BAG1* w gruczolakach hormonalnie czynnych (GH+ i PRL+) w porównaniu do gruczolaków нефункциональных (NFA i „0”),
4. brak znamiennych różnic w ekspresji genu *LAPTM4B* pomiędzy badanymi typami gruczolaków,

W omówieniu Doktorantka przekonywująco interpretuje własne wyniki badań, uwzględniając dane innych autorów i przytaczając najnowsze piśmiennictwo. Dyskusja jest rzeczowa, logicznie prowadzona i świadczy o naukowej samodzielności Autorki.

Wnioski końcowe korespondują całkowicie z celem pracy i znajdują rzetelne merytoryczne uzasadnienie w uzyskanych wynikach badań. Są to:

1. znamienne różnice w ekspresji genów w gruczolakach przedniego płata przysadki hormonalnie czynnych i hormonalnie nieczynnych,
2. regulacja ekspresji *GH* i *POMC* zachodzi na poziomie transkrypcji,

3. transkrypty *PRL*, *TSHb*, *LHb*, *FSHb*, i *αSU* nie stanowią charakteru markerowego dla odpowiednich guzów przysadki,
4. przebieg transformacji nowotworowej w gruczolakach przysadki różni się w porównaniu do gruczolaków przytarczyc i gruczolaków pęcherzykowych tarczycy,
5. zmiany w ekspresji genów *FOLR1* i *BAG1*, pomimo ich różnic w różnych typach gruczolaków, nie wykazują charakteru dominującego w całym profilu ekspresji tych genów.

Doktorantka słusznie konkluduje, że uzyskane wyniki dotyczące profilu ekspresji genów w badanych gruczolakach przedniego płata przysadki mogą „stanowić zbiór wyjściowy dla dalszej analizy klinicznej przebiegu pooperacyjnego choroby”.

Załączony wykaz piśmiennictwa jest bogaty i zawiera najnowsze i istotne dla analizowanego zagadnienia pozycje, z których znaczna część dotyczy ostatnich 10 lat.

Przedstawioną mi do oceny rozprawę oceniam bardzo wysoko. Autorka wykazała się odpowiednim przygotowaniem merytorycznym i metodologicznym. Podjęta problematyka badawcza cechuje się aktualnością, a uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje na temat molekularno-genetycznego podłoża etiopatogenezy guzów przedniego płata przysadki. Autorka nadała całości spójną i estetyczną formę graficzną. Praca jest bardzo starannie zredagowana, ryciny dobrze ilustrują tekst, ułatwiając percepcję niekiedy trudnych zagadnień.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca mgr Jadwigi Żebrowskiej - Gali pt: "Profil ekspresji genów w gruczolakach przysadki" spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskich i na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej - Curie o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na nowatorskość pracy, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. med. Katarzyna Łacka

