

Mgr analityki medycznej Paulina Milecka

ADROPINA I JEJ RECEPTOR W GUZACH NADNERCZY CZŁOWIEKA.

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

Promotor: prof. dr hab. Marcin Ruciński
Promotor pomocniczy: dr n. med. Hanna Komarowska



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Za okazaną pomoc, wsparcie i życzliwość w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej składam **Panu Profesorowi Marcinowi Rucińskiemu** oraz **Pani Doktor Hannie Komarowskiej** serdeczne podziękowania.

Dziękuję **Panu Profesorowi Rektorowi Michałowi Nowickiemu**, Kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii UM w Poznaniu za możliwość realizacji doktoratu w Zakładzie, w atmosferze sprzyjającej rozwojowi i nauce.

Dziękuję **Wszystkim Członkom Zespołu** za nieocenioną pomoc w wykonywaniu badań.

Dziękuję **Mężowi, Rodzicom i Teściom** za bezgraniczną pomoc, motywację oraz wsparcie.

Zagadnienia poruszane w niniejszej rozprawie zostały wstępnie opublikowane w pracy:
Stelcer E*, Milecka P*, Komarowska H, Jopek K, Tyczewska M, Szyszka M, Lesniczak M, Suchorska W, Bekova K, Szczepaniak B, Ruchala M, Karczewski M, Wierzbicki T, Szaflarski W, Malendowicz LK, Rucinski M. Adropin Stimulates Proliferation and Inhibits Adrenocortical Steroidogenesis in the Human Adrenal Carcinoma (HAC15) Cell Line. Front Endocrinol (Lausanne). 2020

Jednakże wyniki oraz analizy prezentowane w niniejszej rozprawie nie stanowią kopii wyników z ww. publikacji.

* - pierwsze autorstwo równorzędne

Skróty stosowane w pracy

Wykaz skrótów:

ACC	rak kory nadnercza
acetylo-CoA	acetylo-koenzymu A
ACTH	adrenokortykotropina, hormon adrenokortykotropowy
ADIPOQ	adiponektyna
AFP	alfa-fetoproteina
ARO	aktywność reninowa osocza
BMI	wskaźnik masy ciała
Ca	wapń
CAH	wrodzona hipreplazja nadnerczy
cAMP	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
CEA	antygen rakowo- płodowy
CYP11A1	desmolaza cholesterolowa (P450 _{scc})
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DNA	kwas dezoksyrybonukleinowy
DZM	dobowa zbiórka moczu
ft3	trijodotyronina
ft4	tyroksyna
GHREL	ghrelina
HCl	kwas solny
HDL	lipoproteina wysokiej gęstości
HPA	oś podwzgórze-przysadka-nadnercze
HPRT	fosforybozylo-transferaza hipoksantyny
IGF 2	insulinopodobny czynnik wzrostu 2
IGF1 receptor	receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1
IGF2 receptor	receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 2
IR	receptor dla insuliny
K	potas
LDL	lipoproteina niskiej gęstości
M	stężenie molowe
mRNA	matrycowy RNA
Na	sód
OB	odczyn Biernackiego
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy
POMC	proopiomelanokortyna
qPCR	reakcja PCR w czasie rzeczywistym
SHBG	globulina wiążąca hormony płciowe
TC	cholesterol całkowity
TG	triglicerydy
TSH	tyreotropina, hormon tyreotropowy
VEGF	śródbłonkowy czynnik wzrostu

Pozostałe skróty oraz skróty nazw genów – opisano w tekście.

Spis treści:

SKRÓTY STOSOWANE W PRACY	4
1 WSTĘP	7
1.1 GUZY NADNERCZY - PODSTAWOWE INFORMACJE	7
1.1.1 Czynniki ryzyka	7
1.1.2 Rak nadnercza (ACC - ang. Adrenocortical carcinoma)	8
1.1.3 Guz chromochłonny - pheochromocytoma	9
1.1.4 Gruczolak nadnerczy - Adenoma	10
1.1.5 Mielolipoma	10
1.1.6 Przerost nadnerczy - hiperplazja	11
1.2 ADROPINA I JEJ RECEPTOR	12
1.2.1 Adropina - podstawowe informacje	12
1.2.2 Receptor adropiny – podstawowe informacje	13
1.2.3 Biologiczna rola adropiny	14
Wpływ adropiny na endotelium (śródbłonek naczyniowy)	14
Rola adropiny w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu. Regulacja węglowodanów i lipidów.	14
Potencjalna rola w Centralnym Układzie Nerwowym	15
1.3 FIZJOLOGIA NADNERCZY	15
1.3.1 Nadnercza- podstawowe informacje	15
1.3.2 Steroidogeneza	16
2 ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	18
3 MATERIAŁY I METODY	19
3.1 MATERIAŁ KLINICZNY	19
3.1.1 Skrawki nadnerczy	19
3.1.2 Surowica krwi	21
3.1.3 Linia komórkowa	22
3.1.4 Strony internetowe i oprogramowania	23
3.2 METODY	23
3.2.1 Izolacja całkowitego RNA z komórek tkanki nadnercza	23
3.2.2 Ocena ilości wyizolowanego RNA	24
3.2.3 Odwrotna Transkrypcja (RT)	25
3.2.4 Real -Time PCR	25
3.2.5 Analiza transkryptomu z zastosowaniem mikromacierzy ekspresyjnych	27
3.2.5 Hodowla komórkowa	30
3.2.6 RTCA (Real Time Cell Analyzer)	31
3.2.7 Test immunoenzymatyczny ELISA (Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay)	32
3.2.8 Immunofluorescencja	36
4 WYNIKI	38
4.1 Analiza ekspresji genu kodującego adropinę (ENHO) oraz jej receptora (GPR19) w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy.	38
4.2 Określenie zależności między nadnerczową ekspresją genu ENHO, GPR19, a zebranymi danymi klinicznymi oraz ekspresją innych genów.	40
4.3 Porównanie stężeń wydzielonej do krążenia adropiny, badanej w surowicy krwi pacjentów z różnych typów guzów nadnerczy w odniesieniu do grupy zdrowych osób (kontrola) (metoda ELISA).	46
4.4 Określenie zależności między stężeniem wydzielonej adropiny, a zebranymi danymi klinicznymi (metody korelacji danych liczbowych).	48
4.5 Analiza wpływu nadnerczowej ekspresji ENHO oraz GPR19 na przeżycie pacjentów z rakiem nadnerczy (analiza z wykorzystaniem danych TCGA)	50
4.6 DOŚWIADCZENIA Z WYKORZYSTANIEM LINII KOMÓRKOWEJ HAC15 ORAZ PIERWOTNEJ HODOWLI ACC	51
4.6.1 Pomiar proliferacji komórek nowotworowych linii komórkowej HAC15.	51
4.6.2 Oznaczenie stężenia aldosteronu oraz kortyzolu wydzielanego przez komórki HAC15 pod wpływem działania adropiny.	52

4.6.3 Oznaczenie stężenia kortyzolu wydzielanego przez komórki nowotworowe hodowli pierwotnej raka kory nadnercza pod wpływem działania adropiny.....	54
4.6.4 Efekt działania adropiny - ekspresja STAR, CYP11A1 oraz CYP11B1 na poziomie białka.	55
4.6.5 Wpływ adropiny na regulację profilu transkryptomycznego komórek HAC15.	57
5 DYSKUSJA	60
6 WNIOSKI.....	70
7 SUPLEMENT.....	71
8 SPIS RYCIN	74
9 SPIS TABEL.....	76
10 STRESZCZENIE	78
10.1 Streszczenie.....	78
10.2 Abstract.....	79
11 PIŚMIENNICTWO	82

1 Wstęp

1.1 Guzy nadnerczy - podstawowe informacje.

Według danych statystycznych guzy nadnerczy występują u 3-10% populacji (1,2). Stwierdza się je u 1 na 10 osób, które poddały się badaniom obrazowym z różnych powodów zdrowotnych (3). W takiej sytuacji guzy te są nazywane incydentaloma. Stanowią one 70% wszystkich guzów nadnerczy. Najczęściej są to łagodne, nieczynne hormonalnie gruczolaki, o średnicy poniżej 4 cm, które mają dobre rokowanie i nie wymagają dalszego leczenia (4). Guzy nadnercza stanowią bardzo heterogenną grupę pod względem stopnia złośliwości, manifestacji klinicznych, a także rokowania (4). Podział guzów nadnerczy opiera się na ich pochodzeniu, złośliwości oraz czynności hormonalnej. Pod względem pochodzenia wyróżniamy guzy wywodzące się z kory lub rdzenia nadnerczy oraz guzy przerzutowe (5). Guzy czynne hormonalnie najczęściej produkują kortyzol lub aldosteron. Hyperkortyzolemia fenotypowo manifestuje się objawami charakterystycznymi dla zespołu Cushinga: otyłością centralną, purpurowymi rozstępami, zaokrągleniem i rumieniem twarzy, tzw. karkiem bawolim, nadciśnieniem tętniczym, hirsutyzmem, zaburzeniami menstruacyjnymi. W przypadku guzów typu aldosteronoma u pacjentów obserwujemy oporne na leczenie nadciśnienie tętnicze i hipokaliemię. Rzadziej rozpoznawane są gruczolaki produkujące androgeny. Guzy czynne hormonalnie wymagają zazwyczaj leczenia i interwencji chirurgicznej (6). Ok. 2-5% wszystkich zmian w nadnerczach stanowią raki nadnercza. Amerykańskie Towarzystwo Nowotworów (American Cancer Society) podaje, że rocznie diagnozowanych jest ponad 200 nowych przypadków raka kory nadnercza. W polskim Krajowym Rejestrze Nowotworów brakuje danych statystycznych dotyczących guzów nadnerczy a ich epidemiologia jest nieoszacowana. Guzami pochodzącymi z rdzenia nadnerczy są pheochromocytoma. Występują one z częstością 2 do 9,1 przypadków zachorowań na milion na rok (7,8). Klinicznie najczęściej manifestują się napadowym nadciśnieniem tętniczym i zaburzeniami rytmu serca (9).

W niniejszej rozprawie doktorskiej materiałem badawczym są poszczególne typy zmian w nadnerczach: rak nadnercza (adrenal cortical cancer - ACC), adenoma, mielolipoma, guz chromochłonny nadnerczy - pheochromocytoma, hiperplazja nadnercza. Wybór wyżej wymienionych guzów uwzględnia wagę znaczenia klinicznego oraz częstotliwość występowania.

1.1.1 Czynniki ryzyka

Jak w większości przypadków chorób wynikających z procesów nowotworzenia tak i w guzach nadnerczy duży wpływ na zachorowalność ma prowadzony przez pacjenta tryb życia. Według danych pochodzących z Krajowego Rejestru Nowotworów, a także Amerykańskiego Towarzystwa Nowotworowego (American Cancer Society) palenie papierosów, konsumpcja alkoholu i innych używek, dieta prowadząca do nadwagi i otyłości, a także brak aktywności fizycznej mogą zwiększać ryzyko występowania guzów, w tym raka nadnercza.

Poza czynnikami ryzyka, na które potencjalnie mamy wpływ istnieją jeszcze czynniki niezależne takie jak predyspozycje genetyczne, a także wiek. Udowodniono, że częstotliwość występowania guzów wzrasta z wiekiem pacjenta. Ponadto w guzach nadnercza opisano występowanie predyspozycji genetycznych i przypadki dziedziczenia rodzinnego. Istnieje kilka

genetycznych zespołów, które predysponują do występowania zmian nowotworowych w obrębie kory nadnercza m.in. zespół: Li- Fraumeni, Beckwith-Wiedemann, Lynch (6,10). Występowanie guza o charakterze pheochromocytoma w rdzeniu nadnerczy warunkowane może być występowaniem zespołu mnogich nowotworów gruczołów dokrewnych typu 2 (MEN2), choroby Von Hippa Lindaua (VHL) lub nerwiakowłókniozości typu 1 (11).

1.1.2 Rak nadnercza (ACC - ang. Adrenocortical carcinoma)

Rak nadnercza rozwija się z kory nadnercza. Jego występowanie jest rzadkie. Szacuje się, że występuje z częstotliwością 0,5- 2 przypadków na milion w skali roku (12). Częściej dotyczy kobiet niż mężczyzn (7).

Rak nadnercza cechuje się wysoką złośliwością i złym rokowaniem. 5 lat od rozpoznania przeżywa nie więcej niż 40 procent chorych (13). Rokowania dotyczące pacjentów z ACC zależą od stopnia zaawansowania choroby i indeksu proliferacji - Ki67. Manifestacja kliniczna wynika z czynności hormonalnej lub wielkości guza oraz obecności przerzutów odległych. Jedynym skutecznym leczeniem raka nadnercza jest całkowita resekcja nowotworu (13). Chemioterapia mitotanem stosowana jest adjuwantowo u pacjentów po resekcji nowotworu oraz u pacjentów z nieoperacyjnymi zmianami. U około 70 procent pacjentów w czasie 3 lat od radykalnej resekcji dochodzi do wznowy choroby. W przypadku braku efektów leczenia stosuje się chemioterapię opartą o pochodne platyny. Jej efekty są jednak niezadawalające. W przypadku rozsiewu choroby, większość pacjentów umiera. Średnia przeżycia dla pacjentów przerzutowych wynosi od 10 do 20 miesięcy (14,15). Głównym czynnikiem prognostycznym w przypadku guzów nadnercza jest ocena stopnia zaawansowania nowotworu za pomocą kwalifikacji TNM (tumor, node, metastasis). Guzy nadnerczy klasyfikowane jako stopień I w skali TNM mają poniżej 5 cm wielkości. Stopień II obejmuje guzy powyżej 5 cm wielkości. W obu przypadkach nie stwierdza się nacieków tkanek sąsiadujących i przerzutów. Zaawansowane guzy naciekające otaczające tkanki lub dające przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych sklasyfikowane są jako stopień III. Stopień IV według skali TNM dotyczy ACC, w którym obecne są przerzuty odległe. Rozpoznanie histopatologiczne najczęściej oparte jest na skali Weiss'a (15). Według danych towarzystwa Europejskiej Sieci do Badań Guzów Nadnerczy (ENSAT, European Network for the Study of Adrenal Tumors) z 2008 roku przeżywalność pięcioletnia u osób ze stopniem I według skali TNM wynosiła około 80 procent, natomiast ze stopniem IV zaawansowania choroby 15 procent (13,15).

U osób dorosłych 50-70 procent przypadków ACC to guzy czynne hormonalnie (14). Najczęściej rak nadnercza wydzielą kortyzol lub/i androgeny. Hyperaldosteronizm w przypadku raka nadnercza jest rzadko obserwowany. W pewnym stopniu aktywność hormonalna guza może posłużyć jako czynnik prognostyczny. Istnieją dane wskazujące na gorszy przebieg choroby w przypadku współistniejącej hyperkortyzolemii (14). W przypadku aktywności hormonalnej guza, hormony produkowane w nadmiarze są bardzo dobrym markerem, pomagającym w wykryciu wznowy i/lub przerzutów. W przypadkach, gdy guz nie ma aktywności wydzielniczej, brak jest charakterystycznych objawów. Pacjenci są zazwyczaj diagnozowani później, w wyższym stopniu zaawansowania klinicznego, co zmniejsza ich szanse na przeżycie (14).

Zachorowalność na ACC zachodzi w każdym przedziale wiekowym. Jednak istnieją dwa wyraźne okresy z wyższą częstotliwością, pierwszy przypada na wczesne dzieciństwo, a drugi w 4-5 dekadzie życia (1). Rak nadnercza występujący w dzieciństwie charakteryzuje się mniejszą agresywnością niż w życiu dorosłym (1).

Podłoże molekularne stanowiące podstawę patogenezy ACC jest niejasne. Dane literaturowe wskazują na częste występowanie nadekspresji genu IGF2 działającego przez IGF1 receptor, IR oraz IGF2 receptor, który pełni istotną rolę w regulacji proliferacji komórek

raka nadnerczy. Nadekspresja IGF2 występuje nawet powyżej 85 procent przypadków ACC. Przyczynia się również do nowotworzenia w Syndromie Beckwith- Wiedemann (16). Ponadto istotną rolę w patogenezie pełnią również dysfunkcje w szlakach sygnalizacji komórkowej genów TP53 oraz Wnt/Beta Katenina (17). Również nadekspresja czynnika transkrypcyjnego SF-1 odpowiedzialnego za proces steroidogenezy stanowi podłoże molekularne dla rozwoju ACC (18).

Od 5 do 10 procent wszystkich raków kory nadnercza związanych jest z występowaniem mutacji w obrębie komórek linii zarodkowej. Najczęściej występującym syndromem genetycznym predysponującym do wystąpienia ACC jest Zespół Li- Fraumeni (ang. Li-Fraumeni syndrome - LFS). Jest on bardzo częsty w przypadku ACC u dzieci, stanowi aż do 80 procent przypadków, u osób dorosłych LFS odpowiada za 2 do 4 procent ACC. U osób z LFS stwierdza się mutację w genie TP53 w lokalizacji 17p3 (10). U dzieci sporadycznie może wystąpić mutacja w genie p53. Jest to wtedy wariant choroby o nietypowych cechach zespołu Li-Fraumeni. W praktyce 10 do 15 razy częściej ACC występuje u dzieci w Południowej Brazylii niż innych częściach świata. Zazwyczaj jest to związane z mutacją pR337H. Pacjenci dotknięci mutacją w genie TP 53 wykazują zwiększoną wrażliwość zachorowania na inne typy nowotworów, np: rak piersi, rak mózgu czy białaczki (19). Drugim zespołem co do częstości występowania jest Zespół Lyncha (ang. Lynch syndrome - LS). Dotyczy on do 3 procent dorosłych i przejawia się mutacjami w genach: MSH2, MLH1, PMS2, MSH2, EPCAM. Kolejną znaczącą mutacją predysponującą do ACC występuje w genie MEN1 i opowiada za manifestację zespołu MEN1- Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. Występuje u 2 procent chorych. Rzadziej spotyka się Zespół Rodzinnej Polipowatości Gruczolakowatej (Familial Adenomatous Polyposis FAP) z mutacją w genie APC. W przypadku Syndromu Beckwith-Wiedemann występuje mutacja w genie IGF2, występuje sporadycznie i głównie u dzieci. Poza mutacjami w linii komórek zarodkowych występują również mutacje powstające de novo i dotyczą one najczęściej genów: TP53, APC i MEN1. Diagnostyka u dzieci z ACC zawsze powinna być prowadzona w kierunku LFS, a u dorosłych dodatkowo powinien być przeprowadzony screening w kierunku LS (10).

1.1.3 Guz chromochłonny - pheochromocytoma

Guz chromochłonny jest rzadko występującym neuroendokrynnym guzem rdzenia nadnerczy. Wywodzi się z komórek chromafinowych i wydziela katecholaminy. W literaturze można spotkać się z określeniem "10 % tumor" w odniesieniu do guza chromochłonnego, ponieważ 10 procent guzów występuje obustronnie, 10 procent wykazuje złośliwość, 10 procent dotyczy dzieci, 10 procent występuje poza nadnerczami pod postacią paragangliomy (5).

Dane literaturowe szacują występowanie guza chromochłonnego jako 2-9,1 przypadków zachorowań na milion na rok (7,8). Od 0,2 do 0,6 procent wszystkich przypadków dotyczy pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (7,20).

Charakterystyczne objawy choroby wynikają z nadmiernej sekrecji katecholamin. Dotyczą one m.in: wzrostu ciśnienia tętniczego, bólu głowy, nudności, uczucia niepokoju, zmian masy ciała (7). Większość z guzów wydzielających katecholaminy to guzy łagodne. W przypadku guza chromochłonnego 10 do 20 procent guzów w zależności od genotypu może wykazywać cechy złośliwości i dawać przerzuty (21). Dla guza chromochłonnego o cechach złośliwości charakterystyczny jest podniesiony poziom dopaminy i wielkość zmiany powyżej 5 cm (7). Diagnostyka guza chromochłonnego opiera się na badaniach biochemicznych i obrazowych z wykorzystaniem metod radiologicznych i nuklearnych. Złoty standard stanowi badanie stężenia metanefryny i normetanefryny w osoczu lub ich dobowego wydzielania z moczem. Celem zobrazowania zmiany wykonywana jest tomografia komputerowa lub rezonans magnetyczny

(22). Małoinwazyjna chirurgia jest główną metodą leczenia z wyboru (7,22). Niezdiagnozowany guz typu pheochromocytoma może prowadzić do dużego wzrostu ciśnienia krwi, zaburzeń rytmu serca, udaru a w konsekwencji do śmierci (20).

Postać dziedziczna dotyczy około 30 procent pacjentów z guzem chromochłonnym. Związana jest ona z występowaniem predyspozycji do powstawania mutacji w różnych genach. Na chwilę obecną podatność na występowanie patologicznych wariantów określono w ponad 12 genach. Niektóre źródła literaturowe podają 20 genów. Głównie mutacje dotyczą genów m.in., RET, VHL, NF1, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2, MAX, TMEM127. Najczęściej pojawiają się mutacje w genie SDHB. U pacjentów mogą wystąpić również syndromy skorelowane z mutacjami takie jak: mnoga gruczolakowatość wewnątrzwydzielnicza typu 2, choroba von Hippel- Lindau, neurofibromatoza typu 1, paraganglioma typ 1-5 (21–24).

1.1.4 Gruczolak nadnerczy - Adenoma

Gruczolak nadnercza jest nowotworem łagodnym, wywodzącym się z kory nadnerczy.

Adenoma jest najczęściej występującym nowotworem spośród guzów nadnerczy. Częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem pacjenta (5). Dla osób w przedziale wiekowym pomiędzy 20, a 29 rokiem życia występowanie adenoma szacowane jest w przedziale 0,14%. Natomiast w grupie osób powyżej 70 lat występowanie gruczolaka nadnerczy wzrasta i stanowi 7% wszystkich przypadków (25). Większość przypadków występowania gruczolaków w obrębie kory nadnerczy wykrywana jest przypadkowo, podczas badań obrazowych pacjenta poddanego diagnostyce z innych wskazań zdrowotnych. Metody obrazowe wykorzystywane w rutynowej diagnostyce pomagają w określeniu wielkości gruczolaków, która mieści się w przedziale od 1 do 5 cm. Ich struktura stanowi masę homogeną (5,25). Około 70 procent przypadków to guzy bogate w komórki, które są wypełnione kroplami lipidowymi. Z klinicznego punktu widzenia adenoma kory nadnercza może funkcjonować jako guz wydzielający hormony lub niewydzielający. W przypadku guzów wydzielających spotykamy te, które produkują: aldosteron, kortyzol oraz androgeny lub estrogeny (25–27). Patogeneza powstawania zmian nie jest w całości poznana. W 2011 roku za pomocą metody sekwencjonowania eksonów odkryto mutację KCNJ5 w 24 przypadkach adenoma produkujących aldosteron. W kolejnych latach wykryto inne mutacje charakterystyczne dla adenomy produkującej aldosteron: ATP1A1, CACBA1D, ATP2B3, CTNNB1. Mutacja w genie CTNNB odpowiedzialna jest za działanie ścieżki sygnałnej Wnt/beta-Catenin (28). W przypadku adenoma produkującego kortyzol może występować mutacja w genie PRKACA. Natomiast dla adenoma niewydzielającego hormonów charakterystyczna jest mutacja w genie CTNNB1 (26).

1.1.5 Mielolipoma

Jest to łagodny guz kory nadnerczy. Zbudowany jest z tkanki tłuszczowej i hematopoetycznej- mieloidalnej. Przeważnie jest diagnozowany w sposób przypadkowy. Stanowi od 6% do 16 % wszystkich guzów nadnerczy wykrywanych za pomocą tomografii komputerowej. W ostatnich 10 latach zauważono tendencję wzrostową dotyczącą wykrywalności mielolipoma (29,30). Mielolipoma występuje w równym stopniu u kobiet i mężczyzn. Szczyt występowania szacuje się od 50 do 70 roku życia. Zazwyczaj zmiana dotyczy jednego nadnercza jednak może występować jako dodatkowy guz, lokalizując się w innych narządach, np., w: gardle, wątrobie, śledzionie, nerkach, jamie nosowej, jamie brzusznej, śródpiersiu, a nawet w oku (31).

Mielolipoma ma kształt okrągły lub elipsoidalny. Może osiągać rozmiary od kilku milimetrów do kilkunastu centymetrów. Średni rozmiar guza wynosi około 10 cm (29).

Zdarzają się guzy mielolipoma znacznie większe osiągające średnicę 40 cm. Z występowaniem olbrzymich guzów mielolipoma związane jest ryzyko spontanicznego występowania krwotoków zaotrzewnowych (30). Mielolipoma są to guzy nieaktywne hormonalnie. Jednak, w sporadycznych przypadkach współistnieją razem z innymi zaburzeniami endokrynologicznymi, np., zespół Cushinga, pierwotny aldosteronizm, pheochromocytoma, wrodzony przerost nadnerczy (29–31). Patogeneza powstawania guza jest niejasna. Istnieją różne teorie wskazujące na potencjalne przyczyny patogenezy w kierunku mielolipoma. Jedną z hipotez mówi o pojawieniu się metaplastycznych zmian w komórkach endotelium naczyń włosowatych, w skutek działania czynników takich jak: stres, nekroza, infekcje. Kolejną hipoteza zakłada, że mielolipoma jest konsekwencją obecności translokacji chromosomowej (3:31) (q25; p11). Dalej pojawia się informacja o klonalnym pochodzeniu choroby, związanym z obecnością losowo inaktywowanego chromosomu X. Dopuszcza się również teorię, wskazującą wspólny udział mezenchymalnych komórek macierzystych i stymulacji hormonalnej w patogenezie mielolipoma (29,31).

1.1.6 Przerost nadnerczy - hiperplazja

Z punktu widzenia onkologicznego hiperplazja gruczołów nadnerczowych należy do łagodnych schorzeń kory nadnercza, jednakże w aspekcie czynnościowym może stanowić zagrożenie. Hiperplazja polega na powiększeniu lub przeroście kory nadnercza. Zazwyczaj występuje obustronnie, z zachowaniem kształtu gruczołu. Ze względu na patogenezę wyróżnia się dwie grupy: wrodzoną hiperplazję kory nadnerczy oraz niewrodzoną hiperplazję nadnerczy zależną od ACTH lub niezależną od ACTH (32).

Wrodzona hiperplazja nadnerczy (ang. congenital adrenal hyperplasia CAH) to choroba genetyczna, dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. Charakteryzuje się niedoborem glikokortykosteroidów i mineralokortykosteroidów, który wynika z deficytu enzymów biorących udział w jego syntezie. Konsekwencją tego zjawiska jest nadmierne wydzielanie ACTH, przyczyniające się do przerostu kory nadnerczy (33). Ponad 90 procent wszystkich przypadków CAH związanych jest z niedoborem enzymu 21-hydroxylazy (CYP 21A2). Gen CYP21A2 jest kodowany na chromosomie 6p.31. Ze względu na stopień mutacji genu wyróżniamy dwa podtypy niedoboru CYP21A2: klasyczny i nieklasyczny. Klasyczny niedobór enzymu spowodowany jest mutacją typu nonsens lub zmianą ramki odczytu. Może wystąpić również przez konwersję genu albo całkowitą delecję genu. Manifestacja klasycznego niedoboru objawia się całkowitym brakiem enzymu, a w konsekwencji brakiem syntezy hormonów glikokortykoidowych i mineralokortykoidowych oraz nadmiernym wydzielaniem hormonów androgenowych. Nieklasyczny niedobór enzymu jest łagodniejszą postacią choroby. Allele genu produkują enzym, który jest zdolny do syntezy ograniczonej ilości glikokortykoidów i mineralokortykoidów. Pozostała część przypadków CAH jest wynikiem niedoborów innych enzymów biorących udział w syntezie hormonów steroidowych, takich jak: 11 β -hydroksylaza (CYP11B1), dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa (3 β HSD), 17 α -hydroksylaza (CYP 17A1) (33,34). Wrodzona hiperplazja nadnerczy dotyczy zarówno kobiety, jak i mężczyzn. Występowanie klasycznej postaci szacuje się jako 1 przypadek na 14000 urodzeń. Natomiast postać nieklasyczna obejmuje 1 przypadek na 1000 (34).

Jedną z przyczyn niewrodzonego przerostu kory nadnerczy może być zespół Cushinga spowodowany nadmiernym wydzielaniem ACTH przez przysadkę (32,33). Inną przyczyną niewrodzonej postaci przerostu kory nadnerczy jest ektopowe wydzielanie ACTH. Powoduje ono do 15 procent zależnych od ACTH hiperplazji gruczołu, a wywodzi się między innymi z procesów paraneoplastycznych. Guzy neuroendokrynne płuc takie jak: rakowiak płuc i drobnokomórkowy rak płuc najczęściej predysponują do ektopowego wydzielania ACTH.

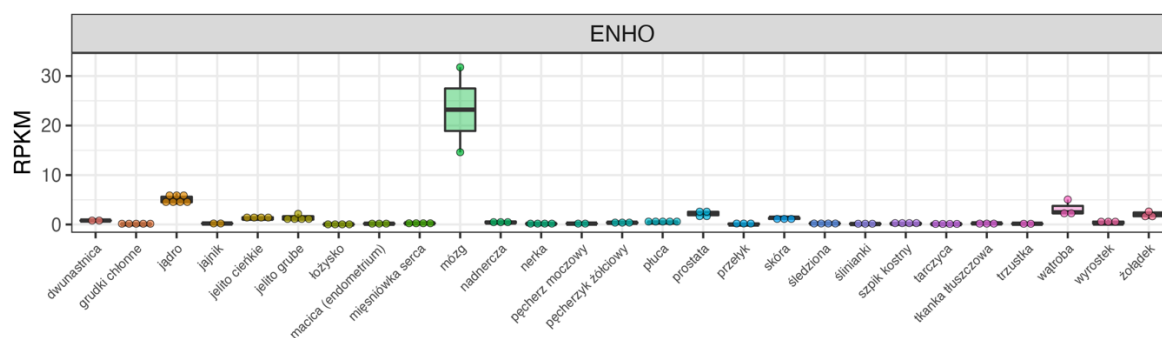
Ponad to innym ektopowym źródłem ACTH są neuroendokrynne guzy grasicy, trzustki, jelita, a także rak rdzenia tarczycy czy pheochromocytoma (32).

Obustronny przerost nadnerczy o charakterze idiopatycznym jest najczęstszą przyczyną hyperaldosteronizmu pierwotnego. Wynika on z rozlanej hiperplazji komórek kory nadnerczy produkujących aldosteron (35). Rzadziej obserwowana jest postać rodzinna, której przyczyną jest mutacja hybrydowa genu *CYP11B2* i genu *CYP 11B1*, prowadząca do „hyperaldosteronizmu poddającego się leczeniu glikokortkosteroidami”. Równie rzadką postacią pierwotnego hyperaldosteronizmu jest jednostronny przerost kory nadnerczy.

1.2 Adropina i jej receptor

1.2.1 Adropina - podstawowe informacje

Adropina jest hormonem peptydowym odkrytym w 2008 roku przez zespół amerykańskich naukowców kierowany przez K. Gensha Kumara (36). Peptyd został zidentyfikowany w trakcie badań nad mysim modelem otyłości. Do odkrycia posłużyła analiza ekspresji genów wątroby myszy za pomocą mikromacierzy tkankowej (36). Nazwa peptydu pochodzi od łacińskich słów *adura*; *pinqis*, co oznacza spalanie tłuszczu, oleju (37). Peptyd kodowany jest przez gen Energy Homeostasis Associated Gen (ENHO), zbudowany z dwóch eksonów. Według danych RNA-seq zdeponowanych w bazie NCBI, ekspresja genu ENHO jest najwyższa w mózgu oraz wątrobie, co potwierdzone zostało w innych publikacjach (38). Ponadto ekspresja adropiny występuje również m.in., w trzustce, nerkach, sercu, jelicie cienkim (39). Według danych RNA-seq niewielka ekspresja genu ENHO jest mierzalna w prawidłowych nadnerczach. Przyjmuje się że krążąca adropina pochodzi głównie z wątroby (40). Standardowe stężenie adropiny we krwi według różnych źródeł wynosi: 3,4-4,5 ng/ml do 10 ng/ml (41,42). Gen ENHO zlokalizowany jest w chromosomie 9, na jego krótkim ramieniu, w regionie 1, w prążku 3, w subprążku 3 (9p13.3).

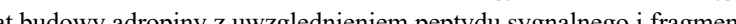


Rycina 1. Dane pochodzące z bazy RNA-seq przedstawiające ekspresję genu ENHO w różnych narządach człowieka.

Źródło: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=37570> (opracowanie własne).

Adropina zbudowana jest z 76 aminokwasów, z których pierwsze 33 aminokwasy stanowią peptyd sygnałny odcinany podczas sekrecji. Natomiast aminokwasy 34-76 są fragmentem bioaktywnym. Sekwencja aminokwasów wykazuje bardzo wysoką homologię

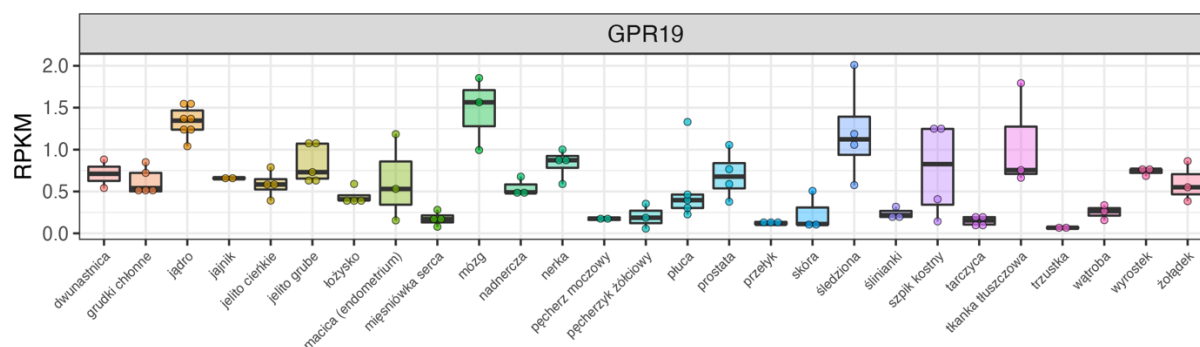
(1) 1999 年 1 月 1 日以前



0 1 1 0 1 1 0

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 277: 1039-1043.

[illegible]



Rycina 4. Dane pochodzące z bazy RNA-seq przedstawiające ekspresję genu GPR19 w różnych narządach człowieka. Źródło: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2842/?report=expression> (opracowanie własne).

1.2.3 Biologiczna rola adropiny

Według dostępnego piśmiennictwa adropina pełni znaczącą rolę w utrzymaniu homeostazy metabolicznej organizmu poprzez szereg pełnionych funkcji. Między innymi możemy wyróżnić:

Wpływ adropiny na endotelium (śródbłonek naczyń)

Śródbłonek naczyniowy wydziela czynniki aktywne biologicznie, które biorą udział m.in. w regulacji napięcia ścian naczyń krwionośnych. Utrzymanie równowagi pomiędzy czynnikami mającymi wpływ na rozszerzanie ścian naczyń, a czynnikami zwężającymi to jeden z podstawowych warunków homeostazy naczyniowej. Głównym wazodilatorem produkowanym przez komórki śródbłonka jest tlenek azotu (NO) (39). Powstaje on z prekursorowej cząsteczki α -argininy, tlenu cząsteczkowego oraz komórkowego czynnika redukcyjnego przy udziale enzymu syntazy tlenu azotu (eNOS). Tlenek azotu wpływa rozkurczająco na naczynia krwionośne, działa przeciwzakrzepowo, antyoksydacyjnie poprzez zahamowanie utleniania lipoprotein, a także bierze udział w postnatalnej angiogenezie (48).

Adropina jest jednym z czynników, który wywiera pozytywny wpływ na funkcje śródbłonka. Zwiększa ekspresję syntazy tlenu azotu powodując m.in., stymulację wydzielania NO przez komórki endotelialne. Dochodzi do tego poprzez aktywację kinazy białkowej B (Akt), kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz kinaz ERK1/2 (40). Rola adropiny polega na ochronnym wpływie na śródbłonek naczyniowy i jego funkcje. Deficyt adropiny powoduje redukcję biodostępności NO i dalsze konsekwencje tego zjawiska (49).

Rola adropiny w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu. Regulacja węglowodanów i lipidów.

Badania prowadzone przez Kumara i jego zespół dowiodły, że ekspresja genu ENHO w wątrobie jest zależna od diety. Ustalono, że poziom adropiny w organizmie regulowany jest poprzez podaż pokarmu. Wzrost stężenia hormonu peptydowego zależy od wysokiego poziomu tłuszczu w diecie. Myszy karmione dietą bogatą w tłuszcz, a ubogą w węglowodany mają wyższy poziom adropiny w surowicy niż myszy z dietą odwrotną. W przypadku myszy z indukowaną otyłością nadekspresja adropiny lub jej ogólnoustrojowa podaż redukuje stłuszczenie wątroby i oporność na insulinę (36). W badaniach z myszami pozbawionymi genu adropiny (AdrKO) w przypadku podaży normalnej diety zaobserwowano wzrost otyłości wśród

osobników. Dodatkowo myszy prezentowały fenotyp z dyslipidemią manifestującą się wzrostem produkcji triglicerydów, zaburzeniami w endogennej syntezie glukozy, w rezultacie oporność na insulinę (50). Dodatkowo za rolę adropiny w gospodarce lipidowo-węglowodanowej może przemawiać fakt, że ekspresja mRNA ENHO jest regulowana w wątrobie przez receptor LXR α zaangażowany w metabolizm cholesterolu i triglicerydów (51).

Potencjalna rola w Centralnym Układzie Nerwowym

Znaczenie adropiny dla centralnego układu nerwowego można dostrzec już na poziomie jego rozwoju, ponieważ omawiany peptyd aktywując ścieżkę sygnałną NB3/Notch wpływa na rozwój mózdzku (52). Badania na zwierzętach wykazały, że za pomocą tej samej ścieżki sygnałnej adropina reguluje koordynację ruchową i aktywność lokomotoryczną (53). Wcześniej wspomniano, że adropina wpływa na regulację receptora VEGFR2 wykorzystując do tego ścieżkę sygnałną PI3K oraz ERK1/2. Doniesienia literaturowe prezentują informacje o tym, że gen VEGF kodujący wyżej wymieniony receptor zaangażowany jest w neurogenezę i spełnia również funkcje neuroochronne (54). W tym miejscu rola adropiny w centralnym układzie nerwowym zazębia się z rolą jaką adropina wywiera na śródbłonek naczyniowy. Ekspresja NOS i biodostępność NO indukowana adropiną powoduje migrację i proliferację komórek śródbłonna, co przyczynia się do powstawania nowych naczyń (48). Co za tym idzie zwiększa się przepływ krwi mózgowej i zapobiega niedociśnieniu indukowanym stresem i reakcją zapalną (55).

1.3 Fizjologia nadnerczy

1.3.1 Nadnercza- podstawowe informacje

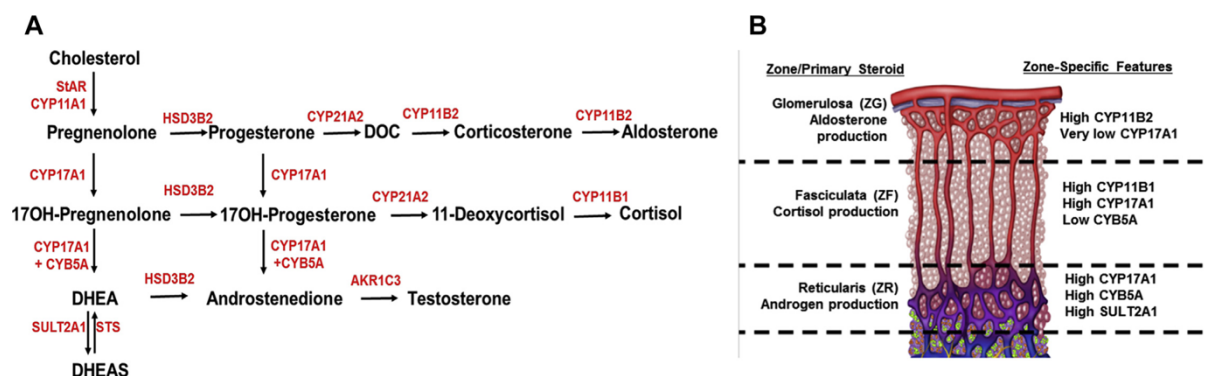
Gruzoły nadnerczowe człowieka znajdują się w przestrzeni zaotrzewnowej, nad górnymi biegunami nerek i są otoczone przez okołonerkową tkankę tłuszczową. Mają nieregularny kształt. Nadnercze położone po lewej stronie jest większe niż prawe i ma kształt półksiężyca. Natomiast prawe nadnercze jest kształtu piramidalnego (56). Długość gruczołu wynosi 2,5-5cm, a łączna masa 10- 15 gramów (57). Nadnercze zbudowane jest z kory i wewnątrznie położonego rdzenia, a całość otoczona jest łącznotkankową torebką. Kora nadnerczy dorosłego człowieka posiada trzy strefy. W zależności od rodzaju występujących w nich komórek nabłonkowo-wydzielniczych wyróżniamy: strefę kłębkową (*zona glomerulosa*, zG), strefę pasmową (*zona fasciculata*, zF) oraz strefę siatkową (*zona reticularis*, zR) (58). Rdzeń zbudowany jest z pojedynczych komórek zwojowych oraz dużych, owalnych komórek neurosekrecyjnych zawierających ziarnistości. Ze względu na swoje właściwości chemiczne komórki rdzenia nazywane są chromochłonnymi. Pod względem pochodzenia istnieją różnice pomiędzy korą gruczołów, a rdzeniem. Kora wywodzi się z mezodermy. Rdzeń natomiast z neuroektodermalnych komórek grzebieni nerwowych (59). Torebka gruczołu rozwija się z komórek mezenchymalnych (58,59).

Nadnercza wydzielają hormony, które mają istotne znaczenie dla homeostazy organizmu. Szerokie spektrum działania tych substancji powoduje, że nadnercza są odpowiedzialne za wiele procesów fizjologicznych zachodzących w organizmie człowieka. Zarówno kora, jak i rdzeń wydzielają hormony biorące udział w podstawowym metabolizmie komórek (59). Kora odpowiada za syntezę hormonów steroidowych, natomiast rdzeń produkuje katecholaminy. Strefa kłębkowa kory nadnercza produkuje mineralokortykoidy, m.in. aldosteron, regulowany przez układ renina -angiotensyna. Strefa pasmowa glikokortykoidy stymulowane przez ACTH, a strefa siateczkowata odpowiada za produkcję androgenów (60).

1.3.2 Steroidogeneza

W procesie steroidogenezy powstają grupy hormonów steroidowych: glikokortykoidy (kortyzol, kortykosteron), mineralokortykoidy (aldosteron), androgeny (testosteron, dehydroepiandrosteron), estrogeny (estradiol), progestageny (progesteron) oraz sterol, aktywna, hormonalna postać witaminy D- kalcyferol (1,25-dihydroksy-witamina D). Glikokortykoidy i mineralokortykoidy syntezowane są w korze nadnerczy. Androgeny mogą powstawać zarówno w korze nadnerczy, jak i w gonadach. Gonady są również miejscem produkcji progestagenów. Natomiast kalcyferol powstaje w skórze, a następnie jest poddawany hydroksylacji w wątrobie i nerkach. Niezależnie od miejsca syntezy, prekursorem dla powstania wyżej wymienionych grup hormonów steroidowych jest cholesterol (61). W niniejszej pracy przedmiotem zainteresowania jest proces steroidogenezy hormonów kory nadnerczy. Cholesterol to związek organiczny, którego budowa oparta jest na szkielecie cyklopentanoperhydrofenantrenu. Wyjściowo związek prekursorowy dla procesu steroidogenezy posiada 27 atomów węgla. Są one zorganizowane w jeden pierścień cyklopentanu i trzy pierścienie cykloheksanu. W trakcie procesu struktura związku ulega różnym przekształceniom, prowadząc do powstania związków pochodnych o określonej ilości atomów. Mineralokortykoidy oraz glikokortykoidy składają się z 21 atomów węgla, a androgeny z 19 atomów węgla (62,63). Istnieją różne drogi prowadzące do powstania cholesterolu. Produkowany może być *de novo*, z wykorzystaniem acetylo-CoA i kompleksów szlaków, w retikulum endoplazmatycznym, odpowiedzialnych za steroidogenezę. Wersją alternatywną powstawania cholesterolu jest wychwyt krążących lipoprotein. Jest to najbardziej powszechna droga wykorzystywana w procesach steroidogenezy, a głównym źródłem cholesterolu są lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL). Obecność cholesterolu w nadnerczach, w postaci wolnej- niezestryfikowanej regulowana jest za pomocą ACTH (61). Biosynteza steroidów nadnerczowych zapoczątkowana jest w mitochondriach, dzięki oksydacyjnym enzymom CYP (P450). Zakres działania enzymów dotyczy pierścieni węglowych, gdzie poprzez modyfikacje łańcucha dochodzi do powstania różnych grup hormonów steroidowych. Dostępność cholesterolu do mitochondrium podlega regulacji enzymatycznej. Enzym StAR (steroidogenic acute regulatory protein) umożliwia transport cholesterolu z mitochondrialnej błony zewnętrznej do wewnętrznej, w konsekwencji czego powstaje pregnenolon (61,62). Pregnenolon jest związkiem wyjściowym dla wszystkich hormonów steroidowych. Powstaje przy udziale CYP11A1 (P450_{scc}) przez odsczczenie bocznego łańcucha cholesterolu. Następnie jest transportowany do gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER). Przy pomocy CYP17 (17 α -hydroksylazy) w strefie pasmowej powstaje 17-OH pregnenolon. Dalej, w wyżej wymienionej strefie 17-OH pregnenolon pod wpływem dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej (3 β HSD) ulega konwersji w 17-OH progesteron. Natomiast w strefie kłębkowatej (zG) pregnenolon pod wpływem 3 β HSD ulega przemianie w progesteron. CYP21 (21- hydroksylaza) jest enzymem, który działając dalej w obszarze siateczki śródplazmatycznej gładkiej, bierze udział w przekształceniu 17-OH progesteronu do 11- deoksykortyzolu, i progesteronu 11-deokortykosteronu. Produkty powstałe w trakcie procesu transportowane są do wewnętrznej błony mitochondrium. W warstwie pasmowej 11-deoksykortyzol, pod wpływem CYP11B1 (11 β -hydroksylaza), ulega konwersji w kortyzol. Natomiast w strefie kłębkowatej wykazującej ekspresję CYP11B2, z 11- deoksykortykosteronu powstaje aldosteron (56,61,62). Otrzymany we wcześniejszych przemianach 17-OH pregnenolon lub 17-OH progesteron wykorzystywany jest do wytworzenia androgenów. Pod wpływem 3 β HSD 17-OH pregnenolon może ulegać przemianie w 17- OH progesteron lub w dehydroepiandrosteron za pomocą CYP17 i Cytb5. W kolejnym etapie powstawania androgenów dochodzi do konwersji dehydroepiandrosteronu w androstendion z pomocą 3 β HSD lub wykorzystywany zostaje 17-OH progesteron. Reakcja wykorzystująca 17-OH progesteron jako bezpośredni

substrat do wytworzenia androstendionu jest wspomagana przez specjalne enzymy: CYP17 i Cytb5. Końcowym etapem jest powstanie testosteronu z androstendionu katalizowanego przez 17 β HSD (17 β - dehydrogenaz hydroksysteroidowa) (56).



Rycina 5. Uproszczony schemat steroidogenezy oraz prezentacja enzymów występujących w poszczególnych warstwach kory nadnerczy. Źródło: Turcu & Auchus 2018.

2 Założenia i cel pracy

Badania ostatnich lat wykazały, że szereg aktywnych peptydów biorących udział w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu uczestniczy w regulacji osi podwzgórzowo-przysadkowo- nadnerczowej (oś HPA) lub też bezpośrednio wpływa na aktywność nadnerczy. Do grupy tych peptydów zaliczamy m.in. adiponektynę, oreksynę, leptynę, ghrelinę (4,64–66). Peptydy te często na drodze auto/parakrynowej wpływają na proliferację komórek nadnerczy. W związku z czym mogą one pełnić istotną funkcję w patogenezie guzów nadnerczy. Na podstawie przedstawionych we „Wstępie” informacji można założyć hipotezę, wpisującą adropinę w szereg aktywnych peptydów wpływających na aktywność nadnerczy.

Głównym celem badawczym rozprawy doktorskiej jest wykazanie czy adropina oraz jej receptor pełnią istotną rolę w patogenezie poszczególnych typów guzów nadnerczy. Weryfikacja głównego celu badawczego zostanie przeprowadzona poprzez realizację następujących szczegółowych celów badawczych:

1. Porównanie ekspresji genu kodującego adropinę (ENHO) oraz jej receptora (GPR19) w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy (metoda qPCR).
2. Porównanie stężenia adropiny w surowicy krwi pacjentów z różnymi typami guzów nadnerczy w odniesieniu do grupy zdrowych osób (kontrola) (metoda ELISA).
3. Określenie czy istnieje zależność między ekspresją nadnerczową adropiny oraz jej stężeniem w surowicy krwi (metody korelacji danych liczbowych).
4. Zbadanie zależności między zbadaną ekspresją/stężeniem wydzielonej adropiny, a zebranymi danymi klinicznymi m.in. BMI, glukoza, HDL, LDL, TG (metody korelacji danych liczbowych).
5. Określenie bezpośredniego udziału adropiny w regulacji proliferacji komórek nowotworowych nadnerczy w systemie *in vitro* (hodowle HAC15 – RTCA).
6. Określenie roli adropiny w regulacji podstawowych funkcji fizjologicznych komórek kory nadnerczy (tj. wydzielanie mineralokortykoidów i glukokortykoidów).
7. Zbadanie czy podwyższona ekspresja genu adropiny oraz jej receptora stanowi wykładnik rokowniczy określony czasem przeżycia pacjentów (analiza danych TCGA, krzywe przeżycia Kaplana-Meiera)

3 Materiały i metody

3.1 Materiał kliniczny

Przedstawione badania, w realizowanej rozprawie doktorskiej, uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu: Uchwała 725/18 z dnia 14 czerwca 2018 r.

Wszyscy pacjenci biorący udział w badaniach, zostali poinformowani o przebiegu i zasadności projektu oraz związanych z nim procedurach. Zgoda na udział w projekcie została wyrażona w sposób pisemny.

3.1.1 Skrawki nadnerczy

Materiał kliniczny przeznaczony do badań stanowiło 120 prób. Pochodził od 105 pacjentów poddanych zabiegowi adrenalektomii, w Szpitalu Klinicznym im. Heliodora Święcickiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wyżej wymienieni pacjenci zostali zakwalifikowani do zabiegu usunięcia nadnercza ze względu na podejrzenie złośliwości guza lub ze względu na nadmierne wydzielanie hormonów. Ponadto włączenie pacjentów do badania określone było poprzez kryteria takie jak: wiek powyżej 18 lat, brak potwierdzonych innych nowotworów, brak aktywnej infekcji wirusowej, dobry stan sprawności pacjenta w skali ECOG według Eastern Cooperative Oncology Group.

Przed zabiegiem adrenalektomii wykonana została standardowa procedura obejmująca badanie fizykalne, badania laboratoryjne oraz obrazowe- tomografia komputerowa. Podczas zabiegu, z usuniętego nadnercza pobrano skrawki patologicznych zmian. Skrawki w rozmiarze około 0,5 centymetra sześciennego zatopiono w RNALater Tissue Storage Reagent firmy Sigma- Aldrich. Następnie wyżej wymieniony materiał poddany został głębokiemu mrożeniu w – 70 °C, w celu zabezpieczenia i przechowania do dalszych działań związanych z procesem badawczym. Usunięte nadnercza poddane zostały diagnostyce histopatologicznej.

Z ogólnej liczby 105 guzów wyodrębniono: 41 przypadków adenoma, 13 przypadków carcinoma, 16 przypadków hiperplazja, 25 przypadków pheochromocytoma oraz 10 przypadków mielolipoma. Grupa kontrolna została utworzona ze skrawków 15 prawidłowych nadnerczy pochodzących od 15 dawców nerek. Materiał tkankowy został opracowany według takiej samej procedury, jak w przypadku grupy badanej.

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna grupy badanej, której materiał tkankowy został wykorzystany w badaniach. Uwzględniony podział na grupy: adenoma, carcinoma, hiperplasia, mielolipoma, pheochromocytoma. Dane jakościowe zostały przedstawione jako liczba obserwacji w danej kategorii (N), Natomiast dane ilościowe jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (IQR). Dla danych ilościowych zastosowano test chi-kwadrat. Do danych ilościowych zastosowano test Kruskala-Wallisa z post hoc testem sumy rang Wilcozona. Małe litery reprezentują wynik testu post hoc, w którym grupy istotnie różniące się od siebie posiadają odmienne litery.

opis	Adenoma	Carcinoma	Hyperplasia	Mielolipoma	Pheochromocytoma
Wiek	N=(41), 61 [49-66]	N=(12), 59 [44.75-71]	N=(15), 62 [59-68]	N=(8), 47.5 [38.25-52]	N=(25), 56 [48-62]
Płeć N=(K/M)	33/8	9/3	10/6	3/7	15/10
Guz [mm]	N=(41), 35 [21-43]a	N=(13), 97 [82-170]b	N=(14), 25 [15-41]a	N=(10), 67.5 [50.5-102]b	N=(25), 42 [35-65]c
glukoza [mg/dl]	N=(25), 95 [86-108]	N=(13), 94 [86-108]	N=(10), 121 [101.75-156]	N=(5), 89 [86-96]	N=(18), 98.5 [91.25-115]
DHEAS [μg/dl]	N=(24), 35.5 [23.75-78]a	N=(13), 314 [51-714]b	N=(7), 108 [58-118]ab	N=(2), 161 [154.5-168]b	N=(18), 115 [76.57-208]b
ACTH [pg/ml]	N=(24), 6.08 [2.64-13]a	N=(12), 25.09 [1.98-48]b	N=(8), 19.59 [10.26-48]b	N=(2), 383.26 [203.7-563]b	N=(18), 26.87 [20.45-47]b
kortyzol 08 00 [nmol/l]	N=(24), 478.5 [428.75-571]	N=(12), 495 [373-649]	N=(9), 709 [660-795]	N=(4), 534 [399.5-911]	N=(19), 465 [439.5-633]
kortyzol 23 00 [nmol/l]	N=(24), 274 [143.25-354]a	N=(12), 346 [148-508]a	N=(7), 397 [284-645]a	N=(5), 444 [305-601]a	N=(19), 115 [79-149]b
TSH [μU/ml]	N=(25), 1.6 [0.9-2]	N=(13), 1.6 [0.83-2]	N=(10), 1.04 [0.95-1]	N=(5), 1.63 [1.26-2]	N=(19), 1.53 [1.35-2]
ft3 [pmol/l]	N=(22), 4.34 [4.02-5]	N=(13), 4.13 [3.73-5]	N=(8), 4.52 [4.04-5]	N=(3), 5 [4.83-7]	N=(18), 4.62 [4.02-5]
ft4 [pmol/l]	N=(25), 15.69 [13.01-17]	N=(13), 16.34 [15.1-17]	N=(9), 16.31 [14.64-18]	N=(4), 19.48 [17.12-21]	N=(19), 16.24 [15.55-19]
ARO spoczynek [ng/ml/godz]	N=(8), 0.16 [0.09-1]	N=(3), 0.76 [0.64-1]	N=(5), 0.1 [0.08-5]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(7), 0.6 [0.1-1]
Aldosteron spoczynek [pg/ml]	N=(8), 158 [30-186]	N=(3), 255 [189-914]	N=(5), 106 [89-257]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(8), 65.5 [57-228]
Aro pionizacja [ng/ml/godz]	N=(7), 0.14 [0.11-1]	N=(1), 0.2 [0.2-0]	N=(4), 12.59 [0.11-25]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(4), 0.43 [0.28-1]
Aldosteron pionizacja [pg/ml]	N=(7), 141 [51-188]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(4), 174.5 [73-367]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(5), 126 [123-128]
TC [mg/dl]	N=(21), 236 [216-258]a	N=(11), 165 [139.5-195]b	N=(9), 169 [162-190]b	N=(3), 161 [156.5-195]b	N=(17), 200 [173-222]b
TG [mg/dl]	N=(20), 151 [81.75-247]	N=(10), 104.5 [82-129]	N=(9), 148 [93-150]	N=(3), 109 [108-125]	N=(16), 114 [96.5-168]
HDL [mg/dl]	N=(21), 65 [49-90]	N=(10), 45.5 [38.5-61]	N=(9), 56 [50-65]	N=(3), 43 [41.5-50]	N=(16), 62 [49-75]
LDL [mg/dl]	N=(19), 127.2 [107.2-148]	N=(10), 87 [64.7-125]	N=(8), 96.5 [80.25-134]	N=(3), 92.8 [90-121]	N=(16), 111.6 [89.8-126]
AFP [IU/ml]	N=(10), 2.78 [1.56-3]	N=(4), 2.96 [2.66-3]	N=(5), 2.4 [1.83-4]	N=(1), 1.59 [1.59-2]	N=(13), 2.4 [1.66-4]
CEA [ng/ml]	N=(10), 2.92 [1.71-4]	N=(6), 1.96 [1.18-3]	N=(5), 2.02 [0.87-8]	N=(2), 0.66 [0.43-1]	N=(12), 1.46 [0.8-2]
Androstendion [ng/ml]	N=(5), 3.4 [2.25-4]	N=(11), 8.55 [1.29-9]	N=(3), 3.89 [3.83-4]	N=(1), 1 [1-1]	N=(8), 3.18 [2.62-4]
Ca 125 [U/ml]	N=(8), 13 [12-20]	N=(4), 17 [11.5-23]	N=(2), 12 [12-12]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(3), 15 [13-34]
OB [mm/godz]	N=(20), 11.5 [7-22]	N=(10), 19.5 [5.25-52]	N=(7), 12 [7-15]	N=(4), 5 [3.25-7]	N=(15), 14 [6-18]
DZM kortyzol wydalanie [nmol/24h]	N=(22), 182.5 [119.25-386]	N=(8), 189 [148.5-1390]	N=(4), 297.38 [230.31-335]	N=(2), 394.5 [299.75-489]	N=(13), 213 [108-242]
DZM kortyzol stężenie [nmol/l]	N=(21), 122 [94-391]	N=(8), 193 [154.5-742]	N=(4), 290.95 [95.68-478]	N=(2), 380.5 [292.75-468]	N=(13), 158 [62-284]
17 OH progesteron [ng/ml]	N=(1), 3.09 [3.09-3]	N=(3), 3.28 [2.22-6]	N=(2), 0.82 [0.82-1]	N=(1), 20 [20-20]	N=(1), 3.28 [3.28-3]

test z 1 mg [nmol/l]	N=(14), 420 [124.75-639]	N=(8), 464 [40.25-697]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(2), 21 [21-21]
testosteron [nmol/l]	N=(7), 2.2 [0.55-4]	N=(12), 7.26 [0.6-15]	N=(3), 7.8 [4.8-8]	N=(3), 15.8 [13.05-18]	N=(6), 13.15 [10.2-16]
Na [mmol/l]	N=(30), 140 [139-142]	N=(12), 142 [139-143]	N=(11), 141 [140-142]	N=(5), 140 [140-141]	N=(19), 140 [139.5-142]
K [mmol/l]	N=(30), 4.34 [4.04-5]ab	N=(12), 4.45 [4.28-5]a	N=(11), 4 [3.46-4]b	N=(5), 4.02 [3.73-4]b	N=(19), 4.67 [4.19-5]a

Tabela 2. Czynność hormonalna guza u pacjentów, od których wykorzystano materiał tkankowy. Uwzględniono grupy carcinoma i adenoma.

	carcinoma	adenoma
nieczynny	3	17
czynny łącznie:	8	10
• kortyzol	1	9
• aldosteron	2	0
• kortyzol, aldosteron	5	1
brak danych	2	14

3.1.2 Surowica krwi

Od pacjentów z różnymi typami guzów nadnerczy została pobrana krew, celem oceny stężenia adropiny i innych wybranych parametrów laboratoryjnych. Krew pobrano do próbek bez antykoagulantu. Następnie odstawiono na 30 minut. Dalej, poddano wirowaniu w czasie 5 minut przy 4000 obrotów na minutę. Następnie odciągnięto surowicę do nowych, czystych próbek. Po wyżej wymienionych czynnościach surowica została zamrożona w 70 °C, do czasu wykonania oznaczeń.

Szczegółowe informacje dotyczące wykorzystanego materiału biologicznego zawarte zostało przy omówieniu poszczególnych metod z jego zastosowaniem.

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna grup badanych, których surowica krwi została wykorzystany w badaniach. Uwzględniony podział na grupy: adenoma, carcinoma, hiperplasia, mielolipoma, pheochromocytoma. Dane jakościowe zostały przedstawione jako liczba obserwacji w danej kategorii (N), Natomiast dane ilościowe jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (IQR). Dla danych ilościowych zastosowano test chi-kwadrat. Do danych ilościowych zastosowano test Kruskala-Wallisa z post hoc testem sumy rang Wilcozona. Małe litery reprezentują wynik testu post hoc, w którym grupy istotnie różniące się od siebie posiadają odmienne litery.

opis	Adenoma	Carcinoma	Myelolipoma	Pheochromocytoma
Guz [mm]	N=(17), 36 [19-45]a	N=(31), 110 [67.5-175]b	N=(4), 55 [47.25-64]a	N=(10), 56 [41.25-64]a
Ki67 [%]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(25), 25 [15-30]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(0), NA [NA-NA]
Masa [kg]	N=(15), 80 [67.5-90]	N=(14), 70 [63.5-75]	N=(2), 83.5 [78.25-89]	N=(7), 73 [62.5-78]
Wzrost [m]	N=(15), 1.64 [1.59-2]	N=(14), 1.68 [1.61-2]	N=(2), 1.59 [1.57-2]	N=(7), 1.73 [1.67-2]
BMI [kg/m ²]	N=(15), 27.34 [24.84-32]a	N=(11), 25.08 [22.91-30]ab	N=(2), 33.23 [30.02-36]a	N=(5), 22.41 [22.41-24]b
Metanefryna [µg/24.h]	N=(16), 47.5 [26.58-77]a	N=(5), 19 [13-25]b	N=(4), 46.5 [23.5-66]ab	N=(5), 329 [89-1104]c

Normetanefryna [µg/24.h]	N=(16), 284.5 [195.45-373]a	N=(5), 250 [109-298]a	N=(4), 179 [162.5-233]a	N=(5), 2091 [2070-2700]b
Glukoza [mg/dl]	N=(20), 97.5 [89.5-109]	N=(26), 92.5 [86-108]	N=(4), 101 [97-105]	N=(10), 104 [98.5-116]
Cholesterol całkowity [mg/dl]	N=(18), 202.5 [169-228]	N=(23), 183 [150-223]	N=(4), 177.5 [164.25-198]	N=(7), 240 [192.5-252]
HDL [mg/dl]	N=(18), 56 [50-63]	N=(21), 47 [38-64]	N=(4), 55 [45.5-62]	N=(7), 61 [52.5-70]
LDL [mg/dl]	N=(18), 103.75 [89.57-135]	N=(21), 98.4 [81-135]	N=(4), 88.8 [66.3-120]	N=(7), 144.4 [130-151]
TG [mg/dl]	N=(18), 147 [118.5-172]	N=(21), 119 [91-168]	N=(4), 129 [122.75-180]	N=(7), 131 [117-169]
Wit.D [ng/ml]	N=(4), 11 [10-13]	N=(7), 16 [12-21]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(1), 21 [21-21]
Kortyzol 08.00 [nmol/l]	N=(19), 519 [310.5-630]	N=(24), 417.5 [268.25-628]	N=(4), 457 [359.25-510]	N=(9), 460 [441-546]
Kortyzol 23.00 [nmol/l]	N=(20), 166 [101-236]a	N=(21), 273 [190-401]b	N=(4), 220.5 [103-347]ab	N=(8), 99.5 [66.5-154]a
17 OH Progesteron [ng/ml]	N=(2), 166.57 [86.36-247]	N=(7), 4.82 [3.09-141]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(1), 563 [563-563]
DHEAS [µg/dl]	N=(18), 81 [50.5-170]	N=(26), 110 [38.25-470]	N=(3), 26 [22.5-87]	N=(9), 236 [84-275]
ACTH [pg/dl]	N=(18), 16.27 [14.25-44]	N=(24), 31.79 [3.24-64]	N=(4), 17.04 [11.12-23]	N=(9), 35.83 [32.61-48]
Testosteron [nmol/l]	N=(8), 1.05 [0.45-3]a	N=(20), 2.65 [0.6-8]a	N=(3), 0.4 [0.25-8]a	N=(6), 19.05 [18.58-22]b
SHBG [nmol/l]	N=(5), 47.7 [30.7-58]	N=(9), 35.3 [26-70]	N=(0), NA [NA-NA]	N=(5), 41.9 [30-83]
Androstendion [ng/ml]	N=(4), 1.33 [1.07-2]	N=(15), 1.28 [1.11-9]	N=(2), 2.88 [1.93-4]	N=(3), 3.7 [2.86-4]
Na [mmol/l]	N=(20), 143 [141.75-143]	N=(26), 142 [140-143]	N=(3), 141 [140.5-142]	N=(10), 140 [140-142]
K [mmol/l]	N=(19), 4.27 [4.03-4]	N=(26), 4.3 [4.12-4]	N=(3), 4.46 [4.23-5]	N=(10), 4.65 [4.42-5]
Aldosteron spoczynek [pg/ml]	N=(3), 31 [28.5-86]	N=(7), 147 [76.5-620]	N=(1), 35 [35-35]	N=(1), 57 [57-57]
ARO spoczynek [ng/ml/godz.]	N=(3), 0.2 [0.14-0]	N=(6), 0.74 [0.57-2]	N=(1), 0.07 [0.07-0]	N=(2), 6.83 [4.3-9]
CEA [ng/ml]	N=(5), 2.73 [1.19-3]	N=(13), 1.34 [0.8-3]	N=(2), 5.56 [4.64-6]	N=(5), 1.58 [0.9-2]
AFP [IU/ml]	N=(3), 3.43 [2.56-4]	N=(12), 2.46 [1.65-3]	N=(2), 4.16 [3.24-5]	N=(5), 1.46 [1.33-2]

3.1.3 Linia komórkowa

W badaniach wykorzystano komercyjną linię komórkową HAC15 (ATCC® CRL-3301™ VA, USA) pochodzącą z amerykańskiej kolekcji American Type Culture Collection. Jest to klonalna

linia komórkowa wyizolowana z linii H295R (ATCC® CRL-2128™). HAC15 w porównaniu do H295R posiada silniejszy fenotyp steroidogenezy oraz daje odpowiedź na działanie ACTH. Linia komórkowa HAC15 jest ludzką linią komórkową. Reprezentującą raka kory nadnercza. Pozyskana została w latach 80 od 48 letniej czarnoskórej kobiety. Ponadto w niniejszej rozprawie doktorskiej prowadzono badania z wykorzystaniem pierwotnej linii komórkowej raka kory nadnercza (ACC). Komórki wyjściowe do założenia hodowli pochodziły bezpośrednio z patologicznych zmian od pacjentów po adrenalektomii, z potwierdzonym rozpoznaniem histopatologicznym.

3.1.4 Strony internetowe i oprogramowania

- BioConductor (pakiet analizy wyników mikromacierzowych języka programistycznego R)
- BioGPS- baza danych
- David- baza danych ontologii genów
- geneanswers (pakiet do grupowania genów o zmiennej ekspresji według opisu z bazy GeneOntology)
- ggplot2 library (program tworzenia wykresów)
- GO BP- baza danych grup ontologicznych
- <http://onkologia.org.pl/>
- <http://www.affymetrix.com/estore/index.jsp>
- <https://www.cancer.org/>
- język programistyczny R (analiza statystyczna)
- NCBI Gene- baza danych
- Primer 3 (projektowanie starterów do reakcji PCR) <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>
- Roche Universal Probe Library (projektowanie starterów do reakcji PCR) https://lifescience.roche.com/en_pl/brands/universal-probe-library.html
- TCGA- baza danych

3.2 Metody

Dołożono wszelkich starań by wykonywane czynności w niżej przedstawionych procedurach przeprowadzone był w sposób zmniejszający ryzyko kontaminacji prób.

3.2.1 Izolacja całkowitego RNA z komórek tkanki nadnercza

Materiały, odczynniki, roztwory:

- Homogenizat komórkowy uzyskany z tkanek pochodzących od pacjentów poddanych adrenalektomii oraz z tkanek od zdrowych osób- dawców nerek.
- TRIreagent Sigma - Aldrich
- Chloroform – Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice P.P.H.
- Alkohol etylowy 96% - EUROCHEM BGD
- Protektor RNaz Inhibitor – Roche
- Komercyjny zestaw MACHEREY- NAGEL, NucleoSpin® RNA Clean-up XS:
 - Clean-up Buffer RCU- bufor oczyszczający
 - Wash Buffer RA3 -bufor płuczący

- RNase-free H₂O - woda wolna od RNas
- NucleoSpin® RNA Clean-up XS Binding Columns - kolumnienki
- Probówki Eppendorf
- Wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- Pipety półautomatyczne
- Sprzęt ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary

Aparatura:

- Vortex
- Wirówka

Do izolacji całkowitego RNA wykorzystano homogenizat komórkowy z fragmentów gruczołów nadnerczy pochodzących od pacjentów poddanych adrenalektomii oraz nadnerczy od zdrowych osób- dawców nerek. W celu uzyskania homogenizatu komórkowego fragmenty nadnerczy poddano procesowi homogenizacji statorowo- rotorowej w warunkach obniżonej temperatury. Uzyskany w ten sposób zawiesina komórkowa stanowiła materiał do izolacji całkowitego RNA.

Izolacja całkowitego RNA została przeprowadzona w dwóch etapach. Pierwszy etap opierał się na modyfikacji metody Piotra Chomczyńskiego. Drugi, przebiegał z wykorzystaniem kitu MACHEREY- NAGEL, NucleoSpin® RNA Clean- up XS. Protokół dla kitu MACHEREY- NAGEL, NucleoSpin® RNA Clean- up XS również wykorzystano w zmodyfikowanej wersji. Zawiesinę komórkową zalano Trizolem w objętości 2000 µl. Następnie dodano chloroform w objętości 400 µl. Objętość chloroformu została wyliczona według proporcji sugerującej, że na każde 1000 µl Trizolu przypada 200 µl chloroformu (TRI Reagent® Protokół). Po dodaniu chloroformu, próby były wytrząsane ręcznie przez 15 sekund, a następnie inkubowane przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po upływie czasu inkubacji, próby wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C przy sile odśrodkowej wirówki wynoszącej (RCF) 12. 000 g. Otrzymano fazę wodną, którą zebrano do nowych probówek. Jej objętość wynosiła około 400-500 µl. Następnie do fazy wodnej dodano w proporcji 1:1 odczynnika Clean-up Buffer RCU zawierającego izotiocyanin guanidyny i alkohol etylowy. Całość przeniesiono do kolumnienki i wirowano przez 30 sekund przy 11.000 g. Po związaniu RNA ze złożem, w membranie kolumnienki, próbę przemyto używając 400 µl buforu RA3. Po czym całość wirowano przez 30 sekund przy 11.000 g. Uzyskany eluat został odrzucony. Próbę uzupełniono buforem RA3 w objętości 200 µl. Następnie wirowano przez 2 minuty przy 11.000 g. Eluat odrzucono. W dalszym etapie kolumnienkę umieszczono w nowej probówce, dodano do niej 10 µl wody wolnej od RNaz i wirowano przez 30 sekund przy 11.000 g. Wyizolowane próby zabezpieczono przed degradacją RNA dodając 1 µl inhibitora RNaz. Wszystkie wyżej wymienione procedury zostały wykonane z dbałością o zminimalizowanie ryzyka kontaminacji prób. Używane powierzchnie oczyszczone zostały środkiem usuwającym RNazy (RNaseZap® Ambion®, USA). Użyto probówek i narzędzi wolnych od RNaz.

3.2.2 Ocena ilości wyizolowanego RNA

Materiały, odczynniki, roztwory:

- woda wolna od RNaz - MACHEREY- NAGEL
- pipeta półautomatyczna
- wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- papierowa bibuła
- środki ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary

Aparatura:

- spektrofotometr NanoDrop 1000

Do oceny wyizolowanego RNA wykorzystano spektrofotometr NanoDrop 1000 (spektrofotometr NanoDrop; Thermo Scientific, USA). Kalibracja urządzenia została wykonana przy zastosowaniu 1 μ l wody wolnej od RNaz. Przed każdym pomiarem stężenia i czystości RNA zarówno ramię, jak i podstawę aparatu czyszczono za pomocą papierowej bibuły. Właściwych pomiarów dla wyizolowanych prób dokonano w 1 μ l RNA. Dla każdej z prób określono stopień zanieczyszczenia białkami (stosunek absorbancji 280/260) oraz stężenie wyrażone w ng/ μ l. Stosunek absorbancji 260/280 w większości przypadków był większy, bądź równy 1,8. Co świadczy o braku zanieczyszczeń białkowych w badanym RNA.

3.2.3 Odwrotna Transkrypcja (RT)

Materiały, odczynniki, roztwory:

- Komercyjny zestaw Roche: Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis:
 - Anchored- oligo(dT)₁₈ Primer- starter typu oligo(dT)
 - Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer x5- bufor do reakcji odwrotnej transkrypcji stężony 5x
 - Protector RNase Inhibitor- inhibitor RNaz
 - Deoxynucleotide Mix- mix deoksynukleotydów
 - DDT- odczynnik Clelanda, ditiotritol
 - Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase- enzym odwrotna transkryptaza
- water, PCR- grade- woda wolna od RNaz
- Probówki Eppendorf
- Wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- Pipety półautomatyczne
- Blok chłodzący
- Środki ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary

Aparatura:

- Termocykler UNO II Biometra®
- Vortex
- Wirówka

Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 2 μ l matrycy pochodzącej z wcześniej wyizolowanych prób. Następnie uzupełniono wodą wolną od RNaz w objętości 8,4 μ l. Do tak przygotowanych prób dodano 1 μ l startera Anchored- oligo(dT)₁₈ Primer. Wyżej wymieniony etap reakcji odwrotnej transkrypcji wykonywany był z wykorzystaniem bloku chłodzącego. W kolejnym etapie mieszaninę poddano 10-cio minutowej denaturacji w temperaturze 65°C używając termocyklera. Po denaturacji próby przeniesiono z powrotem na blok chłodzący i do każdej dodano: 4 μ l buforu, 2 μ l mieszaniny deoksynukleotydów, 1 μ l DDT, 1,1 μ l enzymu odwrotnej transkryptazy oraz 0,5 μ l inhibitora RNaz. Dalej próby inkubowano przez 30 minut w temperaturze 55°C. Po upływie określonego czasu próby ogrzewano przez 5 minut w temperaturze 85°C, w celu inaktywacji enzymu odwrotnej transkryptazy. Etapy inkubacji przeprowadzone były w termocyklerze. Po zakończeniu reakcji, próby uzupełniono wodą wolną od RNaz w objętości 100 μ l i zamrożono w temperaturze - 20°C.

Wyżej wymienione procedury zostały wykonane z dbałością o zminimalizowanie ryzyka kontaminacji prób.

3.2.4 Real -Time PCR

Materiały, odczynniki, roztwory:

- Komercyjny zestaw Roche: LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I:

- LightCycler® FastStart Enzyme- enzym polimeraza
- LightCycler® FastStart Reaction- Mix SYBR Green I x10
- MgCl₂- chlorek magnezu
- Water, PCR- grade- woda wolna od RNaz
- Startery
- cDNA
- Kapilary
- Probówki Eppendorf
- Wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- Pipety półautomatyczne
- Blok chłodzący
- Środki ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary

Aparatura:

- Termocykler Roche Applied Science LightCycler® 2.0
- Vortex
- Wirówka

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym (QPCR lub Real-Time PCR) wykonano w urządzeniu typu Termocykler Roche Applied Science LightCycler® 2.0. Do przeprowadzenia wyżej wymienionej metody użyty został barwnik typu SYBR Green, który pełni funkcję detektora emitującego fluorescencję, na skutek oddziaływania z dwuniciowym DNA. Do reakcji Real-Time PCR wykorzystano 2 µl matrycy cDNA otrzymanej we wcześniej opisanym procesie odwrotnej transkrypcji. Matrycę cDNA umieszczono w kapilarach reakcyjnych. W kolejnym etapie, do kapilar z matrycą dodano: 0,5 µl buforu będącego mieszaniną buforu i enzymu polimerazy, 1 µl MgCl₂, 0,4 µl mieszaniny startera typu forward i revers oraz 6,1 µl H₂O.

W przypadku genu referencyjnego startery typu forward i revers zostały dodane do mieszaniny w objętości 1 µl każdy. Całość mieszaniny reakcyjnej dla genu referencyjnego uzupełniono wodą wolną od RNaz w objętości 4,5 µl, tak by całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl. Tak przygotowane kapilary wirowano przez 30 sekund przy 2,500 g. Następnie kapilary umieszczono w rotorze termocyklera i przeprowadzono reakcję przy następujących parametrach programu termocyklera:

Tabela 4. Parametry i etapy reakcji Real- Time PCR.

Etap główny	Liczba cykli	Segment	Temperatura (°C)	Czas (s)
Denaturacja	1	-	95	600
Amplifikacja	45	Denaturacja	95	10
		Przylączenie starterów	56	5
		Elongacja	72	10
Analiza topnienia		Denaturacja	95	0
		Przylączenie amplikonów	65	20
		Elongacja	95 (0,1°/s)	0
Chłodzenie	1	-	40	10

Wyżej wymienione procedury zostały wykonane z dbałością o zminimalizowanie ryzyka kontaminacji prób. Do standaryzacji ekspresji oznaczanych genów wybrano gen referencyjny HPRT (fosforybozylotransferaza hipoksantynowo- guaninowa). Gen referencyjny

charakteryzuje się stałą ekspresją we wszystkich analizowanych próbach, bez względu na warunki doświadczeń. W badaniach wykorzystano następujące startery: ENHO, GPR19, HPRT. Informacje potrzebne do ich zaprojektowania uzyskano z bazy danych GenBank. Startery zostały zaprojektowane za pomocą oprogramowania Primer 3 software (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) – HPRT oraz Roche Universal Probe Library- GPR19, ENHO.

Tabela 5. Sekwencje starterów użytych w reakcji RT-PCR. W tabeli przedstawiono sekwencje starterów forward i revers.

cDNA	Starter	Sekwencja (5'-3')
GPR19	Forward	CCCGCAACATCTTAA AGGAA
	Reverse	GCCTGGAAACATTCA TTTCT
ENHO	Forward	GGCCCCTGTCCTGAG AAG
	Reverse	CAGGCTCTAGGTGAG GTGGA
HPRT	Forward	CTTGAACCTCTCTCATC TTAGGCTT
	Reverse	TGGTCAGGCAGTATA ATCCAAA

3.2.5 Analiza transkryptomu z zastosowaniem mikromacierzy ekspresyjnych

Procedurę analizy modulacji transkryptomu (ok 30 tys genów) przez adropinę przeprowadzono przy użyciu macierzy ekspresyjnych firmy Affymetrix - GeneAtlas Personal Microarray System. W tym systemie wykorzystano macierze ekspresyjne typu Gene Chip Human Genome U219.

Przygotowanie kontrolnego RNA

Dla wszystkich analizowanych próbek (N=4/grupa) całkowite RNA rozcieńczono do stężenia 100 ng w objętości 2 µl. Takie RNA zostało wymieszane z 2µl kontrolnego RNA (Poly-A Control Stock) i uzupełnione wodą do objętości 5 µl.

Synteza pierwszej nici cDNA

W procedurze odwrotnej transkrypcji, całkowite RNA jest przepisywane na cDNA z wykorzystaniem startera oligo(dT) uzupełnionego o sekwencję dla promotora polimerazy RNA T7 na 5' końcu

W temperaturze 4C, przygotowano roztwór First-Strand Master Mix o proporcjach podanych poniżej w przeliczeniu na objętość dla wszystkich badanych prób

odczynnik	Objętość na 1 reakcje
3' First-Strand Buffer	4 µL
3' First-Strand Enzyme	1 µL
Całkowita objętość	5 µL

Następnie dokładnie wymieszano oraz delikatnie odwirowano, aby zebrać mieszaninę na dnie probówki. 5µl otrzymanej mieszaniny dodano do wcześniej rozcieńczonego 5µl całkowitego RNA zawierającego RNA kontrolne.

Tak przygotowane próbki inkubowano przez 2 godziny w temp. 42°C, a następnie przez 2 minuty w temp. 4°C.

Synteza drugiej nici cDNA

Zasada działania: jednoniciowy cDNA jest przekształcany w dwuniciowy cDNA, który pełni rolę matrycy dla transkrypcji in vitro. Reakcja wykorzystuje polimerazę DNA i RNazę H do jednoczesnego strawienia RNA i syntezy dwuniciowego cDNA. Na lodzie przygotowano mieszaninę Second-Strand Master Mix według proporcji przedstawionych poniżej:

Odczynnik	Objętość na jedną reakcję
Woda wolna od nukleaz	13 µL
3' Second-Strand Buffer	5 µL
3' Second-Strand Enzyme	2 µL
Całkowita objętość	20 µL

Następnie 20 µl mieszaniny przeniesiono do pojedynczych prób, dobrze zamieszano oraz inkubowano przez 1 godzinę w 16°C, następnie przez 10 minut w 65°C, a potem przez 2 minuty w 4°C.

Transkrypcja in vitro - Synteza znakowanego cRNA

W tej procedurze, znakowany komplementarny RNA (cRNA) jest syntetyzowany i amplifikowany z wykorzystaniem transkrypcji in vitro na matrycy otrzymanego wcześniej cDNA przy użyciu polimerazy T7 RNA.

W temperaturze pokojowej przygotowano bufor do transkrypcji in vitro - IVT Master Mix wg. proporcji przedstawionych poniżej.

Odczynnik	Objętość na jedną reakcję
3' IVT Biotin Label	4 µL
3' IVT Buffer	20 µL
3' IVT Enzyme	6 µL
Całkowita objętość	30 µL

W temperaturze pokojowej, przeniesiono 30 µl IVT Master Mix do każdej probówki zawierającej 30 µl cDNA. Dokładnie wymieszano oraz krótko odwirowano celem zebrania reakcji na dnie probówki. Następnie probówki inkubowano przez 16 godzin w 40°C

Oczyszczanie znakowanego cRNA

W tej procedurze enzymy, sole, nieorganiczne fosforany i niewbudowane nukleotydy zostały usunięte. W tym celu wykorzystano złoża magnetyczne które łączyły się ze znakowanym cRNA. Przed wykorzystaniem złoża zostały dokładnie zworteksowane celem ich całkowitego rozproszenia w buforze

Do każdej próbki cRNA (60 µL) dodano 100 µL złożeń magnetycznych, wymieszano pipetą, a następnie przeniesiono do studzienek płytki 96 dołkowej z zaokrąglonym dnem. cRNA wraz ze złożami inkubowano przez 10 minut delikatnie mieszając. Po tym czasie płytkę przeniesiono do statywu magnetycznego, aby wychwycić złoża. W momencie, gdy roztwór był przezroczysty został on usunięty a same złoża przemyto dwukrotnie buforem do przemywania złożeń. Następnie złoża osuszono i rozpuszczono w 20 µl podgrzanej do 65°C wodzie. Po pięciu

minutach inkubacji, płytkę umieszczono ponownie na statywie magnetycznym I roztwór zawierający oczyszczony cRNA przeniesiono do nowych probówek.

Fragmentacja znakowanego cRNA

W tej procedurze oczyszczony cRNA jest fragmentowany przez kationy dwuwartościowe i podwyższoną temperaturę.

Do przeprowadzenia procedury fragmentacji cRNA zostało rozcieńczone do stężenia 468.75 ng/μL znakowanego cRNA. Następnie do 32 μl rozcieńczonego cRNA dodano 8 μl 3' Fragmentation Buffer. Mieszaninę tą inkubowano przez 35 minut w 94°C, a następnie przez co najmniej 2 minuty w 4°C.

Hybrydyzacja cRNA do powierzchni macierzy

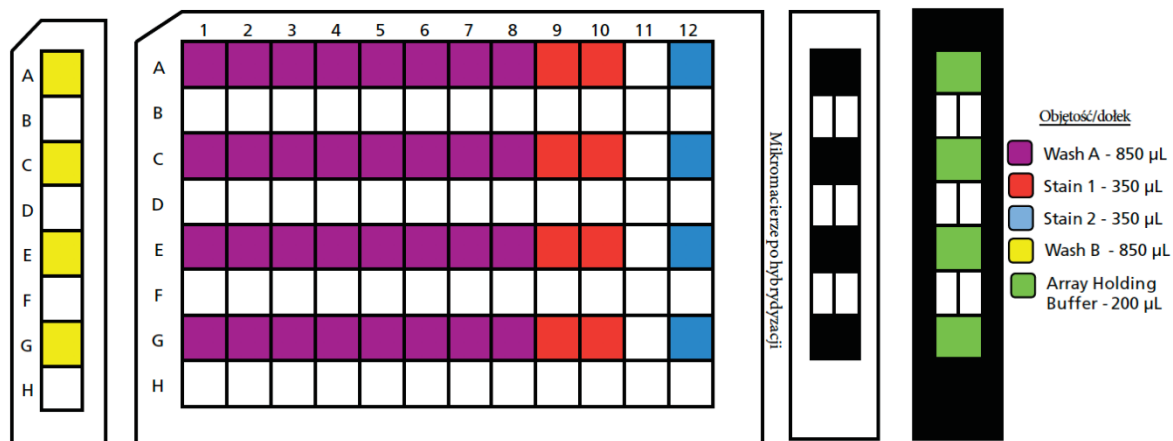
Pofragmentowane I znakowane cRNA zostało wykorzystane do hybrydyzacji do sond mieszczących się na powierzchni macierzy zgodnie z procedurą dołączoną przez producenta. W pierwszej kolejności przygotowano bufor hybrydyzacyjny w objętości proporcjonalnej do ilości badanych prób.

Składniki buforu	Ilość na jedną macierz
5X WT Hyb Add 1	30
Kontrolne oligonukleotydy B2 (3nM)	1.5
20X kontrole hybrydyzacji (bioB, bioC, bioD, cre)	7.5
15X WT Add 4	10
Całkowita objętość	49

Do 49 μl otrzymanego buforu dodano 41 μl znakowanego I pofragmentowanego cRNA a także 60 μl buforu 2.5X WT Hyb do końcowej objętości wynoszącej 150 μl. Mieszanina ta została poddana denaturacji w temperaturze 99 °C przez 5 minut a następnie w 45 °C. Taki materiał naniesiono do naczynek hybrydyzacyjnych, w których zostały umieszczone mikromacierze. Hybrydyzację przeprowadzono z wykorzystaniem pieca hybrydyzacyjnego AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA) w temperaturze 45° C przez 16 h.

Płukanie macierzy i odczyt wyników.

Po hybrydyzacji macierze zostały przepłukane celem usunięcia buforu oraz niezwiązanego cRNA. Proces płukania został przeprowadzony automatycznie z wykorzystaniem stacji mikrofluidycznej Fluidics Sctation 450. Odpowiednie bufory zostały naniesione w odpowiednie pozycje naczynek do płukania według poniższego schematu



Po zakończeniu płukania mikromacierze umieszczano w stacji skanującej (GeneAtlas™ Imaging Station) i intensywność fluorescencji odczytywano oraz składano w całą powierzchnię za pomocą programu komputerowego GeneAtlas Viewer (Affymetrix) w wyniku czego powstały pliki z rozszerzeniem Cel, które poddane zostały dalszym analizom bioinformatycznym.

Bioinformatyczna analiza danych mikromacierzowych

Wszystkie analizy bioinformatyczne wykonano przy użyciu statystycznego języka programowania R uzupełnionego o odpowiednie biblioteki repozytorium Bioconductor (cyt). Korekcję tła, normalizację i obliczenie znormalizowanych wartości ekspresji przeprowadzono za pomocą metody normalizacji RMA (robust multiarray average) zaimplementowanej w bibliotece "Affy" (cyt). Pliki opisowe uzyskano z biblioteki "oligo", które następnie połączono z danymi ze znormalizowaną ekspresją (cyt). Geny uznane za istotnie regulowane zostały ustalone z wykorzystaniem modeli liniowych danych mikromacierzowych z biblioteki "limma" (cyt). Kryteria selekcji dla genów różnicujących (DEGs) oparto na bezwzględnej zmianie krotności ekspresji >2 i p po korekcie wielokrotnego testowania $FDR < 0.05$. Opis techniczny wraz z surowymi i znormalizowanymi plikami danych został zdeponowany w repozytorium Gene Expression Omnibus (GEO) w National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) pod numerem dostępu GEO: GSE150775.

3.2.5 Hodowla komórkowa

Materiały, odczynniki, roztwory:

- Linia komórkowa HAC15 (ATCC® CRL-3301™ VA, USA)
- Pożywka- medium hodowlane w składzie:
 - DMEM / F-12 bez czerwieni fenolowej (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
 - 10% Cosmic Calf Serum (Hyclone, GE Healthcare, MA USA)
 - 1% ITS + Premix (Corning, NY, USA)
 - 1% P / S (Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy)
- ACTH (Synacthen) w stężeniu 10^{-7} M (Bazylea, Szwajcaria)
- Forskolina w stężeniu 25 µM (Merck Millipore, Niemcy)
- Adropina w stężeniu 10^{-8} M (Bachem, Szwajcaria)
- Płytki hodowlane
- Kapilary
- Probówki Eppendorf

- Wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- Pipety półautomatyczne
- Środki ochrony osobistej

Aparatura:

- Komora laminarna ze światłem UV
- Łaźnia wodna
- Wirówka
- Cieplarka- inkubator 37° C, CO₂ 5%

Hodowla komercyjnej linii komórkowej raka kory nadnercza HAC15 była prowadzona w medium hodowlanym (DMEM / F-12 bez czerwieni fenolowej (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10% Cosmic Calf Serum (Hyclone, GE Healthcare, MA USA), 1% ITS + Premix (Corning, NY, USA), 1% P / S (Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy)). Komórki z niewielkiej liczby pasaży (p0-p1) były następnie hodowane w pożywce DMEM / F-12 z dodatkiem 10% zubożonej płodowej surowicy bydlęcej (CS-FBS) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) i 1% P/S w czasie 24 godzin. Następnie hodowane komórki zostały potraktowane następującymi związkami: ACTH (Synacthen) w stężeniu 10⁻⁷ M (Bazylea, Szwajcaria), forskoliną w stężeniu 25 µM (Merck Millipore, Niemcy) oraz adropiną w stężeniu 10⁻⁸ M (Bachem, Szwajcaria) przez kolejne 24 godziny. Hodowla w czystym medium stanowiła grupę kontrolną do której odnoszona wartości grup badanych. Hodowle w obecności badanych substancji prowadzono przez 24 godziny a następnie komórki oraz medium hodowlane zebrano, zabezpieczono i przechowywano w temperaturze -80 ° C do dalszej analizy.

Pierwotne hodowle komórek raka kory nadnerczy

Świeże fragmenty raka kory nadnerczy, uzyskano w trakcie zabiegu operacyjnego. Fragmenty te następnie zostały mechanicznie pocięte na małe kawałki. Fragmenty nadnerczy poddawano enzymatycznemu trawieniu w 25 ml medium DMEM F12 bez czerwieni fenolowej (Thermo Fisher Scientific) zawierającego 0,1% kolagenazy typu I (17018029; ThermoFisher Scientific) przez 45 min w łaźni wodnej w temperaturze 37°C z ciągłym mieszaniem. Po trawieniu mieszaninę przefiltrowano a następnie odwirowywano w temperaturze 4°C, przy 1200 obr./min przez 7 min. Osad komórkowy zawieszano ponownie w podłożu DMEM F12 z dodatkiem roztworu antybiotyków i 10% FBS (Hyclone, GE Healthcare). Komórki hodowano w temperaturze 37°C i 5% CO₂ do osiągnięcia 70% konfluencji.

3.2.6 RTCA (Real Time Cell Analyzer)

Materialy, odczynniki, roztwory:

- Hodowla komórkowa HAC15 (ATCC® CRL-3301™ VA, USA)
- Adropina (Bachem, Switzerland) w stężeniu 10⁻⁸ M

Aparatura:

- Real Time Cell Analyser (RTCA, Roche Applied Science, GmbH, Penzberg, Germany): RTCA analyzer, RTCA SP- station, RTCA software
- Płytki E-plate®16

W celu weryfikacji wpływu adropiny na dynamikę podziałów komórek HAC15 zastosowano metodę opartą na impedancji elektrycznej, zwaną Real-Time Cell Analyser (RTCA, Roche Applied Science, GmbH, Penzberg, Niemcy). System RTCA wykrywa zmiany w impedancji elektrycznej na wbudowanych elektrodach sensorycznych umieszczonych na dnie 16-dołkowej płytce (E-Plate 16), pokrytej przez dzielące się komórki. Impedancja elektryczna jest mierzona w 15-minutowych odstępach przez cały okres hodowli. Głównym odczytem RTCA jest "Cell Index" - mierzalny parametr odpowiadający względnej zmianie impedancji elektrycznej w zależności od tempa proliferacji lub apoptozy hodowanych komórek.

Badanie przeprowadzono na ludzkiej linii komórek raka kory nadnerczy HAC15. Komórki hodowano jako grupę kontrolną bez dodatku adropiny (N=8) oraz z dodatkiem adropiny w stężeniu 10^{-8} (N=8). Komórki były naniesione na płytkę w objętości 200 μ l na dołek. Po 72 godzinach hodowli, kiedy komórki przytwierdziły się do podłoża oraz zapoczątkowały proliferację, dodano adropinę w stężeniu 10^{-8} i komórki inkubowano dalej, do osiągnięcia fazy plateau przez grupę kontrolną. Całkowity czas trwania inkubacji wyniósł 216 godzin. Pomiar impedancji dokonywany podczas proliferacji komórek, odbywał się w 15 minutowych przedziałach czasowych. W punkcie czasowym odpowiadającym podaniu badanych substancji dokonano normalizacji (znormalizowany indeks komórkowy) przy wykorzystaniu oprogramowania do RTCA. Każdy eksperyment powtarzano trzy razy.

3.2.7 Test immunoenzymatyczny ELISA (Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay)

Materialy, odczynniki, roztwory:

- Surowica od pacjentów z różnymi typami guzów nadnerczy przed wdrożeniem leczenia (Tabela 6.)
- Surowica od pacjentów poddanych adrenalektomii z powodu ACC, pobranie przed i po zabiegu operacyjnym, grupa licząca 7 przypadków (Tabela 7.)
- Komercyjny zestaw Rat (AD) ADROPIN ELISA KIT Fine Test (Wuhan Fine Biotech Co.):
 - ELISA Microplate- mikropłytki: 96 dołków opłaszczonych przeciwciałem
 - Lyophilized Standard- liofilizowany standard służący do przygotowania szeregu rozcieńczeń do krzywej standardowej
 - Sample/Standard Dilution Buffer- bufor do rozcieńczeń
 - Biotin-labeled Antibody (Concentrated) – stężone biotynylowane przeciwciała
 - Antibody Dilution Buffer- bufor do rozcieńczeń przeciwciała
 - HRP-Streptavidin Conjugate (SABC)- koniugat
 - SABC Dilution Buffer- bufor do rozcieńczeń koniugatu
 - TMB Substrate – substrat
 - Stop Solution- roztwór zatrzymujący reakcję
 - Wash Buffer (25X) – bufor płuczący 25-krotnie stężony
- Probówki Eppendorf
- Wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- Pipety półautomatyczne
- Papierowy ręcznik
- Rynienki laboratoryjne do odczynników
- Woda destylowana do przyrządzenia buforu płuczącego
- Środki ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary

Aparatura:

- Analizator ze spektrofotometrem BioTek® Synergy 2 z oprogramowaniem GENE 5

- Votrex
- Wytrząsarka
- Wirówka
- Stoper- minutnik

W celu określenia stężenia adropiny wydzielonej do krążenia, zarówno w surowicy krwi pacjentów z różnymi typami guzów nadnerczy jak i w grupie osób zdrowych (kontrola) wykorzystano test immunoenzymatyczny ELISA.

Test ELISA, a także przygotowanie odczynników i roztworów wykonano w oparciu o procedurę zamieszczoną w instrukcji dołączonej do zestawu. Przed przystąpieniem do wykonywania procedury wyjęto z lodówki zestaw odczynników, by doprowadzić je do temperatury pokojowej. Po upływie 30 minut, w oparciu o instrukcję, przygotowano odczynniki. Materiał badany - surowice pacjentów rozmrożono odpowiednio wcześniej. Po czym rozcieńczono je w stosunku 1:10 z wykorzystaniem buforu do rozcieńczeń. Wszystkie odczynniki i próby były wymieszane bezpośrednio przed użyciem. W pierwszym etapie pracy przepłukano płytkę dwukrotnie buforem płuczącym. Następnie w ilości dwóch powtórzeń napipetowano po 100 µl standardów i prób do osobnych dołków w płytce. Płytkę przygotowaną w ten sposób inkubowano w temperaturze 37 °C przez 90 minut. Po upływie ustalonego czasu, płytkę przepłukano dwukrotnie buforem płuczającym w objętości 350 µl na dołek. Po każdym płukaniu płytką skierowaną dnem do góry uderzano w papierowy ręcznik, w celu usunięcia jak największej ilości resztek buforu. Dalej, do każdego z dołków w płytce napipetowano 100 µl roztworu roboczego biotynylowanego przeciwciała. Płytkę inkubowano w temperaturze 37 °C przez 60 minut. Po inkubacji 3 razy zastosowano procedurę płukania. W kolejnym etapie do każdego z dołków w płytce dodano po 100 µl roztworu roboczego koniugatu, a następnie płytkę inkubowano w temperaturze 37 °C przez 60 minut. Po inkubacji powtórzono procedurę płukania według schematu 5 razy 350 µl na dołek. W przedostatnim etapie reakcji do każdego dołka w płytce dodano 90 µl substratu oraz zastosowano inkubację w temperaturze 37 °C przez 30 minut. Ostatni etap reakcji wymagał dodania do wszystkich dołków w płytce odczynnika stop w objętości 50 µl. Pomiaru absorbancji dokonano przy użyciu spektrofotometru BioTek® Synergy 2 sprzężonego z oprogramowaniem komputerowym GENE 5. Długość fali zastosowana do pomiaru wynosiła 450 nm. Czas od zakończenia reakcji do dokonania pomiaru nie przekroczył 15 minut.

Tabela 6. Wykaz grup i liczebność przypadków poddanych badaniu stężenia adropiny testem ELISA w surowicy krwi pobranej przy przyjęciu na oddział, przed wdrożeniem leczenia.

grupa	kontrola	pheochromocytoma	mielolipoma	adenoma	carcinoma
liczebność (N)	8	10	4	20	31

Tabela 7. Wykaz grup i liczebność przypadków poddanych badaniu stężenia adropiny testem ELISA w surowicy krwi pobranej od pacjentów poddanych adrenalektomii z powodu ACC, pobranie przed i po zabiegu.

grupa	przed zabiegiem	po zabiegu
liczebność (N)	7	7

Materiały, odczynniki, roztwory:

Komercyjny zestaw Aldosteron ELISA DE5298 Demeditec Diagnostics GmbH (Germany):

- Płytką mikrotitracyjna- 96 dołków opłaszczonych przeciwciałem poliklonalnym króliczym specyficznym względem aldosteronu

- Liofilizowane standardy w 5-ciu stężeniach- służące do przygotowania krzywej standardowej
- Liofilizaty kontroli niskiej i wysokiej
- Koniugat enzymu zawierający peroksydazę chrzanową
- Substrat- roztwór z tetrametylobenzydyną
- Stop- roztwór blokujący: 0,5 M H₂SO₄
- Roztwór płuczący- 40 x stężony
- Medium hodowlane pochodzące z hodowli linii HAC 15 (Tabela 8.)
- Probówki Eppendorf
- Wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- Pipety półautomatyczne
- Papierowy ręcznik
- Rynienki laboratoryjne do odczynników
- Woda destylowana do przyrządzenia buforu płuczącego
- Środki ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary

Aparatura:

- Analizator ze spektrofotometrem BioTek® Synergy 2 z oprogramowaniem GENE 5
- Votrex
- Wytrząsarka
- Wirówka
- Stoper- minutnik

Test immunoenzymatyczny Aldosteron ELISA DE5298 Demeditec Diagnostics GmbH (Germany) wykorzystano do ilościowego pomiaru aldosteronu w medium hodowlanym z linii komórkowej HAC 15 (Tabela 8.). Test ELISA, a także przygotowanie odczynników i roztworów wykonano w oparciu o procedurę zamieszczoną w instrukcji dołączonej do zestawu.

Zadbano o to, by wszystkie odczynniki oraz próby poddane badaniu, przed przystąpieniem do czynności związanych z testem ELISA osiągnęły temperaturę pokojową. Każda próba badana, kontrola oraz standard wykonano w dwóch powtórzeniach. W pierwszym kroku napipetowano do osobnych dołków 50 µl każdego standardu, kontroli oraz próbki. Tak przygotowaną płytkę inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji do dołków dodano 150 µl koniugatu enzymu, po czym zawartość płytki mieszano przez 10 s za pomocą wytrząsarki. Dalej, płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 60 minut. Po upływie czasu inkubacji zawartość dołków została energicznie wytrząśnięta, a dołki przepłukano buforem płuczącym 5 razy w objętości 300 µl na dołek. Po każdym płukaniu płytką skierowaną dnem do góry uderzano w papierowy ręcznik, w celu usunięcia jak największej ilości resztek buforu. W kolejnym etapie do dołków płytki mikrotitracyjnej napipetowano 200 µl substratu. Następnie płytkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie 30 minut zatrzymano reakcję enzymatyczną poprzez dodanie do każdego z dołków po 100 µl roztworu blokującego- stop. Absorbancję zmierzono przy użyciu spektrofotometru BioTek® Synergy 2 sprzężonego z oprogramowaniem komputerowym GENE 5. Do pomiaru zastosowano falę światła o długości 450 nm. Zadbano o to, by czas do dokonania pomiaru nie przekraczał 10 minut od czasu zakończenia reakcji.

Tabela 8. Medium z hodowli linii HAC 15 wykorzystane do ilościowego pomiaru aldosteronu metodą ELISA. Medium zebrano po 24 godzinnej ekspozycji na ACTH, forskolinę i adropinę w odpowiednich stężeniach. Medium kontrolne zebrano po 24 godzinnej hodowli bez ekspozycji na dodatkowe odczynniki.

grupa	kontrola	ACTH stężenie 10 ⁻⁷ M	forskolina stężenie 25 µM	adropina stężenie 10 ⁻⁶ M	adropina stężenie 10 ⁻⁸ M
liczebność (N)	6	6	6	6	6

Materiały, odczynniki, roztwory:

- Komercyjny zestaw Cortisol ELISA DEH3388 Demeditec Diagnostics GmbH (Germany):
 - Płytki mikrotitracyjna- 96 dołków opłaszczonych przeciwciałem poliklonalnym króliczym specyficznym względem kortyzolu
 - Liofilizowane standardy w 5-ciu stężeniach- służące do przygotowania krzywej standardowej
 - Liofilizaty kontroli niskiej i wysokiej
 - Koniugat enzymu zawierający peroksydazę chrzanową
 - Substrat- roztwór z tetrametylobenzydyną
 - Stop- roztwór blokujący: 2 N HCl
 - Roztwór płuczący- 10 x stężony
- Medium hodowlane pochodzące z hodowli linii HAC 15 (Tabela 9.)
- Medium hodowlane pochodzące z hodowli pierwotnej ACC (Tabela 10.)
- Probówki Eppendorf
- Wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- Pipety półautomatyczne
- Papierowy ręcznik
- Rynienki laboratoryjne do odczynników
- Woda destylowana do przyrządzenia buforu płuczącego
- Środki ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary

Aparatura:

- Analizator ze spektrofotometrem BioTek® Synergy 2 z oprogramowaniem GENE 5
- Votrex
- Wytrząsarka
- Wirówka
- Stoper- minutnik

Do ilościowego pomiaru kortyzolu w medium hodowlanym z linii komórkowej HAC 15 oraz medium pochodzącym z hodowli pierwotnej ACC (Tabela 9,10.) wykorzystano test immunoenzymatyczny Kortyzol ELISA DEH 3388 Demeditec Diagnostics GmbH (Germany). Test ELISA jak i przygotowanie odczynników oraz roztworów wykonano w oparciu o procedurę zamieszczoną w instrukcji dołączonej do zestawu. Zadbano o to, by wszystkie odczynniki oraz próby poddane badaniu, przed przystąpieniem do czynności związanych z testem ELISA miały temperaturę pokojową. Każda próba badana, kontrola oraz standard wykonano w dwóch powtórzeniach.

Na początku dodano po 10 μ l każdego standardu, kontroli oraz próbki do osobnych dołków w płytce mikrotitracyjnej. Następnie do każdego dołka dodano 200 μ l koniugatu. Płytkę przygotowaną w taki sposób inkubowano 60 minut w temperaturze pokojowej, jednocześnie mieszając jej zawartość z wykorzystaniem wytrząsarki. Po upływie czasu inkubacji zawartość dołków została energicznie wytrząśnięta, a dołki przepłukano buforem płuczącym 4 razy w objętości 300 μ l na dołek. Po każdym płukaniu płytkę skierowaną dnem do góry uderzano w papierowy ręcznik, w celu usunięcia jak największej ilości resztek buforu. W kolejnym etapie do dołków płytki mikrotitracyjnej napipetowano 200 μ l substratu. Dalej, płytkę poddano 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, w warunkach braku dostępu światła. Po upływie czasu inkubacji reakcja enzymatyczna została zatrzymana poprzez dodanie do każdego

z dołków roztworu blokującego- stop w objętości 50 μ l na dołek. Pomiaru absorbancji dokonano przy użyciu spektrofotometru BioTek® Synergy 2 sprzężonego z oprogramowaniem komputerowym GENE 5, w czasie nie przekraczającym 10 minut od momentu zatrzymania reakcji enzymatycznej. Wykorzystano długość fali świetlnej odpowiadającą 450 nm.

Tabela 9. Medium z hodowli linii HAC 15 wykorzystane do ilościowego pomiaru kortyzolu metodą ELISA. Medium zebrano po 24 godzinnej ekspozycji na ACTH, forskolinę i adropinę w odpowiednich stężeniach. Medium kontrolne zebrano po 24 godzinnej hodowli bez ekspozycji na dodatkowe odczynniki.

grupa	kontrola	ACTH stężenie 10^{-7} M	forskolina stężenie 25 μ M	adropina stężenie 10^{-6} M	adropina stężenie 10^{-8} M
liczebność (N)	6	6	6	6	6

Tabela 10. Medium z hodowli pierwotnej ACC wykorzystane do ilościowego pomiaru kortyzolu metodą ELISA. Medium zebrano po 24 godzinnej ekspozycji na ACTH i adropinę w odpowiednich stężeniach. Medium kontrolne bez ekspozycji na dodatkowe odczynniki zebrano po 24 godzinnej hodowli.

grupa	kontrola	ACTH stężenie 10^{-7} M	Adropina stężenie 10^{-8} M
liczebność (N)	16	6	6

3.2.8 Immunofluorescencja

Materiały, odczynniki, roztwory:

- roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS)
- 100% metanol
- 1% albumina bydlęca (BSA) (Sigma-Aldrich)
- 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- Przeciwciała pierwszorzędowe:
 - GPR-19 (ab123014, Abcam) (1:200);
 - CYP11B1 (ab167413, Abcam) (1:250);
 - StAR (8449S, Cell Signaling Technology) (1:250);
 - CYP11A1 (14217S, Cell Signaling Technology) (1:800)
- Drugorzędowe przeciwciało - poliklonalne przeciwciało królicze (1:500) (711-546-152) (Jackson ImmunoResearch)
- Barwnik diamidino-2-fenyloindolowego (DAPI) (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Woda destylowana
- Probówki Eppendorf
- Wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- Pipety półautomatyczne
- Papierowy ręcznik
- Środki ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary
- Szkiełka nakrywkowe
- Szkło do preparatów
- Komora wilgotna

Aparatura:

- Votrex

- Wytrząsarka
- Wirówka
- Stoper- minutnik
- Konfokalny laserowy mikroskop skaningowego (Olympus FV10i z dedykowanym obiektywem 60x z wodną imersją) wraz z oprogramowaniem Olympus FV10-ASW

Hodowane komórki nadnerczy po osiągnięciu 70% konfluencji, płukano trzykrotnie roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) i utrwalano przez 20-25 min w 100% metanolu. Następnie komórki płukano w PBS z dodatkiem 1% albuminy bydlęcej (BSA) (Sigma-Aldrich) po czym komórki inkubowano w PBS zawierającym 1% BSA i 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) przez 30 min. Po tym czasie komórki płukano trzykrotnie PBS + 1% BSA. Komórki inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z następującymi przeciwciałami pierwszorzędowymi: GPR-19 (ab123014, Abcam) (1:200); CYP11B1 (ab167413, Abcam) (1:250); StAR (8449S, Cell Signaling Technology) (1:250); i CYP11A1 (14217S, Cell Signaling Technology) (1:800). Wszystkie przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczono w PBS zawierającym 1% BSA i 0,2% Triton X-100. Po inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi, komórki płukano PBS + 1% BSA. Drugorzędowe przeciwciało - poliklonalne przeciwciało królicze (1:500) (711-546-152) (Jackson ImmunoResearch) - rozcieńczano w PBS + 1% BSA i inkubowano przez 1 h w temperaturze 37°C w ciemności. Następnie komórki przemywano PBS+ 1% BSA i barwiono przez 5 min roztworem barwnika diamidino-2-fenyloindolowego (DAPI) (Sigma-Aldrich, MO, USA) w wodzie (1:10000). Przed analizą mikroskopową komórki przemywano trzykrotnie PBS. Archiwizacja reakcji została wykonana przy użyciu konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (Olympus FV10i z dedykowanym obiektywem 60x z wodną imersją) wraz z oprogramowaniem Olympus FV10-ASW. Dla wszystkich obrazów stosowano tę samą moc lasera (40% dla Alexa Fluor 488 i 12% dla DAPI). Analizę densytometryczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania ImageJ (ImageJ 1.5q, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) zgodnie z protokołem The Open Lab Book (<https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html>). Oprogramowanie zostało użyte do obliczenia zintegrowanej gęstości z dziesięciu losowo wybranych obszarów 40/40 pikseli z wcześniej zarchiwizowanych zdjęć. Fluorescencja tła została określona dla każdego zdjęcia. Skorygowane wartości całkowitej fluorescencji komórek (CTCF) obliczano według następującego wzoru: $CTCF = \text{gęstość zintegrowana} - (\text{wybrany obszar} \times \text{średnia fluorescencja tła})$. Wszystkie wartości CTCF (N = 30/grupa) zostały przedstawione na wykresie i poddane analizie statystycznej z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya.

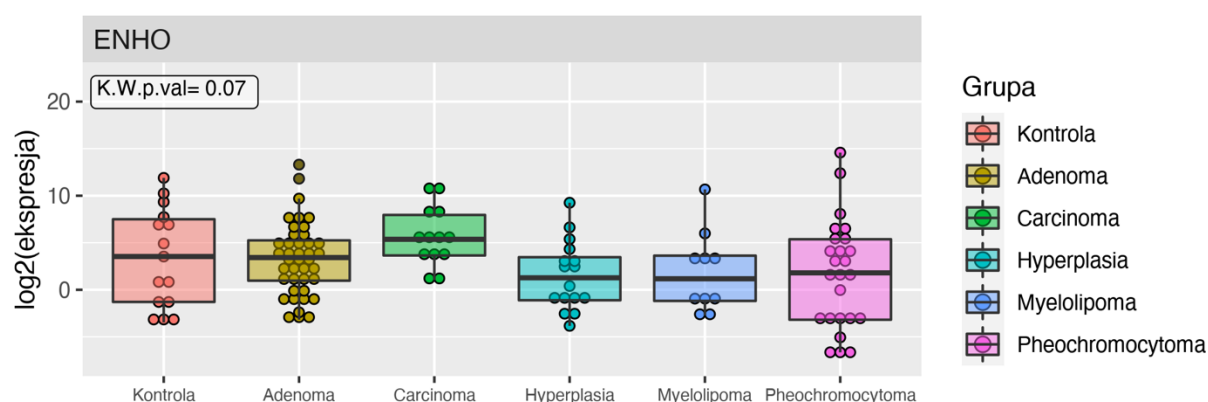
4 Wyniki

4.1 Analiza ekspresji genu kodującego adropinę (ENHO) oraz jej receptora (GPR19) w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy.

Celem wykazania różnic statystycznych w ekspresji genów ENHO i GPR19 wykorzystano test statystyczny Kruskala- Wallisa, w przypadku uzyskania wyników istotnych statystycznie ($p < 0.05$) przeprowadzono test post-hoc z wykorzystaniem testu Tukeya.

Ekspresja genu ENHO na poziomie mRNA została określona jako ekspresja względna, której wartości liczbowe zostały zlogarytmizowane. Szczegółowe dane liczbowe przedstawiono w tabeli 11. Uzyskane wyniki normalizowano względem genu referencyjnego - HPRT.

Nie uzyskano znaczących różnic w poziomie ekspresji genu ENHO, między porównywanymi typami guzów nadnerczy i względem kontroli (wartość p testu Kruskala- Wallisa = 0.07). Nieznaczny wzrost ekspresji genu ENHO zauważalny jest jedynie w grupie raka kory nadnercza- carcinoma, względem kontroli.

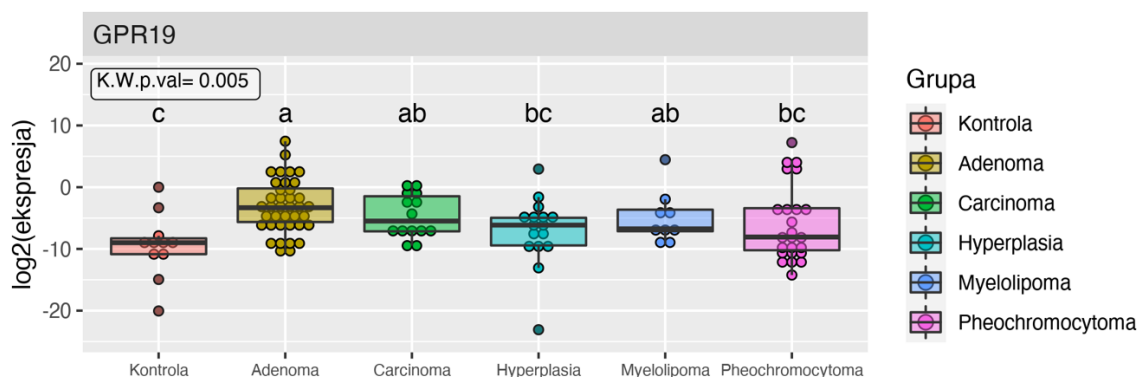


Rycina 6. Wykres pudełkowy przedstawiający poziom ekspresji genu ENHO w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy (metoda qPCR). Zaznaczona mediana, IQR oraz wartości minimum i maksimum. Ekspresja określona u indywidualnych pacjentów została przedstawiona na wykresie w postaci kropek. Pacjenci, u których nie wykazano ekspresji badanego genu zostali usunięci z analizy

Tabela 11. Sumaryczne wartości ekspresji genu ENHO w poszczególnych grupach.

grupy	N	mediana	Q1	Q3	IQR	min	max
Kontrola	15.00	3.53	-1.29	7.50	8.79	-3.47	11.90
Adenoma	41.00	3.43	0.97	5.25	4.28	-3.18	13.30
Carcinoma	13.00	5.36	3.65	7.95	4.30	1.00	10.96
Hyperplasia	16.00	1.27	-1.11	3.46	4.58	-3.84	9.25
Myelolipoma	10.00	1.17	-1.18	3.63	4.81	-2.74	10.67
Pheochromocytoma	25.00	1.80	-3.18	5.37	8.56	-6.64	14.58

Analogiczna analiza została wykonana w odniesieniu do genu GPR19. Wynik testu Kruskala-Wallisa ($p=0.005$) wskazał na istotność statystyczną różnicy ekspresji genu GPR19 w badanych grupach. Celem identyfikacji różnic ekspresji pomiędzy poszczególnymi grupami wykonano test post-hoc Tukeya.



Rycina 7. Wykres pudełkowy przedstawiający poziom ekspresji genu GPR19 w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy (metoda qPCR). Zaznaczona mediana, IQR oraz wartości minimum i maksimum. Ekspresja określona u indywidualnych pacjentów została przedstawiona na wykresie w postaci kropek. Pacjenci, u których nie wykazano ekspresji badanego genu zostali usunięci z analizy. Wynik testu post-hoc Tukeya został przedstawiony w postaci liter, gdzie różne litery wskazują na różnice statystyczne pomiędzy poszczególnymi grupami.

Ekspresja genu GPR19 była znacząco podwyższona w adenoma, carcinoma i mielolipoma w odniesieniu do grupy kontrolnej (szczegółowe wartości p pomiędzy poszczególnymi porównaniami przedstawiono w tabeli 12). W przypadku guza adenoma ekspresja GPR19 była wyższa blisko 2.7 razy ($p=0.0002$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja GPR19 w grupie carcinoma była 1.64-krotnie wyższa od ekspresji w grupie kontrolnej ($p=0.01$). Guzy mielolipoma wykazywały blisko 1.33- krotnie większą ekspresję, względem kontroli ($p=0.03$).

Tabela 12. Sumaryczne wartości $\log_2(\text{ekspresji})$ genu GPR19 w poszczególnych grupach.

grupy	N	mediana	Q1	Q3	IQR	min	max
Kontrola	11.00	-8.99	-10.85	-8.28	2.57	-20.06	0.00
Adenoma	38.00	-3.32	-5.64	-0.19	5.45	-10.70	7.45
Carcinoma	14.00	-5.48	-7.15	-1.47	5.68	-9.48	0.64
Hyperplasia	16.00	-6.14	-9.43	-4.96	4.47	-23.09	2.94
Myelolipoma	9.00	-6.75	-7.13	-3.64	3.49	-9.33	4.46
Pheochromocytoma	24.00	-8.07	-10.21	-3.40	6.81	-14.23	7.23

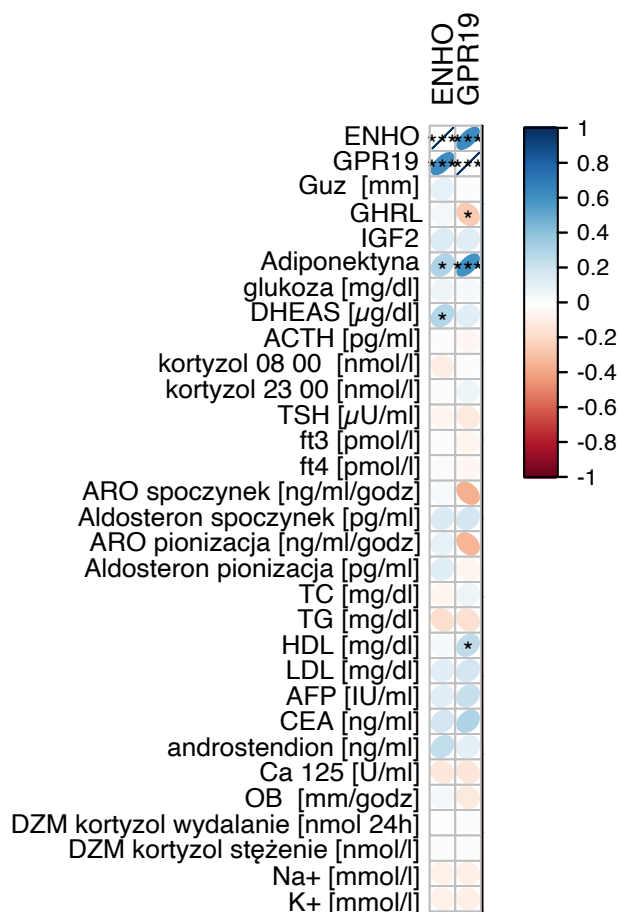
Tabela 13. Wartości p poszczególnych porównań testu post-hoc ekspresji genu GPR19 w poszczególnych grupach testu Tukeya.

porównanie	wartość P
Adenoma - Carcinoma	0.2
Adenoma - Hyperplasia	0.01
Carcinoma - Hyperplasia	0.11
Adenoma - Kontrola	0.0002
Carcinoma - Kontrola	0.01
Hyperplasia - Kontrola	0.1

Adenoma - Myelolipoma	0.15
Carcinoma - Myelolipoma	0.38
Hyperplasia - Myelolipoma	0.23
Kontrola - Myelolipoma	0.03
Adenoma - Pheochromocytoma	0.003
Carcinoma - Pheochromocytoma	0.09
Hyperplasia - Pheochromocytoma	0.48
Kontrola - Pheochromocytoma	0.09
Myelolipoma - Pheochromocytoma	0.2

4.2 Określenie zależności między nadnerczową ekspresją genu ENHO, GPR19, a zebranymi danymi klinicznymi oraz ekspresją innych genów.

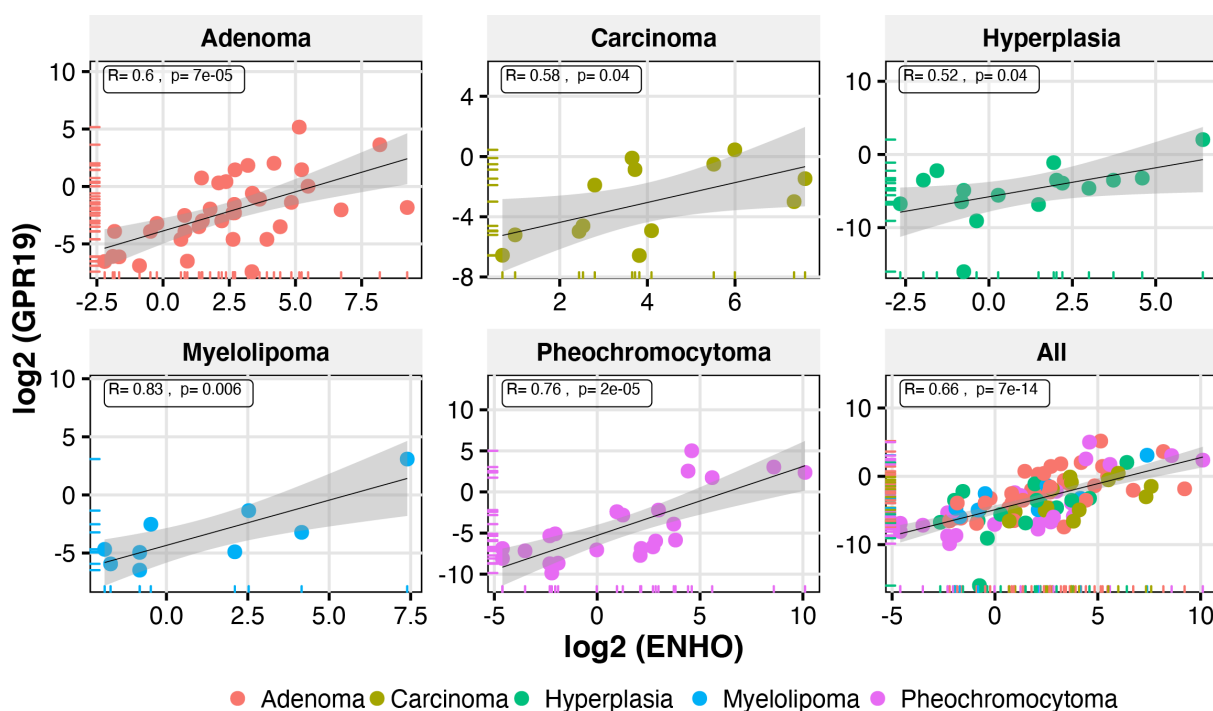
Zależności między nadnerczową ekspresją genu ENHO, a zebranymi danymi klinicznymi (Tabela 1.) określone zostały za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona. Do analizy wykorzystano uzyskane w reakcji PCR wyniki ekspresji genu ENHO od pacjentów z guzami nadnerczy, gdzie wartości zlogarytmizowanej ekspresji skorelowano z zebranymi danymi klinicznymi. Dane uzyskano w wyniku standardowej diagnostyki laboratoryjnej w czasie hospitalizacji i leczenia. Dla wszystkich danych dokonano łącznie 30 analiz dla genu ENHO oraz GPR 19. Wyniki zostały przedstawione jako macierz korelacji.



Rycina 8. Macierz korelacji Pearsona dla ekspresji genu ENHO oraz GPR19 dla wszystkich grup. Skala przedstawia intensywność koloru odpowiadającą współczynnikowi korelacji. Istotność statystyczna została zaznaczona za pomocą gwiazdek. (p<0.05 -*, p<0.01-**, p<0.001-***)

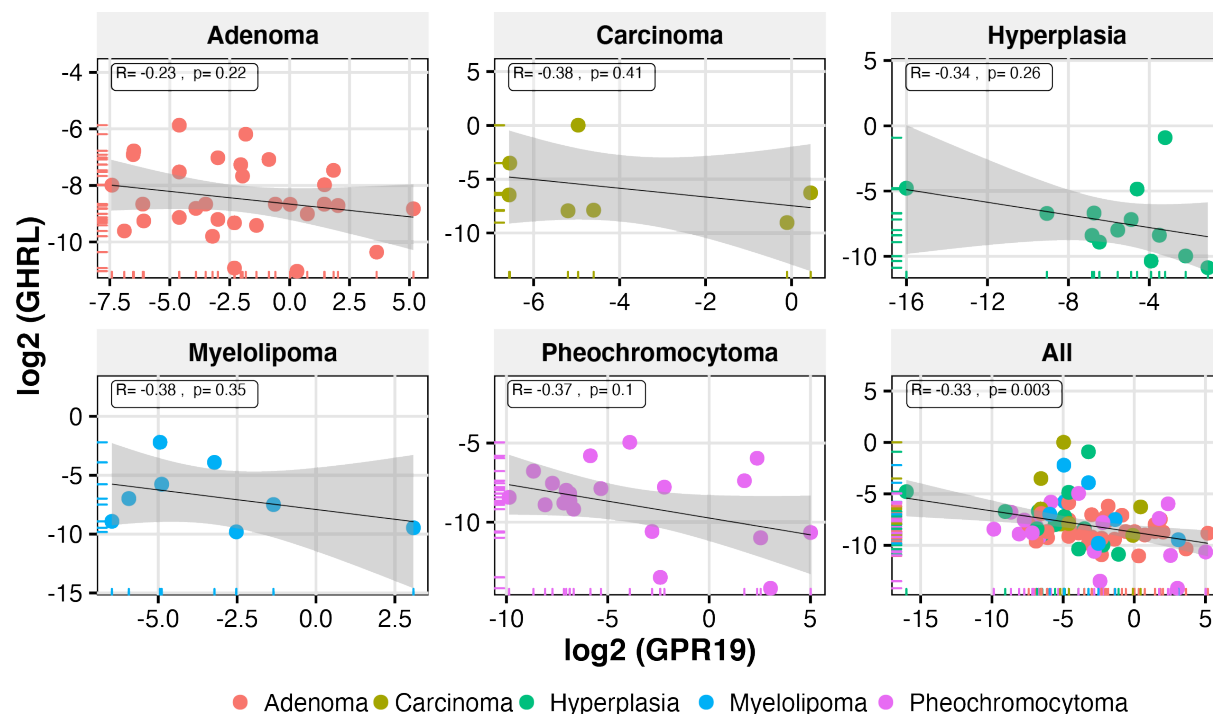
W kolejnej części dokonano szczegółowej analizy korelacji danych, w których przynajmniej w jednej analizie wszystkich przypadków zaobserwowano istotnie statystycznie różnice przedstawione na macierzy korelacji. Ze względu na fakt, iż nie wszystkie dane kliniczne były obecne dla wszystkich pacjentów, przyjęto założenie, iż korelacje dla grup obliczano tylko w przypadku, gdy $N/\text{grupa} > 3$. Dane ekspresji genów zlogarytmizowano celem zachowania normalności rozkładów.

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że we wszystkich prezentowanych, w pracy doktorskiej, typach guzów nadnerczy pomiędzy ekspresją genu GPR19, a ekspresją genu ENHO występuje silna dodatnia korelacja liniowa. Współczynnik Pearsona R jest równy 0.66, a wynik jest istotny statystycznie. Dla analizowanych przypadków wyniki mieszczą się w przedziale pomiędzy 0.52 - 0.83. Bardzo silna korelacja występuje w przypadku grupy pheochromocytoma ($R=0.76$) oraz mielolipoma ($R=0.83$). Współczynnik R dla grupy adenoma wynosi 0.6, dla carcinoma wynosi 0.58, a dla grupy hiperplazja 0.52. Wyniki w grupach: adenoma, carcinoma i hiperplazja wskazują na występowanie istotnej korelacji pomiędzy badanymi parametrami, są istotne statystycznie.



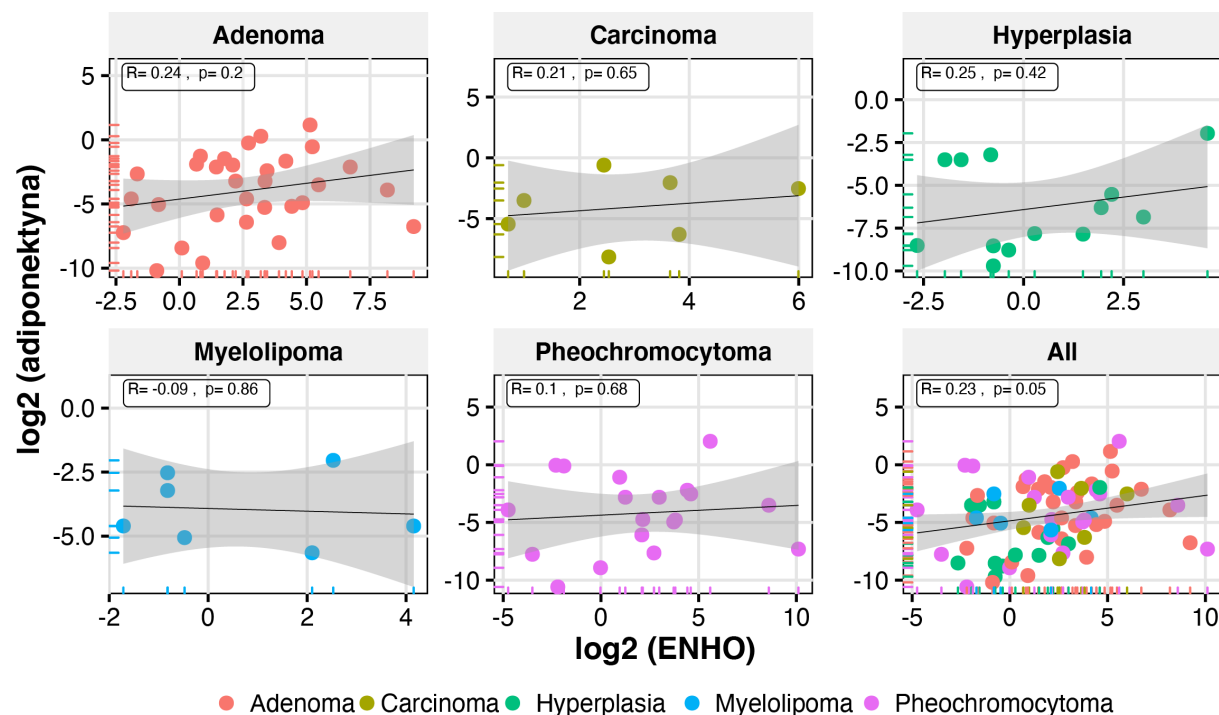
Rycina 9. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy nadnerczową ekspresją genu GPR19, a nadnerczową ekspresją genu ENHO w następujących grupach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).

W ujęciu wszystkich badanych grup z guzami nadnerczy, korelacja dla nadnerczowej ekspresji ghreliny (GHRL) u badanych pacjentów i nadnerczowej ekspresji genu GPR19, wykazuje istotność statystyczną i przedstawia umiarkowaną ujemną zależność liniową. Współczynnik R jest równy -0.33. Ujemna korelacja na poziomie umiarkowanym jest utrzymana w każdej z badanych grup, jednakże nie jest ona istotna statystycznie.



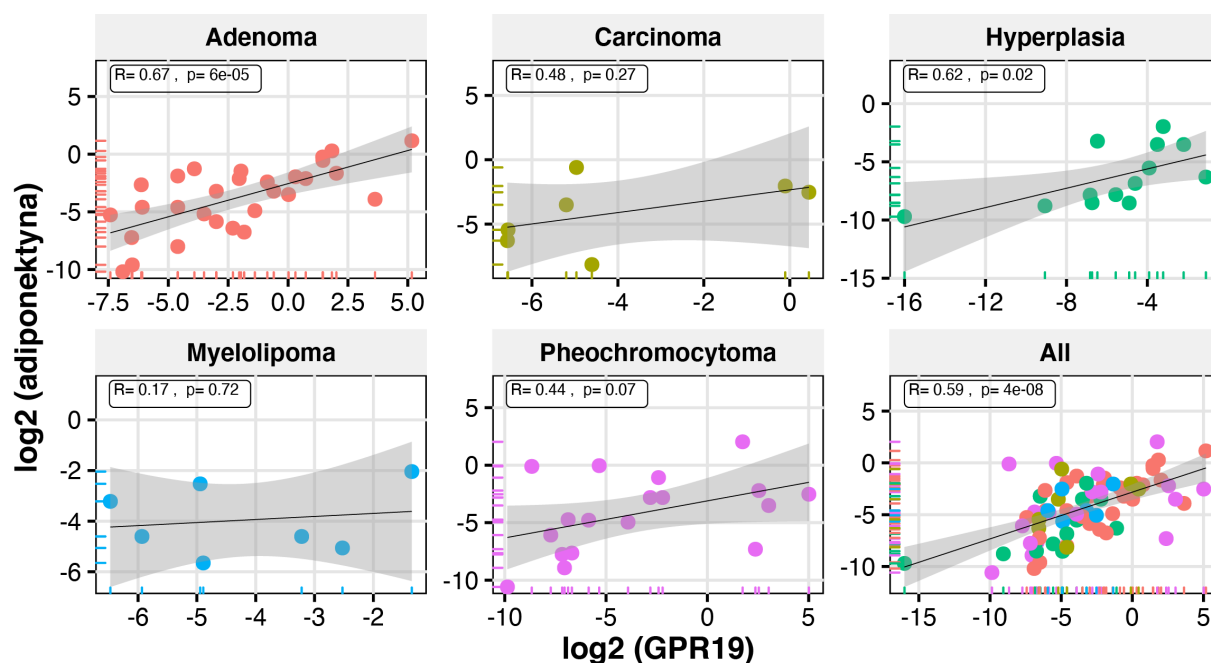
Rycina 10. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy nadnerczową ekspresją genu ghreliny (GHRL), a nadnerczową ekspresją genu GPR19 w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).

W porównaniu ekspresji adiponektyny z nadnerczową ekspresją genu ENHO współczynnik korelacji Pearsona wspólny dla wszystkich badanych grup wynosi 0.23 co określa słabą korelację między badanymi danymi. Mieści się w granicach istotności statystycznej ($p=0.05$). Podobnie jest w przypadku adenomy, carcinomy oraz hiperplazji, gdzie R wynosi odpowiednio: 0.24, 0.21 oraz 0.25. Dla pheochromocytomy R równa się 0.1. Natomiast guz typu mielolipoma. charakteryzuje się ujemnym współczynnikiem korelacji Pearsona, który wynosi -0.09. Wszystkie korelacje dla osobnych grup nie wykazują istotności statystycznej



Rycina 11. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy ekspresją adiponektyny u pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu ENHO w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).

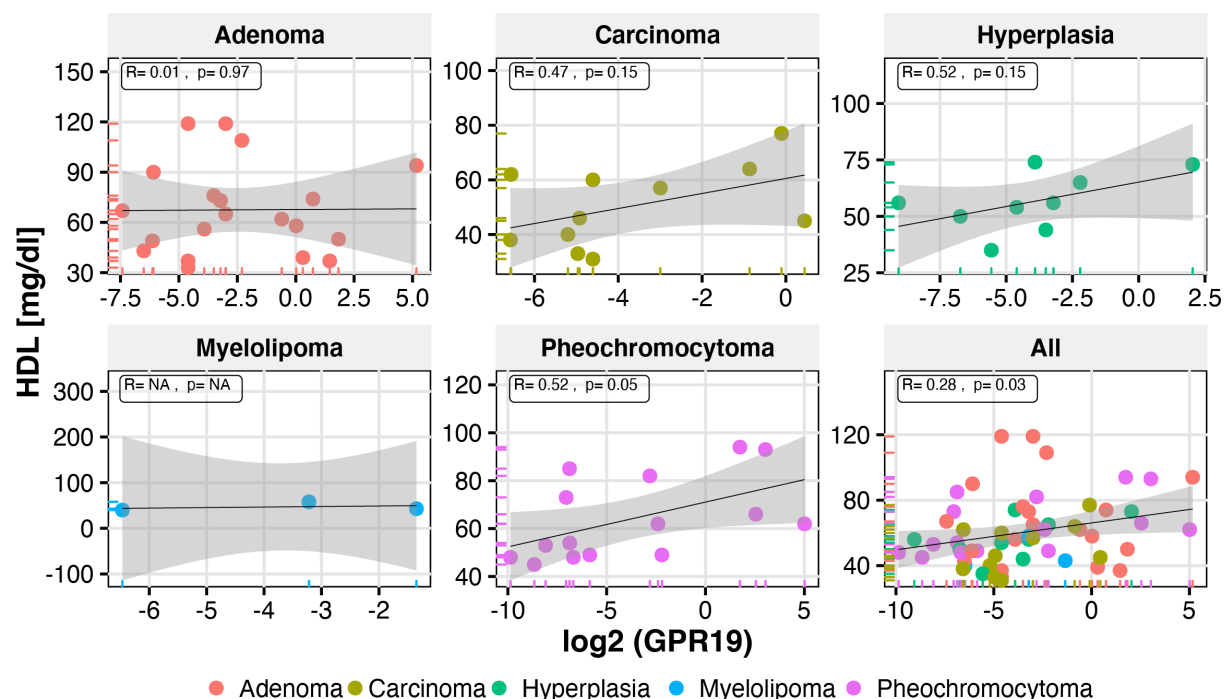
Współczynnik korelacji Pearsona pomiędzy ekspresją adiponektyny, a nadnerczową ekspresją genu GPR19 wspólny dla wszystkich grup ma wartość dodatnią, wskazującą na względnie silną zależność między badanymi grupami. Wynosi 0.59 i jest istotny statystycznie. Dodatnia korelacja występuje również w każdym z badanych typów guzów. Analizując grupy osobno, można zauważyć, że najsilniejsza korelacja dotyczy wszystkich przypadków: adenoma ($R=0.67$) i hiperplazja ($R=0.62$), są to wyniki istotne statystycznie. Dla grupy carcinoma ($R=0.48$) oraz pheochromocytoma ($R=0.44$) korelacja między badanymi parametrami jest umiarkowana oraz nieistotna statystycznie. Natomiast dla guzów mielolipoma, korelacja jest słaba ($R=0.17$) i również statystycznie nieistotna.



● Adenoma ● Carcinoma ● Hyperplasia ● Myelolipoma ● Pheochromocytoma

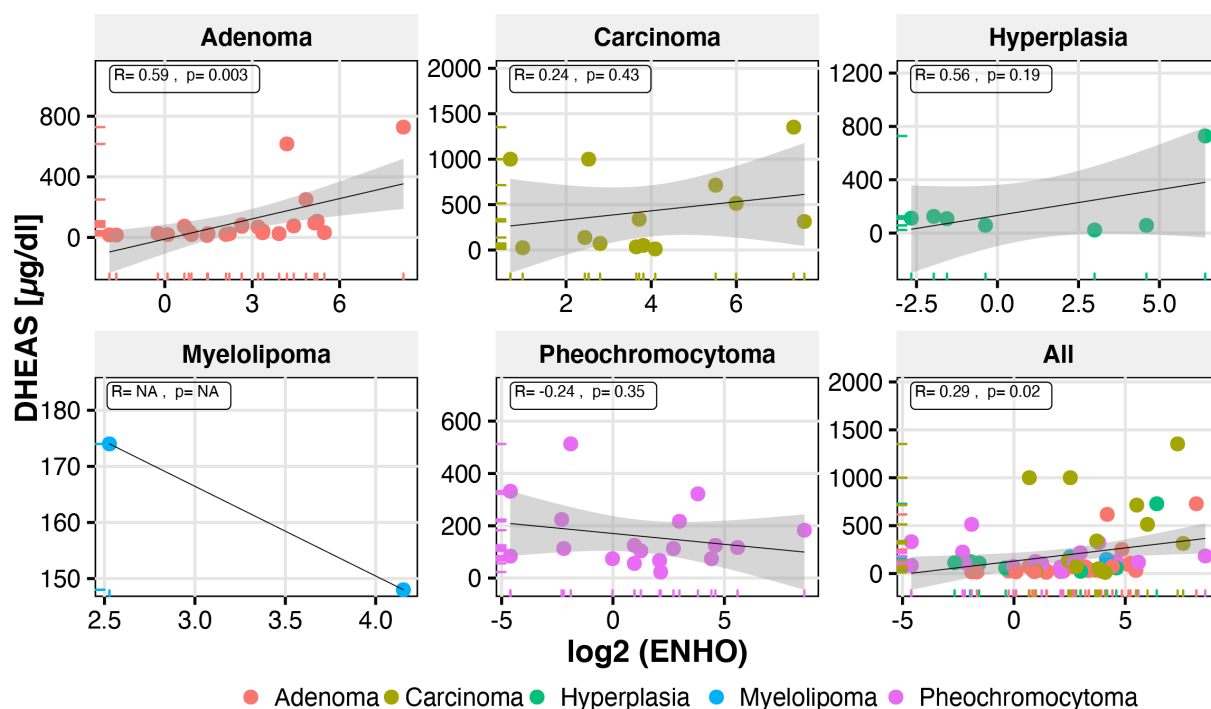
Rycina 12. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy ekspresją adiponektyny u pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu GPR19 w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).

Dla badania liniowej zależności pomiędzy stężeniem cholesterolu we frakcji HDL z krwi od pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu GPR19 we wszystkich typach guzów razem współczynnik korelacji Pearsona wynosi 0.28, a wynik wykazuje istotność statystyczną. Analizując wyniki w poszczególnych typach guza, należy zwrócić uwagę na grupę, reprezentującą umiarkowany stopień korelacji pomiędzy badanymi zmiennymi, tj. pheochromocytoma ($R=0.52$). Wynik jest na granicy istotności statystycznej. W grupie hiperplazja współczynnik R wynosi 0.52. Dla grupy carcinoma R jest równe 0.47. Wyniki w obu grupach świadczą o umiarkowanej korelacji, ale są nieistotne statystycznie. Podobnie względem istotności statystycznej wyniku jest w przypadku adenoma, gdzie współczynnik korelacji wynosi 0.01.



Rycina 13. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy stężeniem HDL w krwi od pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu GPR19 w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).

W przypadku zestawienia ekspresji ENHO oraz stężenia siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEAS) współczynnik korelacji Pearsona wspólny dla wszystkich grup wynosi 0.29, wykazuje słabą korelację, jednakże statystycznie istotną. Silna korelacja pojawia się w przypadku adenoma oraz hiperplazji. Współczynnik R dla grupy adenoma wynosi 0.59, a wynik jest istotny statystycznie. Natomiast dla grupy hiperplazja R jest równe 0.58, wynik jest nieistotny statystycznie. W grupach carcinoma ($R=0.24$) i pheochromocytoma ($R=-0.24$) współczynnik korelacji Pearsona prezentuje słabą zależność między badanymi parametrami, w tym ujemną dla pheochromocytoma. Obydwa wyniki są nieistotne statystycznie.



Rycina 14. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy stężeniem siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEAS) we krwi pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu ENHO w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).

4.3 Porównanie stężeń wydzielonej do krążenia adropiny, badanej w surowicy krwi pacjentów z różnych typów guzów nadnerczy w odniesieniu do grupy zdrowych osób (kontrola) (metoda ELISA).

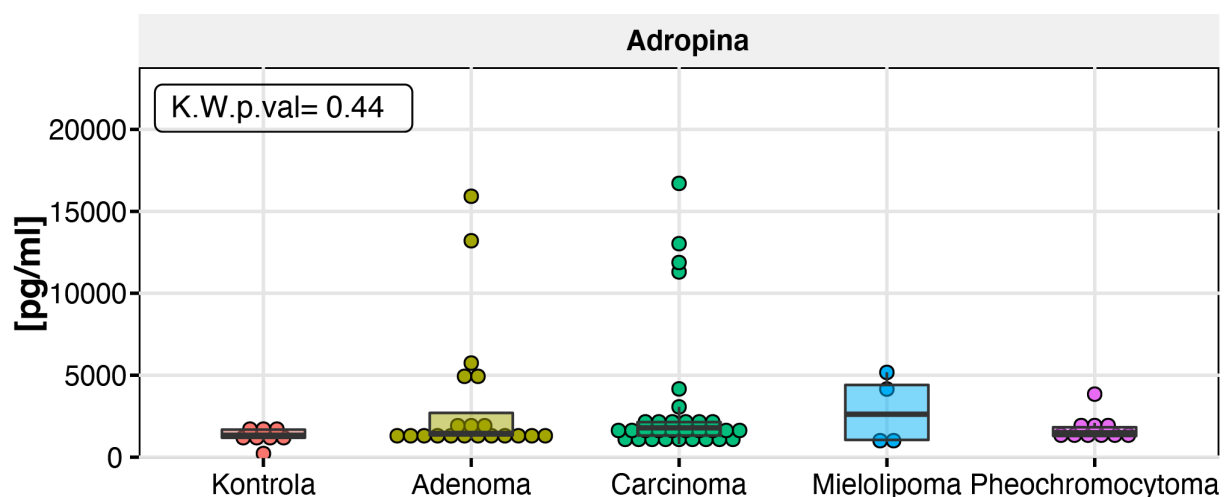
W doświadczeniu wykorzystano surowicę krwi. Krew pobrano, od pacjentów poddanych adrenalektomii, przed wdrożeniem leczenia. Dodatkowo wykorzystano surowicę, od osób zdrowych, stanowiącą grupę kontrolną. W surowicy badano stężenie adropiny za pomocą metody metody ELISA. Do sporządzenia ilościowej analizy użyto 4-paramterowy logistyczny algorytm krzywej z pakietu „drc” Bioconductor.

W celach statystycznych, do wskazania różnicy statystycznej między grupami wykorzystano test Kruskala-Wallisa. Stężenie adropiny w surowicy badano w grupach przedstawionych w niżej umieszczonej tabeli.

Tabela 14. Grupy i ich liczebność. Badanie stężenia adropiny w surowicy krwi pacjentów.

grupa	kontrola	Pheochromocytoma	Mielolipoma	Adenoma	Carcinoma
liczebność (N)	8	10	4	20	31

Uzyskano wyniki nieistotne statystycznie. Nie wykazano znaczących różnic w poziomie stężeń adropiny pomiędzy badanymi grupami. Stężenie adropiny w kontroli, w postaci mediany wynosiło 1330.6 pg/ml. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na wykresie poniżej.



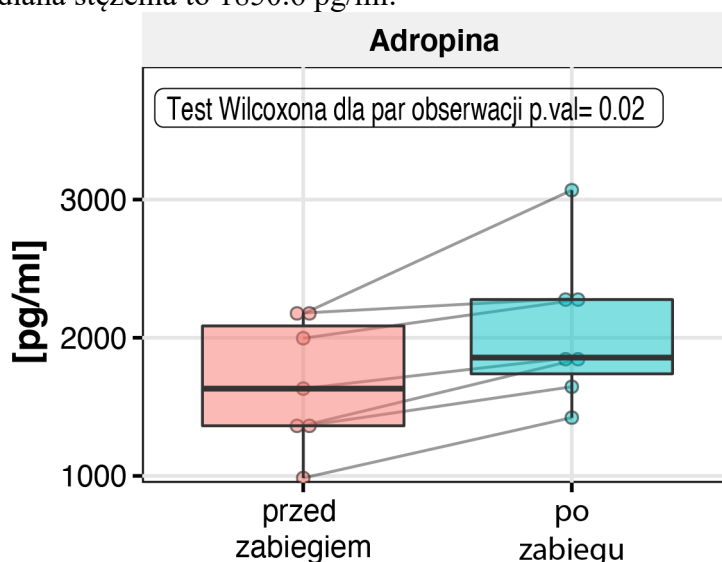
Rycina 15. Wykres pudełkowy przedstawiający poziom stężenia adropiny w surowicy krwi w grupie kontrolnej (osoby zdrowe- nadnercza prawidłowe) oraz w grupach badanych (różne typy guzów nadnerczy). Zaznaczona mediana, IQR, wartość minimum i maksimum. Ekspresja indywidualnych przypadków została przedstawiona na wykresie w postaci kropek.

Dodatkowo przeprowadzono badanie pozwalające na porównanie stężeń adropiny wydzielonej do krwi u pacjentów przed zabiegiem chirurgicznego usunięcia raka kory nadnercza (ACC) i po wykonanym zabiegu.

Materiałem, w którym mierzono stężenie adropiny była surowica krwi. Również wykorzystano metodę ELISA z analizą ilościową wykonaną przy użyciu 4-parametrowy logistycznego algorytmu krzywej z pakietu „drc” Bioconductor.

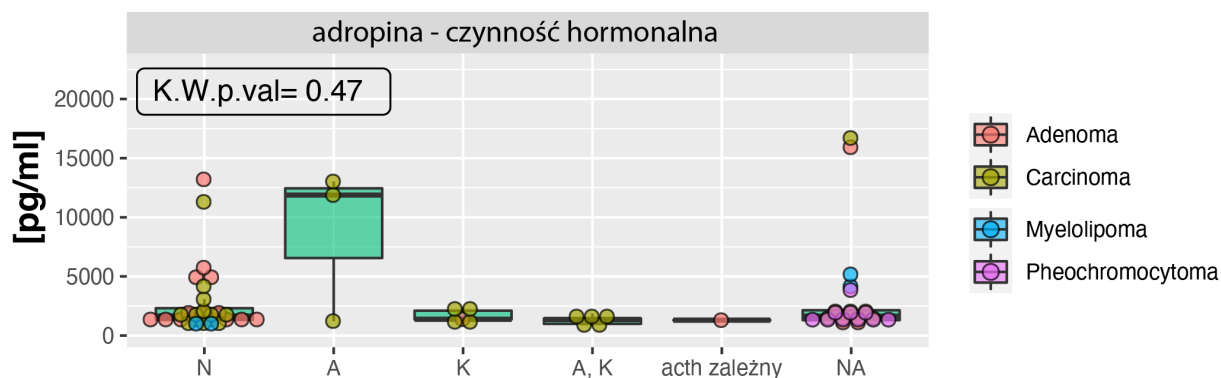
Grupa chorych, z rakiem kory nadnercza obejmowała 7 pacjentów (N=7). Uzyskano wyniki istotne statystycznie w Teście Wilcoxona dla par obserwacji.

Wyniki przedstawiono na wykresie poniżej. U każdego pacjenta można zauważyć wzrost stężeń adropiny w surowicy krwi po usunięciu guza. W obrębie grupy pacjentów przed zabiegiem mediana stężenia wynosi 1490.8 pg/ml, natomiast w grupie tych samych pacjentów, ale po zabiegu mediana stężenia to 1850.6 pg/ml.



Rycina 16. Wykres pudełkowy przedstawiający stężenie adropiny w surowicy krwi pacjentów z rakiem kory nadnercza przed zabiegiem usunięcia guza oraz u tych samych pacjentów po zabiegu usunięcia guza. Zaznaczona mediana, wartość minimum i maksimum. Ekspresja indywidualnych przypadków została przedstawiona na wykresie w postaci kropek.

Wśród pacjentów, dla których dokonano pomiaru stężenia adropiny w surowicy krwi wykonano analizę czynności hormonalnej guza. Najwyższe stężenie adropiny występowało w grupie pacjentów z guzami wydzielającymi aldosteron. W pozostałych grupach stężenie adropiny było znacząco niższe i mieściło się w podobnym przedziale wartości. W celach statystycznych, do wskazania różnicy statystycznej między grupami wykorzystano test Kruskala-Wallisa, różnicy nie wykazano, $p = 0.47$.

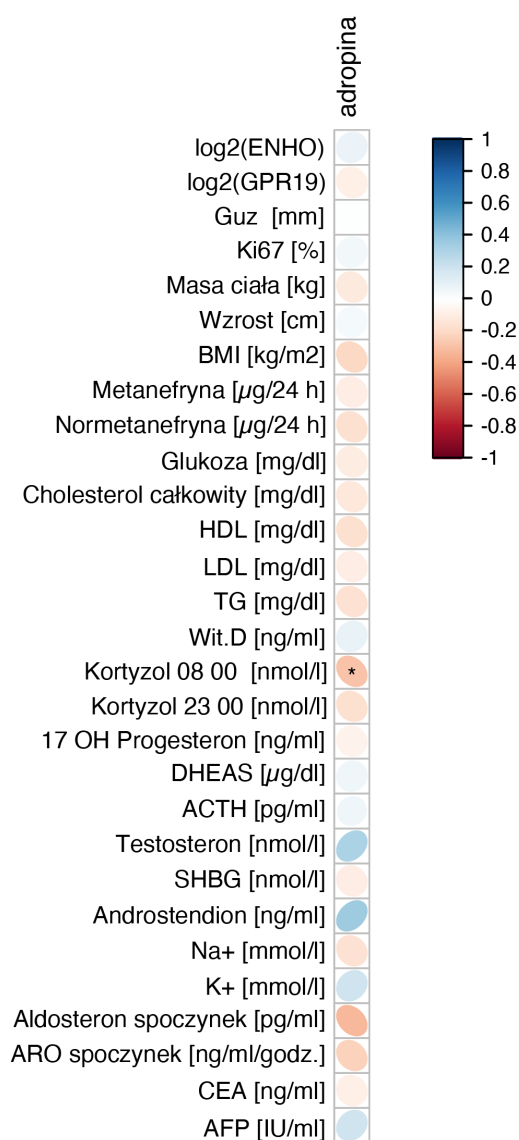


Rycina 17. Wykres pudełkowy przedstawiający czynność hormonalną guza wśród pacjentów, dla których dokonano pomiaru stężenia adropiny w surowicy krwi. Uwzględniono podział na grupy: adenoma, carinoma, mielolipoma, pheochrmocytoma. Na wykresie posłużono się skrótami literowymi, gdzie N = nieaktywny guz, A = guz wydzielający aldosteron, K= guz wydzielający kortyzol, A, K= guz wydzielający androgeny i kortyzol, acth zależny, oraz NA- brak informacji.

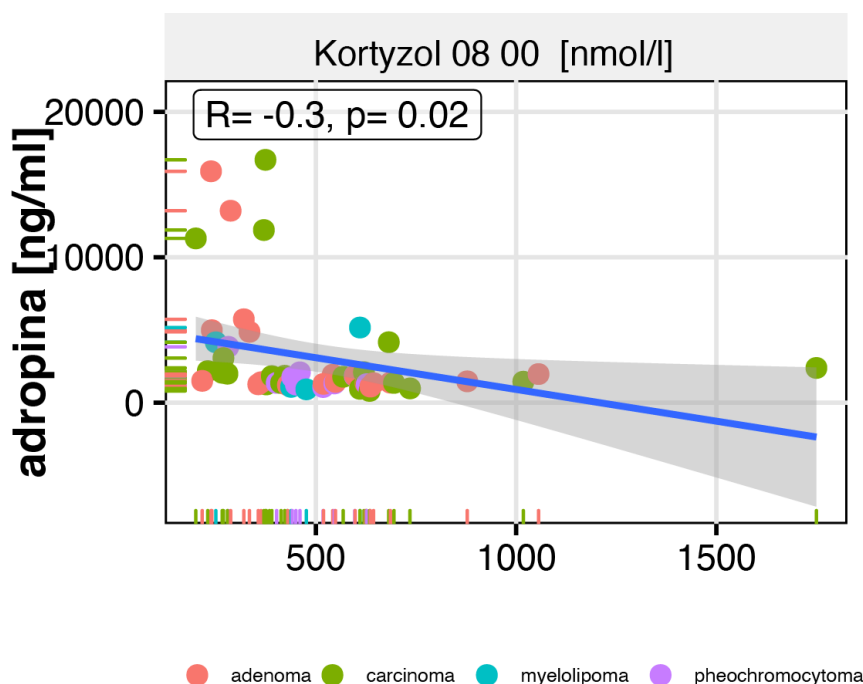
4.4 Określenie zależności między stężeniem wydzielonej adropiny, a zebranymi danymi klinicznymi (metody korelacji danych liczbowych).

Zależności między stężeniem wydzielonej adropiny do krwi, a zebranymi danymi klinicznymi (Tabela 3.) określona została za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona.

Do analizy wykorzystano wyniki stężeń adropiny w surowicy krwi pacjentów z guzami nadnerczy. Wyniki uzyskano metodą ELISA. Dodatkowo posłużono się danymi klinicznymi pacjentów z guzami nadnerczy. Dane uzyskano w wyniku standardowej diagnostyki laboratoryjnej w czasie hospitalizacji i leczenia. Ze względu na niskie liczebności oraz niepełne dane kliniczne dla wszystkich pacjentów, korelacje przedstawiono dla wszystkich typów ocenianych guzów bez podziału na podgrupy. Analogicznie jak w przypadku badań dotyczących ekspresji genu w pierwszej analizie wykonano macierz korelacji a następnie szczegółowo przedstawiono wynik korelacji liniowej.



Rycina 18. Macierz korelacji Pearsona dla adropiny oraz oznaczonych danych klinicznych. Skala przedstawia intensywność koloru odpowiadającą współczynnikowi korelacji. Istotność statystyczna została zaznaczona za pomocą gwiazdek. ($p < 0.05$ -*, $p < 0.01$ -**, $p < 0.001$ -***)



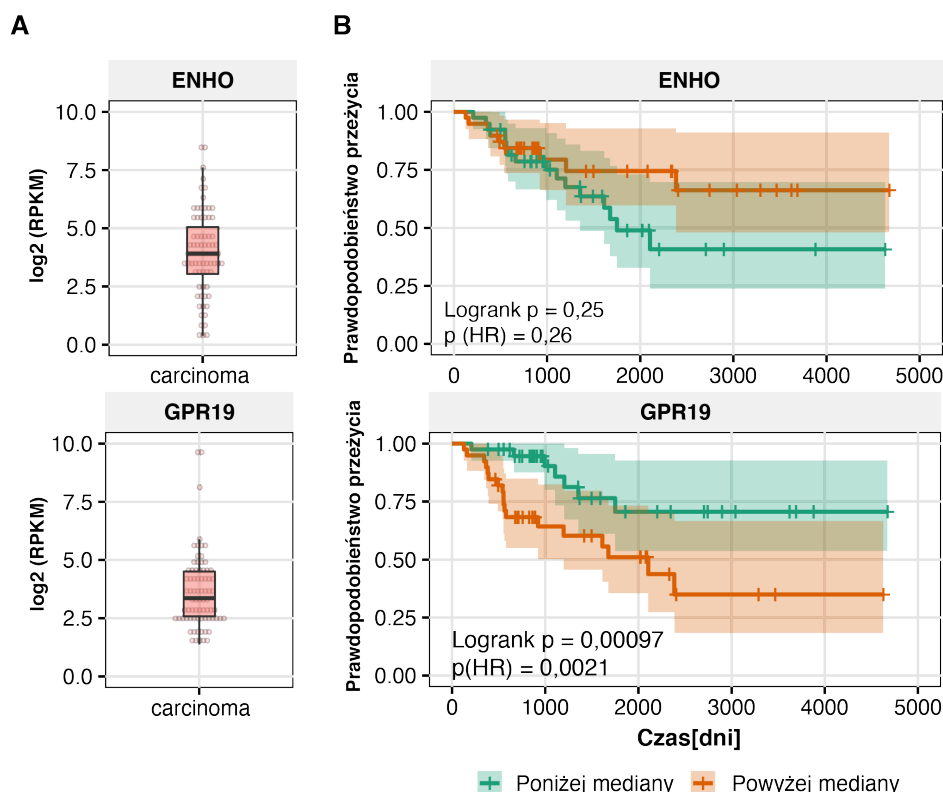
Rycina 19. Wykres liniowej korelacji pomiędzy stężeniem adropiny, a stężeniem kortyzolu w godzinach porannych- pobranie godzina 8 rano, w przypadku surowic pacjentów z uwzględnieniem grup: adenoma, carcinoma, mielolipoma i pheochromocytoma.

Dla wartości stężenia adropiny w surowicy krwi i stężenia kortyzolu w godzinach porannych, w surowicy krwi pacjentów z grup adenoma, carcinoma, mielolipoma i pheochromocytoma współczynnik korelacji Pearsona R jest równy -0.3 świadczy to o ujemnej korelacji w badanych grupach. Wynik mieści się na granicy pomiędzy słabą, a umiarkowaną korelacją i jest istotny statystycznie.

4.5 Analiza wpływu nadnerczowej ekspresji ENHO oraz GPR19 na przeżycie pacjentów z rakiem nadnerczy (analiza z wykorzystaniem danych TCGA)

Opis kliniczny wraz z danymi RNAseq dla 94 pacjentów raka nadnerczy pobrano z publicznej bazy TCGA (ang. The Cancer Genome Atlas) za pomocą serwera Fire-Browse (<http://gdac.broadinstitute.org/>). Otrzymane dane znormalizowano z zastosowaniem algorytmu voom z pakietu "Limma". Z całego zbioru danych wyodrębniono znormalizowane dane ekspresji genów dla ENHO oraz GPR19. Uzyskane zbiory ekspresji podzielono na dwie odrębne populacje, stosując jako punkt odcięcia wartości mediany: geny o ekspresji powyżej i poniżej mediany przypisano odpowiednio do grupy o wysokiej lub niskiej ekspresji. Tak przygotowane grupy poddano analizie przeżycia Kaplana-Meiera. Wykresy przeżycia z oszacowaniem wartości p (HR) oraz P log-rank wykonano przy użyciu biblioteki R "survival" na podstawie informacji o zgonach zawartej w pliku opisu klinicznego. Analogicznie do własnych wyników wykazano, iż ekspresja zarówno ENHO jak i GPR19 cechuje się pewnym rozrzutem. Przy podziale ekspresji genów na populacje powyżej oraz poniżej mediany, wykazano, iż poziom ekspresji genu ENHO nie ma istotnie statystycznego wpływu na przeżywalność pacjentów (logrank $p = 0.25$, p (HR) = 0.26), natomiast pacjenci o niskiej

ekspresji genu GPR19 cechują się istotnym statystycznie dłuższym czasem przeżycia względem pacjentów o wysokiej ekspresji genu GPR19 (logrank $p = 0,00097$, $p(HR) = 0.0021$).



Rycina 20. Analiza przeżycia z wykorzystaniem krzywych Kaplana-Meiera dla 92 przypadków raka kory nadnercza z bazy TCGA. Dane dotyczące ekspresji ENHO i GPR19 zostały podzielone na grupę o wysokiej (powyżej mediany) i niskiej ekspresji (poniżej mediany). Po lewej stronie przedstawiono profil ekspresji genów RPKM (ang. Reads per kilo base per million mapped reads).

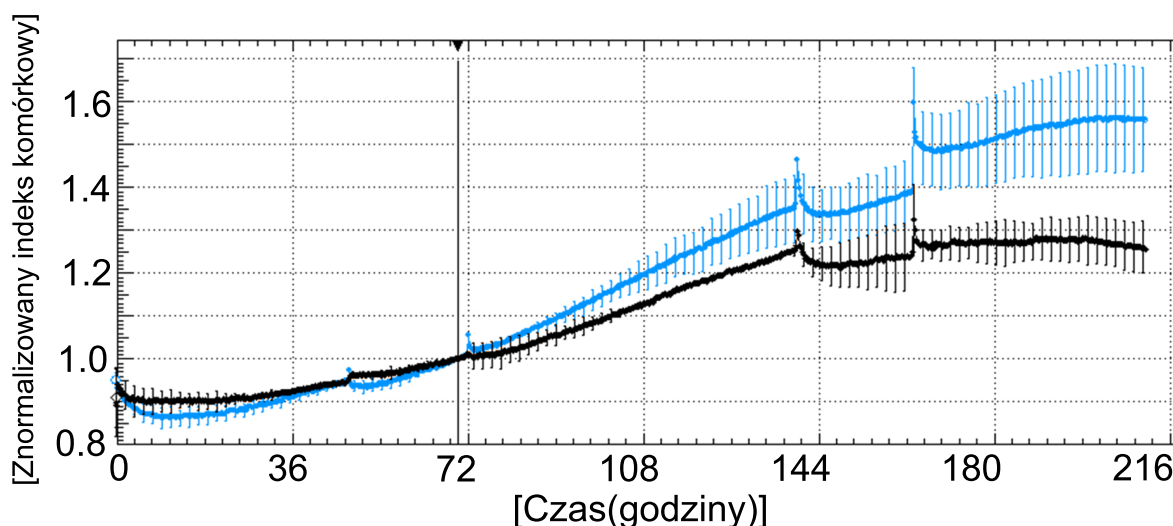
4.6 Doświadczenia z wykorzystaniem linii komórkowej HAC15 oraz pierwotnej hodowli ACC

4.6.1 Pomiar proliferacji komórek nowotworowych linii komórkowej HAC15.

Do określenia modulacji proliferacji komórek z linii hodowlanej HAC15 poddanych działaniu adropiny w układzie in vitro wykorzystano metodę z zastosowaniem xCelligence Real Time Cell Analyzer- RTCA. Pomiar impedancji dokonywany podczas proliferacji komórek, odbywał się w 15 minutowych przedziałach czasowych. Umożliwiając ocenę proliferacji komórek w czasie rzeczywistym, w sposób ciągły.

Komórki HAC 15 hodowane były jako grupa kontrolna (czyste medium hodowlane) oraz jako grupa z dodatkiem adropiny w stężeniu 10^{-8} M. Liczebność w każdej z grup wynosiła 8 (N=8/grupa).

Badanie powtórzono trzykrotnie wykazało, że adropina w znaczącym stopniu stymuluje proliferację komórek HAC15. Efekt wywierany przez adropinę utrzymywał się długotrwale, aż do zatrzymania hodowli w etapie, kiedy grupa kontrolna osiągnęła fazę plateau w 216 godzinie badania.



Rycina 21. Efekt działania adropiny w stężeniu 10^{-8} M na proliferację hodowli komórek HAC15. Na wykresie kolor niebieski reprezentuje grupę komórek poddanych działaniu adropiny. Kolor czarny przedstawia przebieg proliferacji komórek z grupy kontrolnej. Grafika przedstawia znormalizowany indeks komórkowy w czasie, w obecności adropiny. Na wykresie przedstawiono wartości średnie z 8 prób oraz SD.

4.6.2 Oznaczenie stężenia aldosteronu oraz kortyzolu wydzielanego przez komórki HAC15 pod wpływem działania adropiny.

Zbadano stężenia dwóch hormonów powstających w procesie steroidogenezy. Kortyzol będący głównym przedstawicielem glikokortykosteroidów oraz aldosteron, główny hormon mineralokortykoidowy.

Badanie przeprowadzono w hodowli HAC15, wysianej w 96 dołkowej płytce. Wykorzystano hodowlę, która osiągnęła około 70% pokrycie dna dołków hodowlanych.

W każdym przypadku wytypowano 5 grup do badania. Komórki HAC15 potraktowane adropiną w stężeniu 10^{-6} M oraz 10^{-8} M, w czasie 24 godzin. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w standardowym medium hodowlanym. Zastosowano również dwie kontrole pozytywne- komórki HAC 15 stymulowane ACTH w stężeniu 10^{-7} M oraz komórki poddane działaniu Forskoliny w stężeniu $25\mu\text{M}$, również w czasie 24h.

Stężenie kortyzolu oraz aldosteronu zostało oznaczone za pomocą metody ELISA, a ilościowa analiza przygotowana została w oparciu o 4-parametrowy logistyczny algorytm krzywej z pakietu „drc” Bioconductor.

W przypadku grupy traktowanej adropiną w stężeniu 10^{-8} M wyniki badania wskazywały na znaczące zmniejszenie stężenia aldosteronu oraz kortyzolu względem grupy kontrolnej. Adropina w stężeniu 10^{-6} M nie wpływa znacząco na zmianę poziomu sekrecji aldosteronu i kortyzolu względem grupy kontrolnej.

Tabela 15. Efekt wpływu adropiny w stężeniu 10^{-8} M na poziom sekrecji hormonów w grupie badanej komórek HAC15 względem kontroli.

	ALDOSTERON (mediana stężenia pg/ml)	KORYZOL (mediana stężenia ng/ml)
Grupa badana (N=6): Komórki HAC15 poddane działaniu adropiny (10^{-8} M) w czasie 24 h	211.4	110.21
Grupa kontrolna (N=6): Komórki HAC15	506.5	352.06

W grupie kontroli pozytywnej komórki HAC15 poddane 24 godzinnej inkubacji z ACTH w stężeniu 10^{-7} M prezentowały niewielki wzrost stężenia aldosteronu względem kontroli. Sekrecja kortyzolu w tej samej grupie badanej względem kontroli była nieznaczna.

Tabela 16. Efekt wpływu ACTH 10^{-7} M na poziom sekrecji hormonów w grupie HAC15 badanej względem kontroli.

	ALDOSTERON (mediana stężenia pg/ml)	KORYZOL (mediana stężenia ng/ml)
Grupa badana (N=6): Komórki HAC15 poddane działaniu ACTH (10^{-7} M) w czasie 24 h	612.35	383.51
Grupa kontrolna (N=6): Komórki HAC15	506.5	352.06

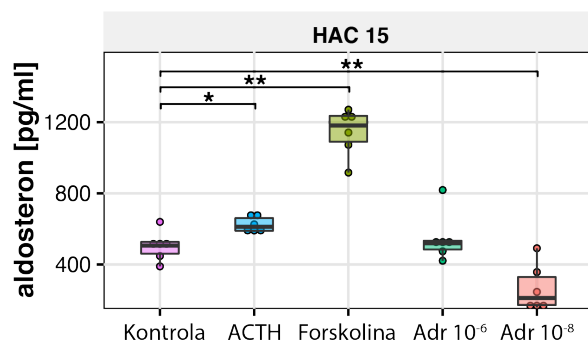
W grupie kontroli pozytywnej komórki HAC15 poddane 24 godzinnej inkubacji z Forskoliną w stężeniu $25 \mu\text{M}$ prezentowały spodziewany duży wzrost stężenia aldosteronu oraz kortyzolu względem kontroli.

Tabela 17. Efekt wpływu Forskoliny w stężeniu $25 \mu\text{M}$ na poziom sekrecji hormonów w grupie badanej HAC15 względem kontroli.

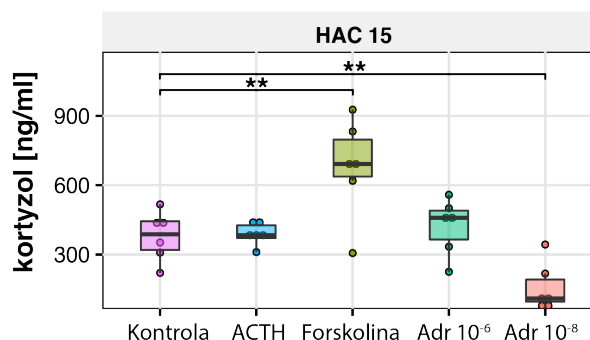
	ALDOSTERON (mediana stężenia pg/ml)	KORYZOL (mediana stężenia ng/ml)
Grupa badana (N=6): Komórki HAC15 poddane działaniu Forskoliny ($25 \mu\text{M}$) w czasie 24 h	1181.62	691.37
Grupa kontrolna (N=6): Komórki HAC15	506.5	352.06

Ostatecznie wyniki zostały przedstawione jako mediana z rozkładem kwartylowym. Do wskazania różnicy statystycznej między grupą badaną, a kontrolą wykorzystano nieparametryczny test U-Manna-Whitneya.

A



B



Rycina 22. Wydzielanie aldosteronu (A) i kortyzolu (B) przez komórki HAC15, w efekcie 24 godzinnego działania adropiny. Kontrola pozytywna komórki HAC15 potraktowane Forskoliną i ACTH przez 24 godziny. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

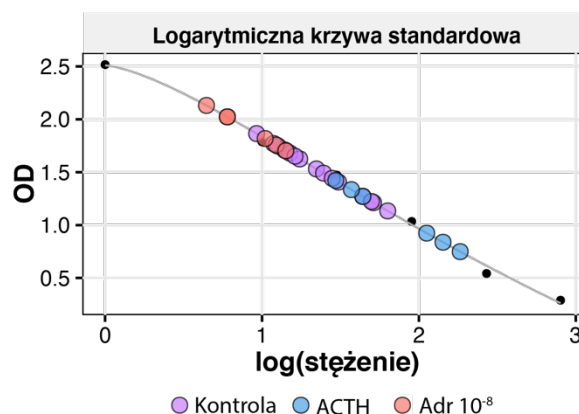
4.6.3 Oznaczenie stężenia kortyzolu wydzielanego przez komórki nowotworowe hodowli pierwotnej raka kory nadnercza pod wpływem działania adropiny.

Wykorzystano hodowlę pierwotną komórek raka kory nadnercza (ACC) inkubowaną w medium hodowlanym w czasie 24. Komórki wyjściowe do założenia hodowli pochodziły bezpośrednio z patologicznych zmian od pacjenta po zabiegu adrenalektomii, z potwierdzonym rozpoznaniem histopatologicznym. Wyodrębniono grupę badaną – komórki raka kory nadnercza inkubowane w czasie 24 z dodatkiem adropiny w stężeniu 10^{-8} M, oraz kolejną grupę komórek raka kory nadnercza inkubowaną w czasie 24 z dodatkiem ACTH w stężeniu 10^{-7} , stanowiącą jednocześnie grupę kontrolną pozytywną. Grupa kontrolna obejmowała komórki raka kory nadnercza inkubowane w standardowym medium hodowlanym.

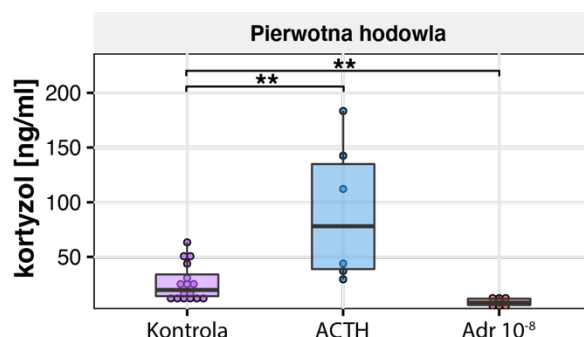
Stężenie kortyzolu zostało oznaczone za pomocą metody ELISA, a ilościowa analiza przygotowana została w oparciu o 4-parametrowy logistyczny algorytm krzywej z pakietu „drc” Bioconductor.

W przypadku grupy badanej traktowanej adropiną w stężeniu 10^{-8} M wyniki badania wskazywały na znaczące zmniejszenie stężenie kortyzolu względem grupy kontrolnej. W grupie kontroli pozytywnej komórki raka kory nadnercza w hodowli pierwotnej poddane 24 godzinnej inkubacji z ACTH w stężeniu 10^{-7} M prezentowały istotny wzrost stężenia kortyzolu względem kontroli.

A



B



Rycina 23. Wydzielanie kortyzolu przez komórki raka kory nadnercza (ACC) w hodowli pierwotnej, w efekcie 24 godzinnego działania adropiny w stężeniu 10^{-8} M. Kontrola pozytywna komórki raka kory nadnercza (ACC) w hodowli pierwotnej potraktowane ACTH w stężeniu 10^{-7} przez 24 godziny. *, $p < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Tabela 18. Efekt wpływu adropiny w stężeniu 10^{-8} M i ACTH w stężeniu 10^{-7} M na poziom sekrecji hormonu-kortyzolu w grupie komórek ACC w hodowli pierwotnej względem kontroli

	KORYZOL (mediana stężenia ng/ml)
Grupa badana (N=6): Komórki ACC w hodowli pierwotnej poddane działaniu adropiny (10^{-8} M) w czasie 24 h	8.24
Grupa badana (N=6): Komórki ACC w hodowli pierwotnej poddane działaniu ACTH (10^{-7}) w czasie 24 h	78.04
Grupa kontrolna (N=16): Komórki ACC	19.80

Wyniki zostały przedstawiono jako mediana z rozkładem kwartylowym. Do wskazania różnicy statystycznej między grupą badaną, a kontrolą wykorzystano nieparametryczny test U-Manna-Whitneya.

4.6.4 Efekt działania adropiny - ekspresja STAR, CYP11A1 oraz CYP11B1 na poziomie białka.

Przeprowadzono ilościową analizę ekspresji STAR, CYP11A1 oraz CYP11B1 na poziomie białka. Wykorzystano metodę immunofluorescencji z zastosowaniem odpowiednich przeciwciał. W doświadczeniu wykorzystano komórki HAC15 poddane działaniu adropiny, ACTH, forskoliny w czasie 24 godzin.

W celu uzyskania zdjęć reakcji zastosowano skaningowy, konfokalny mikroskop laserowy (Olympus FV10i z obiektywem z wodną imersją- 60x) z oprogramowaniem Olympus FV10-ASW. Każde zdjęcie powstało przy użyciu takiej samej mocy lasera (40% Alexa Fluor[®] 488 i 12% DAPI). W analizie densytometrycznej posłużono się oprogramowaniem ImageJ software (ImageJ 1.5q, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Wyniki przedstawiono za pomocą skorygowanej całkowitej fluorescencji komórek – CTCF (corrected total cell fluorescence), którą wyliczono na podstawie wzoru:

$CTCF = \text{gęstość zintegrowana} - (\text{powierzchnia wybranej komórki} \times \text{średnia fluorescencja odczytów tła})$.

Mediana wartości kontroli z dla każdego analizowanego białka została użyta do normalizacji przedstawionych wyników

Analiza statystyczna wyników (N= 30/ grupa) wykonana została za pomocą testu U-Manna-Whitneya.

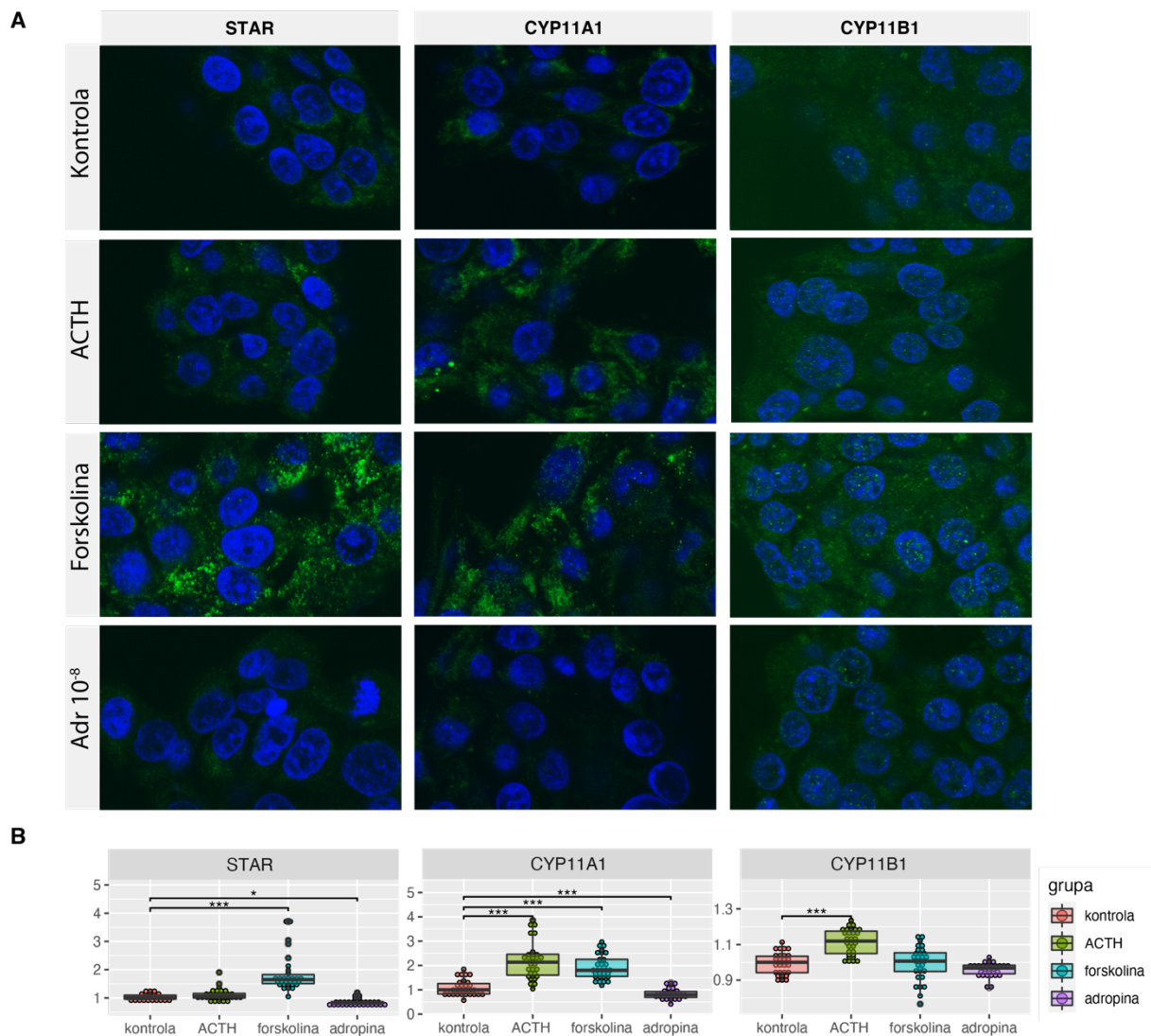
Uzyskane wyniki w hodowli komórek HAC15 inkubowanej 24 godziny z adropiną prezentują spadek ekspresji białka STAR względem kontroli. Białko CYP11A1 w odniesieniu kontroli wykazało także istotny statystycznie spadek ekspresji. Natomiast w przypadku białka CYP11B1 względem kontroli nie wykazano znaczących różnic, wynik nieistotny statystycznie.

Tabela 19. Efekt wpływu stymulacji adropiną w 24 hodowli HAC15 na ekspresję białka: STAR, CYP11A1, CYP11B1. Wyniki przedstawiono w postaci mediany z znormalizowanej wartości CTCF- skorygowanej całkowitej fluorescencji komórek.

grupa	białko	N	mediana	Q1	Q3	IQR	min	max
kontrola	CYP11A1	30	1.00	0.83	1.26	0.43	0.57	1.84
ACTH	CYP11A1	30	2.14	1.60	2.46	0.86	1.04	3.85
forskolina	CYP11A1	30	1.80	1.55	2.25	0.70	1.18	2.97
adropina	CYP11A1	30	0.80	0.69	0.93	0.24	0.41	1.29
kontrola	CYP11B1	30	1.00	0.94	1.03	0.09	0.89	1.11
ACTH	CYP11B1	30	1.12	1.05	1.18	0.13	1.00	1.24
forskolina	CYP11B1	30	1.01	0.95	1.05	0.11	0.77	1.15
adropina	CYP11B1	30	0.97	0.94	0.98	0.05	0.86	1.03
kontrola	STAR	30	1.00	0.96	1.10	0.14	0.87	1.26
ACTH	STAR	30	1.06	1.00	1.16	0.16	0.85	1.90
forskolina	STAR	30	1.65	1.51	1.83	0.32	1.05	3.72
adropina	STAR	30	0.82	0.78	0.87	0.09	0.71	1.19

W przypadku hodowli komórek HAC15 inkubowanej 24 godziny z forskoliną w profilu ekspresji białek: STAR i CYP11A1 uzyskano znaczny wzrost względem kontroli. W przypadku białka CYP11B1 nie wykazano wzrostu ekspresji względem kontroli, wynik nieistotny statystycznie.

Dodatek ACTH do hodowli komórek HAC15 i 24 godzinna inkubacja pozwoliły uzyskać słaby wzrost ekspresji białka STAR. Białko CYP11A1 wykazało ekspresję większą od kontroli. Natomiast w przypadku białka CYP11B1 można wnioskować, że stymulacja ACTH wpłynęła na zmiany w profilu ekspresji białka względem grupy kontrolnej.

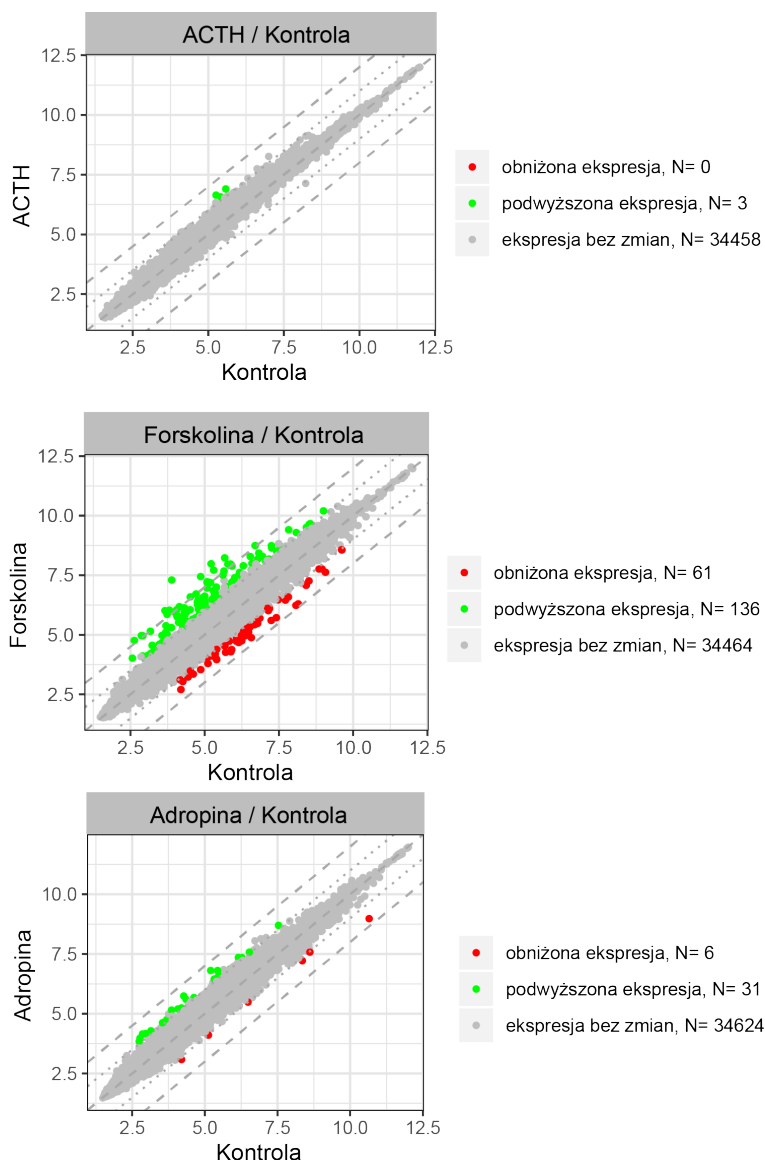


Rycina 24. Immunoekspresja STAR, CYP11A1, CYP11B1 w hodowli komórek HAC15. Obrazowe wyniki (A) komórek z linii HAC15 dla grup badanych: komórki inkubowane przez 24h z ACTH, forskoliną i adropiną, oraz grupy kontrolnej. Pozytywna reakcja wiązania przeciwciała została uwidoczniiona w kolorze zielonym, jądra komórkowe zostały wybarwione w kolorze niebieskim za pomocą odczynnika DAPI. Zdjęcia-konfokalny mikroskop laserowy (Olympus FV10i z obiektywem z wodną imersją- 60x). (B) Densytometryczna analiza intensywności fluorescencji (N= 30/grupa). W analizie statystycznej wykorzystano test U Manna-Whitneya. *, $p < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

4.6.5 Wpływ adropiny na regulację profilu transkryptomycznego komórek HAC15.

Do analizy transkryptomu wykorzystano mikromacierze Affymetrix Gene Chip Human Genome U219 Array Strips, które umożliwiły jednoczesne zbadanie ekspresji ponad 34 tysięcy genów. Badanie transkryptomu przeprowadzono 24 godziny po dodaniu do medium hodowlanego ACTH, forskoliny lub adropiny. Profil transkryptomyczny porównywano z grupą komórek hodowanych w czystym medium (kontrola). Ogólny profil zmian transkryptomu przedstawiono w postaci wykresu punktowego. Przyjęto następujące kryteria selekcji genów różnicujących: absolutna różnica w krotności ekspresji (fold) > 2 oraz p po korekcie wielokrotnego testowania $\leq 0,05$. Zgodnie z tymi kryteriami ekspresja tylko trzech genów uległa

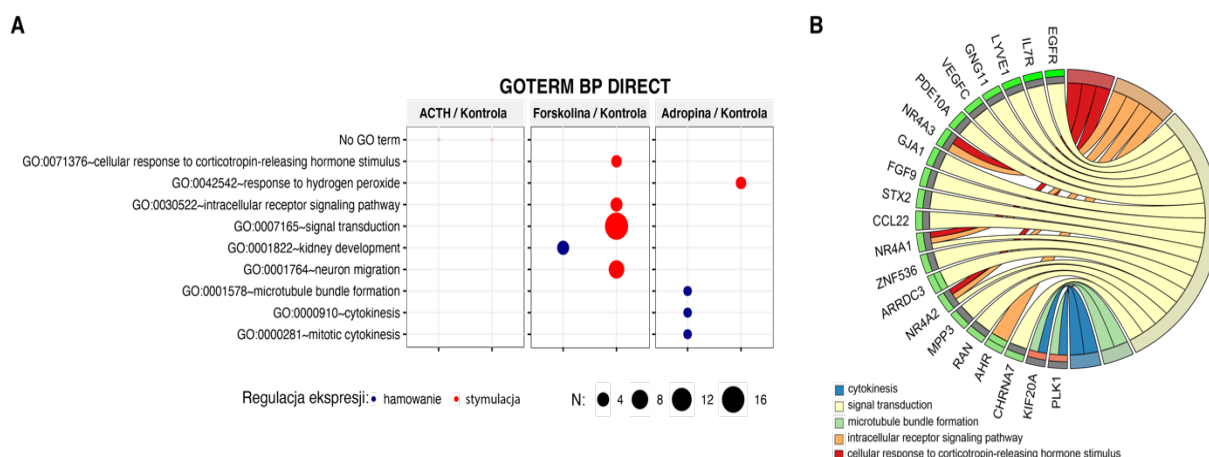
obniżeniu po ACTH. Profil transkryptomu był najsilniej regulowany przez forskolinę gdzie 136 genów było podwyższonych a 61 obniżonych względem grupy kontrolnej. Adropina prowadziła do spadku ekspresji 6 genów oraz wzrostu 31 genów.



Rycina 25. Wykres typu punktowego przedstawiający zależność profili transkryptomicznych komórek HAC15 inkubowanych z ACTH, forskoliną lub adropiną. Porównanie przedstawiono między ACTH a kontrolą (górny panel), forskoliną a kontrolą (środkowy panel) oraz adropiną a kontrolą (dolny panel). Każdy punkt określa indywidualny gen. Geny o podwyższonej ekspresji zaznaczono zielonym kolorem, natomiast geny o obniżonej ekspresji - czerwonym. Geny uznane za nieróżnicujące zaznaczono szarym kolorem.

W celu określenia procesów biologicznych, które najprawdopodobniej mogą być regulowane przez adropinę, ACTH lub forskolinę, wykonano analizę wzbogacenia genów różnicujących w obrębie grup ontologicznych bazy GO BP (ang. Gene Ontology Biological Process). Do określenia roli genów różnicujących wykorzystano bazę danych ontologii genów David (ang. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), za pośrednictwem pakietu "RDAVIDWebService" języka programistycznego R. Przy wykorzystaniu pakietu "BACA" otrzymane dane zwizualizowano na wykresach bąbelkowych (ang. bubble plot). Jako punkt odcięcia dla wzbogaconych grup ontologicznych przyjęto $p < 0.05$. Dla porównania ACTH względem kontroli nie wykazano wzbogacenia żadnej z analizowanych grup ontologicznych.

Prawdopodobnie wynika to z faktu niewielkiej liczby genów różnicujących wprowadzonych do analizy w tej grupie (N=3). W przypadku porównania forskoliny względem grupy kontrolnej wykazano iż geny różnicujące o podwyższonej ekspresji względem kontroli istotnie uczestniczą w regulacji następujących grup ontologicznych: odpowiedź komórkowa na kortykoliberynę (ang. cellular response to corticotropin-releasing hormone stimulus), wewnątrzkomórkowa receptorozależna ścieżka sygnalizacyjna (ang. intracellular receptor signaling pathway), transdukcja sygnału (signal transduction), oraz migracja neuronów (ang. neuron migration). Forskolina hamowała ekspresję genów uczestniczących w rozwoju nerki (ang. kidney development). W przypadku analizy efektu wywieranego przez adropinę względem grupy kontrolnej należy zauważyć, iż adropina istotnie statystycznie stymulowała geny uczestniczące w odpowiedzi na nadtlenek wodoru (ang. response to hydrogen peroxide) oraz hamowała ekspresję genów uczestniczących w następujących procesach biologicznych: tworzenie pęczków mikrotubul (ang. microtubule bundle formation), cytokineza (ang. cytokinesis), cytokineza mitotyczna (ang. mitotic cytokinesis). Z uwagi na niską liczebność genów różnicujących, należy zaznaczyć, iż liczebność samych regulowanych grup ontologicznych była również bardzo niska. Szczegółowa analiza genów uczestniczących w wybranych grupach ontologicznych przedstawiono jako wykres kołowy, gdzie geny w porównaniu forskolina/kontrola przedstawiono na zewnątrz pod nimi geny porównania adropina/kontrola. W przypadku adropiny zaobserwowano zahamowanie ekspresji genów KIF20A (ang. kinesin family member 20A, zmiana krotności ekspresji= -2,19) oraz PLK1(ang. polo-like kinase 1 zmiana krotności ekspresji= -2,05). Wykazano też podwyższoną ekspresję genu ARRDC3 (ang. arrestin domain containing 3 zmiana krotności ekspresji= 2,25)



Rycina 26. Analiza grup ontologicznych regulowanych przez badane substancje A) Wykres bąbelkowy przedstawiający wzbogacone grupy ontologiczne genów różnicujących w trzech analizowanych porównaniach. Na wykresie przedstawiono tylko te grupy ontologiczne, które spełniają ustalone kryteria odcięcia ($p < 0,05$). Wielkość każdego bąbelka odzwierciedla liczbę genów uczestniczących w danej grupie ontologicznej Czerwony kolor bąbelka oznacza, że ekspresja genów, danej grupy GO, jest podwyższona, natomiast niebieski kolor odpowiada obniżonej ekspresji. B) Szczegółowa analiza pięciu wzbogaconych grup ontologicznych genów z bazy danych DAVID GO BP, przedstawiona w postaci wykresu kołowego. Symbole genów różnicujących przedstawiono po lewej stronie wykresu wraz z ich wartościami fold change, odwzorowanymi za pomocą skali kolorów (zielony = wyższa ekspresja; czerwony = niższa ekspresja). Kolor szary odpowiada ekspresji poniżej wartości odcięcia. Kolorowe linie łączące określają przynależności genów do poszczególnych grup ontologicznych.

5 Dyskusja

Dane z piśmiennictwa wskazują, że szereg bioaktywnych peptydów takich jak: adiponektyna, oreksyna, leptyna, ghrelina bierze udział w regulacji homeostazy metabolicznej organizmu, a także wpływają na funkcjonowanie nadnerczy (4,64–66). Efekt ten może być wywierany pośrednio, poprzez oś podwzgórzowo-przysadkowo- nadnerczową lub bezpośrednio oddziałując na komórki kory lub rdzenia nadnerczy. Poza fizjologicznym wpływem wyżej wymienionych peptydów, wykazano, iż mogą one modulować procesy patologiczne w tym nowotworzenie i w ten sposób mogą pełnić istotną funkcję w patogenezie guzów nadnerczy. W tym kontekście dość dobrze opisano funkcję ghreliny, gdzie wykazano, iż ekspresja mRNA ghreliny jest podwyższona w guzach nadnerczy ze szczególną nadekspresją w rakach nadnerczy. Dodatkowo wykazano także iż sama ghrelina znacząco, w sposób dawkowo zależny stymuluje proliferację i migrację linii komórkowej H295R wywodzącej się z nowotworu nadnerczy (4). W niniejszej rozprawie doktorskiej założono hipotezę, że adropina również może pełnić istotną rolę w patogenezie guzów nadnerczy. Ponad 10 lat badań nad adropiną dostarczyło wielu cennych informacji na temat modulowania przez nią metabolizmu glukozy i lipidów, a także wykazało jej wpływ na proliferację różnych typów komórek. Jednakże jej rola w patogenezie guzów nadnerczy nie była wcześniej przedmiotem badań.

Ogólnodostępne bazy danych m.in. NCBI Gene dostarczają informacji o ekspresji genu ENHO w różnych ludzkich narządach, również w nadnerczach. Należy zwrócić uwagę, iż zarówno gen kodujący adropinę (ENHO) oraz receptor - GPR19 ulegają ekspresji w nadnerczach człowieka. Ekspresja ta nie jest znaczna, jednakże ze względu na fakt ekspresji zarówno receptora jak i samej adropiny w tym samym narządzie, można przypuszczać, że potencjalny efekt wywierany przez adropinę na nadnercza może zachodzić także na drodze auto lub parakrynowej. Do tej pory ekspresja genu ENHO na poziomie mRNA w chorobach nowotworowych nie była praktycznie poruszana w literaturze.

W badaniach zaprezentowanych w pracy doktorskiej porównano ekspresję genu kodującego adropinę (ENHO) oraz jej receptora (GPR19) w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy. W tym celu wykorzystano skrawki nadnerczy pochodzące ze zmian usuniętych pacjentom zakwalifikowanym do adrenalektomii z powodu stwierdzenia czynności hormonalnej zmiany lub z powodu podejrzenia złośliwości guza. Wyniki uzyskano dzięki metodzie qPCR. Nie otrzymano znaczących różnic w poziomach ekspresji genu ENHO pomiędzy porównywanymi grupami guzów. Podobnie było też w porównaniu ekspresji pomiędzy badanymi grupami guzów, a grupą kontrolną. Jedynie nieznaczny wzrost poziomu ekspresji genu ENHO można zauważyć pomiędzy grupą raka kory nadnercza, a kontrolą. Warto zwrócić również uwagę, że najniższy poziom ekspresji genu ENHO wystąpił w grupie mielolipoma- guzach, które są nieaktywne hormonalnie. Należy jednak podkreślić, że otrzymane wyniki dla ekspresji genu ENHO na poziomie mRNA były nieistotne statystycznie. Badania wstępne obejmujące mniejszą grupę pacjentów również wskazywały na podwyższenie poziomu ekspresji w przypadku grupy raka kory nadnerczy, dodatkowo wskazywały na wzrost ekspresji w grupie adenoma. Jednak analiza większej ilości przypadków adenoma, lecz dalej niskiej, dokonana w niniejszym doktoracie, tego nie potwierdziła. W związku z powyższym należy zwrócić uwagę na podstawowe ograniczenie przeprowadzonych badań. Ograniczeniem tym jest stosunkowo niewielka liczebność grup poddanych badaniu. Ograniczenie to jest istotne w odniesieniu do ekspresji genów w typach guzów które cechują się dość znaczną heterologią, a niewątpliwie guzy i nowotwory nadnerczy należą do takiej grupy. Być może późniejsze

badania na większej liczbie guzów nadnerczy pozwolą na bardziej jednoznaczną ocenę ekspresji genu ENHO w różnych typach guzów nadnerczy człowieka. Niestety w bazie TCGA występują tylko profile transkryptomyczne dla raka nadnercza, a brak jest danych dla grupy kontrolnej, czy chociażby dla fragmentów nadnerczy przyległych do zmiany nowotworowej. W związku z powyższym nie możemy odnieść otrzymanych wyników do baz referencyjnych. Jak wiadomo rak nadnerczy jest wysoce złośliwy i wywodzi się z komórek kory, w których zachodzi steroidogeneza (12,63). W niniejszych badaniach większość guzów ACC wykazywała aktywność hormonalną. W sytuacji, gdyby wyniki okazały się istotnie statystycznie podwyższony poziom ekspresji genu ENHO na poziomie mRNA mógłby świadczyć o udziale adropiny w rozwoju guzów wywodzących się z kory nadnercza o wysokiej złośliwości oraz przemawiać za potencjalnym wpływem adropiny na steroidogenezę nadnerczową. W dalszej części badania porównano ekspresję genu kodującego receptor (GPR19) w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy. W przypadku genu potencjalnego receptora dla adropiny- GPR19 poziom ekspresji był istotnie statystycznie podwyższony względem grupy kontrolnej w grupach: adenoma, mielolipoma, carcinoma. W przypadku hiperplazji nadnerczy ekspresja GPR19 również była podwyższona, ale była ona nieistotnie statystycznie. Dla guzów pheochromocyoma nie wykazano różnic w poziomie ekspresji mRNA GPR19 w odniesieniu do grupy kontrolnej. Grupy, w których ekspresja GPR19 na poziomie mRNA jest podwyższona, mimo odmiennej struktury histologicznej, posiadają cechę wspólną- obecność kropli lipidowych w cytoplazmie. Należy jednak zaznaczyć, że krople lipidowe w zależności od grupy występują w zróżnicowanej ilości. Jak powszechnie wiadomo wewnątrzkomórkowe krople lipidowe są magazynem estrów cholesterolu, który jest prekursorem nadnerczowej steroidogenezy (67). Charakterystyczna dla struktury histologicznej guzów adenoma jest obecność mikroskopijnych kropli lipidowych wewnątrz cytoplazmy. Są one obecne w najbardziej typowych przypadkach adenoma, jednak według dostępnej literatury od 10. do 40. procent tego typu guzów jest uboga w lipidy (68).

W prowadzonych badaniach blisko połowa z badanych 41 gruczolaków kory nadnercza wykazywała aktywność hormonalną. Mielolipoma zbudowana jest z dojrzałych elementów tkanki tłuszczowej oraz składowych hematopoetycznych szpiku kostnego. Nawet w potocznym mianownictwie można się spotkać z nazwą szpiczakotłuszczak (69). Struktura histologiczna raka kory nadnerczy również posiada krople lipidowe jednak należy podkreślić, że są one najmniej liczne w porównaniu do mielolipoma czy adenoma. Rak kory nadnercza w 50-70 procentach przypadków wykazuje czynność hormonalną(67). W naszym materiale w 8 z 13 badanych raków stwierdzono nadprodukcję kortyzolu lub/i androgenów.

Wspólną cechą dla adenoma oraz carcinoma jest również fakt, iż występują w korze nadnerczy. Ekspresja GPR19 w przypadku guza wywodzącego się z rdzenia nadnerczy - pheochromocyoma, nie różniła się od ekspresji GPR19 w grupie kontrolnej. Co potwierdza sugestię, iż GPR19 na poziomie mRNA może wiązać się z obecnością lipidów w guzach, a także ma związek z ich lokalizacją i pochodzeniem guza. Przedstawiona wyżej analiza wymaga jednak dalszych badań, w celu jej weryfikacji. W przyszłości warto przeanalizować większą grupę badanych guzów, a także prześledzić ich dokładną morfologię i budowę histologiczną w odniesieniu do ekspresji GPR19. Przegląd literatury dostarcza kilku informacji na temat ekspresji GPR19 w innych typach nowotworów. Dotyczy to m.in. badań na ludzkiej linii komórkowej raka piersi MDA-MB-231 (ATCC® HTB26™), w której wykazano wzrost ekspresji GPR19 (45).

W dalszej części badań określono stężenie adropiny wydzielonej do krążenia u pacjentów z omawianymi guzami oraz w grupie osób zdrowych. Uzyskano wyniki, które częściowo pokrywają się z omówioną wyżej ekspresją genu ENHO na poziomie mRNA. Mianowicie tak, jak w przypadku ekspresji genu ENHO nie wykazano istotnie statystycznie różnic badanych grup względem kontroli, tak również w przypadku stężenia krążącej adropiny nie wykazano

znaczących różnic względem kontroli we wszystkich badanych grupach. Nie wykazano również znaczących różnic w poziomie stężeń pomiędzy badanymi grupami. Stężenie adropiny w grupie kontrolnej, u osób zdrowych wyniosło 1330.6 pg/ml (1,3 ng/ml). Gdzie opublikowane prace donoszą, że standardowe stężenie adropiny we krwi mieści się w przedziale 3,5-10 ng/ml (41,42). Inne dane pozwalają na rozszerzenie tego zakresu. Nergiz i współautorzy prezentują własne badania, gdzie posługują się grupą kontrolną w postaci surowic pochodzących od zdrowych kobiet, a oznaczone za pomocą metody ELISA stężenie adropiny w tej grupie mieści się w zakresie od 1 do 2 ng/ml (70).

Istnieją tylko nieliczne dane literaturowe dotyczące stężeń adropiny wydzielanej do krwi u pacjentów z innymi chorobami nowotworowymi, jak rak endometrium czy rak piersi (70,71).

W realizowanych badaniach dodatkowo przeanalizowano, jak zmienia się stężenie wydzielonej do krwi adropiny u pacjentów z rakiem kory nadnercza przed leczeniem oraz po usunięciu chirurgicznym guza. Grupa badana ze względu na rzadkość występowania raka kory nadnercza ograniczona była tylko do 7 prób. Kolejnym ograniczeniem wpływającym na liczebność grupy była kwestia materiału do badań, który we wszystkich przypadkach musiał być pobrany w ten sam sposób. Uzyskano jednak wyniki istotne statystycznie. Pacjenci z rakiem kory nadnercza przed leczeniem mieli niższy poziom stężeń adropiny we krwi w porównaniu do odpowiednich wyników po zabiegu chirurgicznym usunięcia guza. Wprawdzie badania Nergiza i Tuny nie porównują stężeń adropiny przed i po zabiegu w raku endometrium czy piersi, jednak jasno wskazują, że poziom stężeń adropiny wydzielonego do krążenia w przypadku obecności nowotworu jest niższy, niż w przypadku kontroli. Podobną zależność można zauważyć w wyżej opisanych wynikach. Uzyskany wynik może sugerować, że adropina nie jest wydzielana w zauważalnych ilościach przez patologicznie zmienione nadnercza, gdyż po adrenalektomii jej poziom wzrasta. Otrzymany wynik jest jednak zgodny z profilem ekspresji genu ENHO oraz danymi sugerującymi, iż głównym źródłem wydzielanej do krążenia adropiny jest wątroba (40). Otrzymane dane sugerują, że nadnercza nie są istotnym źródłem wydzielanej adropiny u człowieka. Wzrost stężeń adropiny po adrenalektomii może wynikać z poprawy profilu metabolicznego, w przypadku zmian hormonalnie czynnych. Wpływ może mieć również włączone leczenie mitotanem lub objawy uboczne z nim związane, jak hipercholesterolemia.

W następnej części badań dokonano określenia zależności między nadnerczową ekspresją ENHO, GPR19, a zebranymi danymi klinicznymi pacjentów oraz ekspresją innych genów. Wykorzystano w tym celu współczynnik korelacji liniowej Pearsona, a dla wszystkich danych dokonano łącznie 30 analiz dla każdego genu. Kluczowym wynikiem jest występowanie silnej dodatniej korelacji pomiędzy ekspresją genu GPR19, ekspresją genu ENHO występującej we wszystkich badanych grupach. Jest to informacja, która świadczy o tym, że w nadnerczach ekspresja genu ENHO jak i receptora GPR19 ulega regulacji w podobny sposób, jednak kwestia w jaki pozostaje dalej otwarta. Na chwilę obecną wiemy, że aktywacja GPR19 za pośrednictwem adropiny aktywuje szlak MAPK/ERK1/2 (45). Ta wyżej zaprezentowana koregulacja w szczególności podkreśla związek adropiny z jej receptorem. Ekspresja ENHO oraz GPR19 silnie koreluje ze sobą we wszystkich badanych grupach. Może to świadczyć o auto i parakrynowym wpływie adropiny na komórki zarówno rdzenia jak i kory nadnerczy podczas procesu kancerogenezy.

Warto zwrócić również uwagę na pozostałe istotne statystycznie wyniki korelacji pomiędzy ekspresją genu ENHO i GPR19, analizowanymi parametrami. Część z nich wykazuje związek z regulacją steroidogenezy nadnerczowej.

Pomiędzy ekspresją adiponektyny, a ekspresją genu ENHO, jak i GPR19 we wszystkich guzach występuje korelacja. W przypadku zestawienia z ekspresją ENHO jest to słaba korelacja dodatnia, natomiast dla ekspresji GPR19 korelacja jest silnie dodatnia. Jako najprostsze spostrzeżenie można uznać, że adropinę oraz jej receptor łączy związek z tkanką tłuszczową.

Związek pomiędzy dwoma hormonami widoczny jest również w zakresie ich działania. Adiponektyna jest hormonem polipeptydowym uznawanym za czynnik endokrynologiczny uwalniany z tkanki tłuszczowej. Pełni m.in.: funkcje przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe oraz powoduje wzrost insulino-wrażliwości (72).

Z działaniem przeciwmiażdżycowym również można powiązać stężenie HDL. Butler i współautorzy określili ścisłą korelację pomiędzy adropiną osoczną, a stężeniem HDL, sugerując powiązanie pomiędzy adropiną i metabolizmem lipidów. W przypadku niniejszej pracy, spodziewano się podobnych wyników, w odniesieniu do ekspresji nadnerczowej adropiny. Jednak uzyskane wyniki nie spełniały założeń istotności statystycznej. Pomiedzy ekspresją GPR19, a stężeniem HDL wykazano dodatnią korelację istotną statystycznie.

Ponadto dodatnią korelację Pearsona wykazano pomiędzy stężeniem siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEAS) we krwi pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu ENHO w omawianych guzach. Zważywszy na to, że siarczan dehydroepiandrosteronu jest hormonem steroidowym wytwarzanym przez nadnercza, a jak wykazano w badaniach prowadzonych na modelu komórkowym adropina ma hamujący wpływ na steroidogenezę, należy przeanalizować ten aspekt w przyszłości.

Ujemną korelację wykazano pomiędzy ekspresją ghreliny, a ekspresją GPR19. Jak wiadomo, ghrelina jest endogennym ligandem stymulującym wydzielanie hormonu wzrostu. Poprzez swoje działanie wpływa na homeostazę energetyczną organizmu. Jej rola została również wpisana w regulację procesów dotyczących progresji raka nadnerczy. Jak wcześniej wspomniano nadekspresja ghreliny została wykazana w guzach nadnerczy, szczególnie w raku kory nadnercza (4). Ghrelina swój efekt fizjologiczny wywierają również przez receptor z rodziny GPCR- GHSR (receptor pobudzający wydzielanie hormonu wzrostu)(73–75).

Zbadano również zależności między stężeniem wydzielonej adropiny do krwi, a zebranymi danymi klinicznymi. Zależność określona została jak wcześniej, za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona. Uzyskano tylko jeden wynik istotny statystycznie, spośród 29 wykonanych analiz. Jednak bardzo znaczący, spójny z wynikami uzyskanymi z zastosowaniem modelu komórkowego. Wynik dotyczy istotnie statystycznej korelacji ujemnej pomiędzy stężeniem krążącej adropiny, a stężeniem kortyzolu w godzinach porannych- pobranie materiału do badań godzina 8.00. Wyniki dotyczą pacjentów z guzami adenoma, carcinoma, mielolipoma i pheochromocytoma. Korelacja sugeruje, że adropina wpływa na aktywność kory nadnerczy, powodując obniżenie poziomu stężenia kortyzolu prawdopodobnie poprzez hamowanie steroidogenezy. Zostało to również wykazane w badaniach opartych na modelu komórkowym, omówionych w dalszej części dyskusji.

Wykonanie analiz przeżycia związanych z ekspresją ENHO oraz GPR19 przy wykorzystaniu krzywych Kaplana-Meiera dla 94 przypadków raka kory nadnercza z bazy TCGA pokazało pewien rozrzut w wynikach ekspresji obu genów. Rozrzut w wynikach ekspresji był również widoczny w prezentowanych badaniach własnych. Najprawdopodobniej jest to wynikiem tego, że zarówno poziom ekspresji ENHO, jak i krążącej adropiny jest modulowany przez różne czynniki. Między innymi może to być skład diety, wiek, płeć jak i również sama heterogenność nowotworów nadnerczy (76). Badane grupy pod względem wyżej wymienionych czynników mogą być niejednorodne. Analiza przeżycia związana z ekspresją genu ENHO wykazała, że poziom ekspresji tego genu nie ma istotnego statystycznie wpływu na przeżywalność pacjentów. Natomiast ekspresja genu GPR19 wpływa na przeżycie pacjentów. Wiadomym jest, że rodzina białek GPCR odgrywa istotną rolę w przebiegu raka poprzez zarówno poprzez stymulację jak i hamowanie jego rozwoju. Włączając w to proliferację, migrację, inwazję i przerzuty, a także przeżywalność (77). A to z kolei znajduje przełożenie na stan kliniczny, komfort i czas życia pacjenta. W omawianym przypadku analiza

wykazała, że niski poziom ekspresji GPR19 wiąże się z dłuższym czasem przeżycia pacjentów. Co mogłoby wskazywać, że w przypadku raka kory nadnerczy niska ekspresja GPR19 może stanowić pozytywny czynnik prognostyczny w przebiegu raka kory nadnerczy. Powyższy wniosek wymaga jednak dalszych badań. Wysoka ekspresja genu GPR19 może także stanowić czynnik uwrażliwiający komórki nadnerczy na krążącą adropinę. Zwiększenie ekspresji receptora na powierzchni nowotworowych komórek nadnerczy może prowadzić do zwiększenia intensywności interakcji adropina- receptor GPR19 co może prowadzić do stymulacji podziałów komórek nowotworowych. Z powyższą hipotezą są zgodne nasze wyniki badań z wykorzystaniem linii komórkowej wywodzącej się z nowotworów nadnerczy - HAC15, gdzie wykazano, iż adropina istotnie stymuluje proliferację hodowanych komórek.

W dalszej części dyskusji omówione zostaną wyniki badań z zastosowaniem modelu komórkowego.

Zastosowanie w niniejszych badaniach metod z wykorzystaniem komercyjnej linii komórkowej HAC15 pozwoliło na weryfikację wcześniejszych założeń dotyczących adropiny jako peptydu pełniącego znaczącą rolę w biosyntezie hormonów kory nadnerczy. W dostępnych badaniach naukowych o różnych założeniach, ale posługujących się ludzkimi liniami komórkowymi raka kory nadnercza częściej można spotkać się z wykorzystaniem komercyjnej linii NCI-H295 (78,79). American Type Culture Collection prezentuje linię HAC15 jako wyodrębnioną klonalnie z komórek NCI-H295r, które zaadaptowano z linii komórek pluripotencjalnego raka kory nadnercza NCI-H29. Do prezentowanych badań wybrano model linii komórkowej HAC15. Zadecydowały cechy różniące komórki HAC15 od komórek linii, z której się wywodzi. Mianowicie zdolność reagowania na ACTH, bardziej stabilny fenotyp steroidogenny oraz dobra odpowiedź na forskolinę (80).

Wiadomym jest, że hormony kory nadnerczy powstają w procesie steroidogenezy. W jej wyniku powstają biologicznie aktywne hormony: mineralokortykoidy, glukokortykoidy i androgeny. Część z guzów nadnerczy wywodzi się z komórek steroidogennych i może powodować nadprodukcję wyżej wymienionych hormonów steroidowych. To z kolei może powodować różne zespoły kliniczne m.in. zespół Cushinga, zaburzenia powodujące nadmiar androgenów nadnerczowych, pierwotny aldosteronizm (81). Z tego też względu kolejnym punktem prowadzonych badań była ocena roli adropiny w podstawowej funkcji fizjologicznej komórek kory nadnercza. W badaniach sprawdzono jak adropina wpływa na wydzielanie aldosteronu oraz kortyzolu przez komórki HAC15. Komórki raka kory nadnerczy linii HAC15 dzięki swoim właściwościom do wydzielania mineralokortykoidów, glukokortykoidów i androgenów doskonale sprawdziły się przy weryfikowaniu hipotezy jakoby adropina odgrywała znaczącą rolę w procesie nadnerczowej steroidogenezy. Otrzymano istotne wyniki, które wskazują na to, że adropina obniża sekrecję zarówno aldosteronu jak i kortyzolu. Stężenia obu hormonów w hodowli HAC15 traktowanej adropiną w stężeniu 10^{-8} M są znacznie niższe w odniesieniu do grupy kontrolnej. Po dokonanych przeglądzie literaturowym okazuje się, że brakuje badań dotyczących bezpośredniego wpływu adropiny na regulację steroidogenezy nadnerczowej. Wiedząc jak działa mechanizm regulacji osi podwzgórzowo- przysadkowo- nadnerczowej stworzony został model kontroli pozytywnej dla komórek HAC15 z wykorzystaniem ACTH. Tak, jak oczekiwano model potwierdził wzrost poziomu sekrecji hormonów przez komórki HAC15, po stymulacji ACTH. Jednak był on nieznaczny. Dodatkowo sprawdzony został inny model kontroli pozytywnej. Badane komórki potraktowane zostały forskoliną. Jest to diterpen wyizolowany z indyjskiej rośliny *Coleus forskohlii*, o potwierdzonym wpływie na regulację biosyntezy steroidów poprzez zwiększenie

wewnątrzkomórkowego cAMP drogą aktywacji cykazy adenylowej (82,83). Z tego powodu zastosowanie forskoliny znajduje zastosowanie w badaniach nad steroidogenezą. Asif i współautorzy zajmowali się badaniem efektu forskoliny na sekrecję kortyzolu w hodowli komórkowej NCI- H295R, z której to wywodzi się hodowla użyta w badaniach w niniejszej rozprawie doktorskiej. W badaniach Asifa i wsp. Za pomocą metody RIA wykazano, że forskolina znacząco zwiększa sekrecję kortyzolu w badanej grupie komórek (84). Również Taylor i współautorzy w swoich badaniach dotyczących wpływu syntetycznego HDL na steroidogenezę komórek HAC15, wytypowali grupę traktowaną forskoliną jako grupę kontroli pozytywnej. Opisane przez nich wyniki wskazywały na wzrost sekrecji kortyzolu przez omawiane grupy komórek (85). W niniejszej pracy uzyskano podobne wyniki. Efekt wpływu forskoliny na poziom sekrecji hormonów w grupie badanej HAC15 przedstawiał się jako dwukrotny wzrost stężenia aldosteronu i kortyzolu względem kontroli.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej posłużono się jeszcze jednym modelem komórkowym. Wykorzystano pierwotną hodowlę komórek adenocarcinoma. Tak jak w wyżej omówionym modelu, również w modelu hodowli pierwotnej zaobserwowano obniżenie sekrecji kortyzolu pod wpływem adropiny oraz zwiększoną sekrecję kortyzolu po stymulacji ACTH komórek hodowli pierwotnej adenocarcinoma. Udowodnione w powyższych układach, hamujące działanie adropiny dostarcza istotnych informacji o wpływie omawianego białka na regulację procesu steroidogenezy w guzach nadnerczy. Przede wszystkim wskazany zostaje ogólny- hamujący mechanizm działania białka. Adropinę można zaliczyć do szeregu aktywnych peptydów wpływających na aktywność kory nadnerczy poprzez bezpośrednie hamowanie steroidogenezy. Podobne, hamujące działanie na proces steroidogenezy nadnerczowej wykazują: przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP) (86), torebkowy peptyd anty steroidogenny (BASP) (87), peptyd natriuretyczny typu B (BNP) (88) oraz tyreotropina (TRH) (89).

Wiadomym jest, że cholesterol pełni rolę prekursora, w procesie powstawania hormonów steroidowych. Liczne modyfikacje jego struktury oraz dostępność, odpowiadają za powstanie steroidów kory nadnerczy. Proces jest możliwy dzięki enzymom pełniącym ściśle określone funkcje (61,81). Mając na uwadze fakt, w jaki adropina wpływa na wydzielanie kortyzolu i aldosteronu postanowiono poznać wpływ omawianego peptydu na ekspresję głównych enzymów steroidogenezy na poziomie białka. Dokonano ilościowej analizy ekspresji STAR, CYP11A1 oraz CYP11B1 na poziomie białka w hodowli HAC15, za pomocą immunofluorescencji z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał. Zarówno STAR, jak i CYP11A1 są obecne we wszystkich strefach kory nadnerczy. STAR odpowiada za transport cholesterolu z mitochondrialnej błony zewnętrznej do wewnętrznej, gdzie CYP11A1 dokonuje przekształcenia cholesterolu w pregnenolon, który jest związkiem wyjściowym dla reszty hormonów steroidowych. Można podsumować, że dwa wyżej wymienione enzymy biorą udział w zapoczątkowaniu steroidogenezy. Z kolei CYP11B1 jest enzymem markerowym dla strefy pasmowatej odpowiedzialnym za konwersję 11-deoksykortyzolu w kortyzol (56,61,81). Obecne badania w hodowli HAC15 poddanej działaniu adropiny ujawniły istotny spadek ekspresji białka STAR oraz CYP11A1 względem kontroli. W przypadku białka CYP11B1 nie odnotowano znaczących różnic względem kontroli, wynik nie był istotny statystycznie. Konsekwentnie sprawdzono również działanie forskoliny oraz ACTH w takim samym modelu badania. Efektem działania forskoliny był wysoki wzrost ekspresji białek CYP11A1 i STAR względem kontroli. Natomiast dla CYP11B1 nie odnotowano znaczących zmian w ekspresji względem kontroli, wynik nie był istotny statystycznie. Dla ACTH wzrost ekspresji występuje w przypadku każdego z badanych enzymów. Jednak zmiany w ekspresji STAR są najmniejsze.

Powyższe wyniki ekspresji białka można zestawić z wynikami sekrecji hormonów przez komórki z hodowli HAC15. Warto zauważyć, że efekt, który wywiera adropina na komórki raka kory nadnercza jest taki sam zarówno, jeśli chodzi o ekspresję kluczowych enzymów steroidogenezy na poziomie białka, jak i o sekrecję hormonów. W obu przypadkach adropina wykazuje hamujące działanie. Zahamowanie o różnym nasileniu ekspresji enzymów biorących udział w transporcie i początkowych przekształceniach cholesterolu przekłada się na zmniejszoną lub zahamowaną produkcję hormonów steroidowych. W przypadku forskoliny i ACTH powyższe wyniki również wpisują się we wcześniej przedstawiony trend, zgodny z fizjologią nadnerczy. Jak już wcześniej wspomniano, wiele guzów nadnerczowych może powodować nadprodukcję hormonów steroidowych, stąd rola adropiny w regulacji steroidogenezy nabiera ogromnego znaczenia. W przypadku uzyskania wyniku istotnego statystycznie Interesującym mógłby wydawać się przypadek wpływu adropiny na regulację białka CYP11B1, gdzie ekspresja jest praktycznie niezmienną względem kontroli. Mając na uwadze fakt, że hiperplazja nadnerczy może być powodowane między innymi poprzez niedobory enzymatyczne, jak np. CYP11B1, a tym samym nagromadzeniem się 11-deoksykortykosteronu, deoksykortyzolu oraz nadmierną produkcją aldosteronu (33,34,90), nasuwa się potrzeba głębszej analizy wpływu adropiny i dalszych badań w obrębie grupy hiperplazja.

Podczas prowadzenia badań sprawdzony został wpływ adropiny na proliferację komórek nowotworowych HAC15. Według danych literaturowych omawiany peptyd wpływa stymulująco na proliferację różnych grup komórek. W badaniach na liniach nowotworowych ludzkiego raka piersi MDA-MB-231 wykazano, że adropina stymuluje proliferację wyżej wymienionych komórek. Powstały wnioski, mówiące o tym, że peptyd ten razem ze swoim przypuszczalnym receptorem wpływa na ekspresję E-kadheryny i promuje fenotyp nabłonkowy wykorzystując szlak MAPK/ ERK1/2 w przypadku mezenchymalnego raka piersi (45,76). Stymulujący wpływ adropiny na proliferację wykazano również w przypadku fibroblastów 3T3-L1, a także pierwotnych komórek preadipocytów szczurzych poprzez szlaki sygnałne ERK 1/2 i AKT (91). Wykazano również, że adropina poprzez indukowanie ekspresji NOS i biodostępności NO powoduje migrację i proliferację komórek śródbłonna, a także przyczynia się do powstawania nowych naczyń (48). Shahjouei w swojej pracy przytacza badania, które przedstawiają wpływ omawianego białka między innymi na neurogenezę i regenerację neuronów. Dzieje się to poprzez aktywację PI3K/Akt przez adropinę, co wpływa na proliferację i cykl komórkowy komórek nerwowych (52). W omawianej rozprawie doktorskiej do pomiaru proliferacji komórek nowotworowych raka kory nadnerczy z linii HAC15 pod wpływem adropiny wykorzystano metodę z zastosowaniem xCelligence Real Time Cell Analyzer-RTCA. Pomiar rejestrujący zjawisko impedancji odbywał się w układzie *in vivo*. Uzyskano wyniki wskazujące na znaczny wpływ adropiny na hodowlę HAC15, w odniesieniu do kontroli. Istotny wzrost proliferacji grupy badanej zauważono po dodaniu adropiny w 72 godzinie trwania hodowli. Od tamtego momentu komórki HAC wykazywały zwiększoną zdolność proliferacyjną względem grupy kontrolnej, która to w 216 godzinie trwania hodowli osiągnęła wartość plateau dla proliferacji. Podczas gdy komórki HAC15 dalej wykazywały długotrwały wzrost. W opublikowanych danych, których jestem współautorką wykazaliśmy, że ekspozycja danej linii komórkowej na badany peptyd wykazuje aktywność proliferacyjną poprzez szlak, w którym pośredniczy ERK1/2 i AKT.

Przy interpretacji wpływu adropiny na proliferację komórek z fenotypem raka kory nadnercza warto odnieść się do wyników uzyskanych w analizie przeżycia związanej z ekspresją ENHO oraz GPR19 przy wykorzystaniu krzywych Kaplana-Meiera, gdzie wykazano gorszą przeżywalność pacjentów z wysoką ekspresją genu GPR19. Być może świadczy to, o niekorzystnym wpływie adropiny na rozwój choroby nowotworowej.

Kolejnym punktem dyskusji jest analiza profilu transkryptomowego komórek HAC15, wykonanego za pomocą mikromacierzy. Badanie pozwoliło na ocenę molekularnych aspektów wpływu adropiny, forskoliny i ACTH w hodowli HAC15. Wykorzystanie mikromacierzy umożliwiło jednocześnie zbadanie około 35 tysięcy ludzkich transkryptów. Uzyskane wyniki wskazują, że profil transkryptomu był najsilniej regulowany przez forskolinę, w przypadku której 136 genów było podwyższonych a 61 obniżonych względem grupy kontrolnej. Adropina prowadziła do spadku ekspresji 6 genów oraz wzrostu 31 genów. Natomiast wpływ ACTH przełożony został na obniżenie ekspresji tylko 3 genów. Aby uzyskać funkcjonalny profil genów najsilniej regulowanych w doświadczeniu i lepiej zrozumieć procesy biologiczne, w które są zaangażowane, zastosowano analizę wzbogacenia genów w obrębie grup ontologicznych bazy GO BP oraz wykorzystano bazę danych ontologii genów David. Wyniki dostarczyły wielu interesujących informacji.

Dla grupy forskoliny porównanej względem grupy kontrolnej wykazano, że geny różnicujące o podwyższonej ekspresji względem kontroli istotnie uczestniczą w regulacji następujących grup ontologicznych: odpowiedź komórkowa na kortykoliberynę (ang. cellular response to corticotropin-releasing hormone stimulus), wewnątrzkomórkowa receptorozależna ścieżka sygnalizacyjna (ang. intracellular receptor signaling pathway), transdukcja sygnału (signal transduction), oraz migracja neuronów (ang. neuron migration). Forskolina hamowała ekspresję genów uczestniczących w rozwoju nerki (ang. kidney development). Szczegółowa analiza wzbogaconych grup ontologicznych genów pozwoliła na wytypowanie genów różnicujących. W grupie biorącej udział w regulacji odpowiedzi komórkowej na kortykoliberynę oraz wewnątrzkomórkowej receptorozależnej ścieżki sygnalizacyjnej możemy wyróżnić geny: NR4A2, NR4A1, NR4A3. Wymienione geny należą do rodziny receptorów jądrowych wewnątrzkomórkowych czynników transkrypcyjnych NR4A. Są one zaangażowane w proces stanu zapalnego, apoptozę oraz kontrolę cyklu komórkowego. Doniesienia literaturowe wskazują, że NR4A1, znany również jako Nurr77 jest indukowany w neuronach uwalniających hormon kortykotropinę. A w odpowiedzi na stres indukuje oś HPA. Nurr77 został wyizolowany jako czynnik transkrypcyjny zaangażowany w produkcję genów kodujących enzymy steroidogenne (92,93). Udowodniono również, że poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za powstawanie aldosteronu, m.in. CYP11B2 jest regulowany transkrypcyjnie przez Nurr1, czyli NR4A2 (94). Forskolina zdaje się być czynnikiem, w odpowiedzi na który dochodzi do regulacji ekspresji genów steroidogeny za pomocą czynników transkrypcyjnych rodziny NR4A.

Analiza wzbogacenia genów w analizowanych grupach ontologicznych dla grupy komórek HAC15 traktowanych ACTH nie wykazała żadnych genów różnicujących względem kontroli. Najprawdopodobniej jest to wynik małej liczby genów wprowadzonej do analizy oraz fakt, iż receptor dla ACTH wykazuje bardzo małą aktywność w komórkach linii HAC15.

Natomiast dla grupy traktowanej adropiną analiza wzbogacenia genów względem kontroli istotnie statystycznie stymulowała geny uczestniczące w odpowiedzi na nadtlenek wodoru (ang. response to hydrogen peroxide). Nadtlenek wodoru jest kluczowym metabolitem w procesach powstawania stresu oksydacyjnego. Jednak coraz częściej podkreśla się jego metaboliczną i regulacyjną rolę. Będąc cząsteczką przekaźnika, nadtlenek wodoru, wykorzystuje swoje właściwości dyfundowania przez komórki oraz tkanki by wywierać doraźne efekty komórkowe (95). Skutkuje to zmianami kształtu komórki, różnicowaniem i proliferacją komórek. Ponadto procesy takie jak stany zapalne, rytm okołodobowy wykorzystują nadtlenek wodoru jako element sygnalizacyjny. W odpowiedzi na nadtlenek wodoru modulowana jest aktywność wielu czynników transkrypcyjnych (95,96). Głównie związane są one z funkcją proliferacyjną, immunologiczną oraz metaboliczną. Dla przykładu takim czynnikiem transkrypcyjnym może być AP-1, który reguluje zarówno procesy apoptozy,

jak i proliferacji i różnicowania komórek. Dalej czynnik transkrypcyjny NRF2, który m.in., reguluje metabolizm węglowodanów i lipidów (97,98). HIF-1 odpowiedzialny za angiogenezę nowotworów, transportery glukozy oraz enzymy glikolityczne. W końcu czynnik transkrypcyjny TP-53 zaangażowany w naprawę DNA, bądź proces apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenie. Mutacje w genie TP-53 przyczyniają się do wystąpienia zespołu genetycznego Zespół Li- Fraumeni, który predysponuje do wystąpienia ACC (10,95,96). Przytoczone przykłady, w szczególności zjawisko proliferacji komórkowej oraz procesy metaboliczne z udziałem węglowodanów i lipidów, mogą wskazywać na efekty jakie adropina może wywierać na komórki raka kory nadnerczy poprzez stymulowanie genów uczestniczących w odpowiedzi na nadtlenek wodoru. Należy mieć jednak na uwadze fakt, że reaktywne formy tlenu przy zachwianiu antyoksydacyjnych systemów ochronnych, mogą prowadzić do powstawania stresu oksydacyjnego. W procesach nowotworzenia może przekładać się to wzrost tempa proliferacji czy tworzenie przerzutów. Uruchamiane mogą być wówczas mechanizmy kompensacyjne prowadzące m.in. do procesu apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenie komórek.

Ponadto wykazano również podwyższoną ekspresję genu ARRDC3 przynależącego do grupy ontologicznej związanej z transdukcją sygnałów. Produktem genu ARRDC3 jest białko 3 posiadające domenę arrestynową. Należy ono do rodziny alfa-arrestyn. Pełni funkcje adaptorowe i odgrywa rolę w regulacji receptorów adrenergicznych i innych receptorów sprzężonych z białkiem G, w tym receptorów z rodziny GPCR (99). Jak wiadomo nieprawidłowa ekspresja i aktywacja receptora sprzężonego z białkiem G (GPCR) może wiązać się z inicjacją, progresją, a także inwazyjnością oraz przerzutami nowotworu (77). Białko 3 posiadające domenę α -arrestyny (ARRDC3) częściowo kontroluje sygnalizację i ruch GPCR. Według raportu pochodzącego z portalu BioGPS gen ARRDC3 wykazuje wysoką ekspresję w wielu tkankach, w tym w nadnerczach. Dane literaturowe wskazują gen ARRDC3 jako gen supresorowy m.in. dla raka piersi. Opublikowane badania podają, że ekspresja ARRDC3 jest obniżona w przypadku inwazyjnego raka piersi o typie podstawowym, a niska ekspresja ARRDC3 koreluje z nawrotem guza i złym rokowaniem pacjenta (100). Natomiast badania omawianego genu w odniesieniu do raka jajnika prezentują się nieco inaczej. Według badań Chen i współautorów wysoka ekspresja ARRDC3 związana była ze słabym czasem przeżycia całkowitego i wolnego od progresji (101). Powyższe informacje sugerują, że w zależności od różnego stopienia ekspresji genu, możemy spodziewać się różnych efektów w zależności od rodzaju guza. Brakuje danych dotyczących badań nad wpływem ekspresji genu ARRDC3 na rozwój i rokowanie w guzach nadnerczy. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki ukazujące wysoką ekspresję ARRDC3 w komórkach nowotworowych poddanych wpływowi adropiny podkreślają, że adropina wywiera swój efekt fizjologiczny poprzez receptor z rodziny GPCR. Uzyskany wynik można odnieść do wykonanej analizy przeżycia z wykorzystaniem krzywych Kaplana-Meiera dla 94 przypadków raka kory nadnercza z bazy TCGA. Z analizy wynika, że pacjenci o niskiej ekspresji genu GPR19 cechują się istotnym statystycznie dłuższym czasem przeżycia względem pacjentów o wysokiej ekspresji genu GPR19. Jest to zgodne z teorią mówiącą o tym, że aktywacja GPR19 może sprzyjać karcenogenezie i tworzeniu przerzutów. Zatem prezentowane wyniki, a także dane pochodzące z baz danych, mówiące o wysokim poziomie ekspresji genu ARRDC3 w niezmienionej nowotworowo korze nadnerczy mogą stanowić podstawę do dalszych badań. Między innymi należałoby sprawdzić, jak wygląda korelacja między ekspresjami obu genów w guzach nadnerczy.

Według analizy wzbogacenia genów w analizowanych grupach ontologicznych, dla grupy traktowanej adropiną, do hamowania ekspresji doszło w genach uczestniczących w następujących procesach biologicznych: tworzenie pęczków mikrotubul (ang. microtubule bundle formation), cytokineza (ang. cytokinesis), cytokineza mitotyczna (ang. mitotic cytokinesis). Szczegółowa analiza ujawnia, że zahamowaniu ulega ekspresja genów KIF20A oraz PLK1. Badania naukowe dowodzą, że gen KIF20A wykazuje zwiększoną ekspresję we

wszystkich typach raka piersi i jest istotnie związany ze złym rokowaniem. Udowodniono, że zastosowanie inhibitorów dla KIF20 znacznie hamuje wzrost komórek raka piersi (102). Shen oraz współautorzy wykazali wzrost ekspresji KIF20 w raku pęcherza. Potwierdzony został również związek pomiędzy ekspresją genu, a tworzeniem przerzutów i złym rokowaniem (103). Ponadto wykazano, że w przypadku guzów nowotworowych zmniejszona ekspresja KIF20A poprzez deformacje mikrotubul znacznie upośledza ruchliwość komórek oraz hamuje powstawanie przerzutów (104). Gen PLK1 również uważany jest jako protoonkogen. Nadmierna ekspresja tego genu została wykazana w różnych typach raka u ludzi, takich jak glejak, czerniak, rak tarczycy, rak płaskonabłonkowy głowy i szyi, rak jelita grubego, rak przełyku, rak piersi, rak jajnika oraz rak prostaty (105). Interesujące może być powiązanie genu PLK1 z produktem genu TP-53, białkiem supresorowym p53. Wspomniane białko może działać przeciw proliferacyjnie w przypadku guza tłumiąc ekspresję PLK1. Liu i współautorzy analizując zbiory danych TCGA stwierdzili, że ekspresja PLK1 jest znacznie wyższa w nowotworach różnego typu z mutacją TP-53, niż w przypadku nowotworów typu dzikiego TP-53. Być może jest to pewna podpowiedź dotycząca działania adropiny, którą należy zweryfikować w oparciu o inne badania. Zastanawiające jest to, że adropina która do tej pory wykazywała właściwości proliferacyjne w hodowli komórek HAC15, hamuje ekspresję genów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego. Podkreśla to pewną rozbieżność w działaniu adropiny. Pokazuje, że rola badanego białka w patogenezie różnego rodzaju guzów, w tym guzów nadnerczy jest wielotorowa i wymaga dalszych badań. Niewykluczone jednak, że powyższy wynik ukazuje efekt terapeutyczny działania adropiny. Należy mieć również na uwadze to, że niska liczebność analizowanych genów różnicujących oraz samych regulowanych grup ontologicznych mogła wpływać na wynik badania.

6 Wnioski

1. Ekspresja genu ENHO nie stanowi czułego i specyficznego markera umożliwiającego rozpoznanie poszczególnych typów guzów nadnerczy człowieka. Ekspresja genu GPR19 jest podwyższona w kilku typach guzów nadnerczy - adenoma, carcinoma oraz mielolipoma, w związku z czym ekspresja GPR19 nie może pełnić czułego i specyficznego markera różnicującego poszczególne typy guzów nadnerczy.
2. Adropina wydzielana przez nadnercza nie ma istotnego wpływu na stężenie tego peptydu we krwi krążącej.
3. Brak zależności pomiędzy nadnerczową ekspresją adropiny, a jej stężeniem w surowicy dodatkowo potwierdza tezę o niewielkim znaczeniu ogólnoustrojowym adropiny produkowanej przez nadnercza. Sugeruje się raczej jej działanie lokalne na poziomie auto lub parakrynowym.
4. Silna dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją genu ENHO, a ekspresją genu GPR19 świadczy o wspólnej regulacji ekspresji badanych genów. Zależność występująca pomiędzy ekspresją wyżej wymienionych genów obecna we wszystkich grupach badanych guzów może potwierdzać auto lub/i parakrynowy mechanizm działania adropiny w nadnerczach.
5. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją badanych genów i/lub ujemna korelacja pomiędzy stężeniem wydzielonej adropiny, a np. porannym stężeniem kortyzolu oraz uzyskane wyniki *in vitro* sugerują udział adropiny w regulacji steroidogenezy nadnerczowej poprzez jej hamowanie.
6. Adropina bezpośrednio wpływa na steroidogenezę komórek raka kory nadnerczy poprzez jej zahamowanie oraz obniżenie ekspresji kluczowych enzymów steroidogenezy: CYP11A1, STAR, CYP11B1, jak również hamuje wydzielanie kortyzolu i aldosteronu w modelu komórkowym. Otrzymany wynik pozwala zaliczyć adropinę do grupy bioaktywnych białek hamujących steroidogenezę nadnerczową.
7. Adropina wpływa na proliferację komórek HAC15 reprezentujących fenotyp raka kory nadnercza co w powiązaniu z gorszą przeżywalnością pacjentów z wysoką ekspresją jej receptora, może świadczyć o jej niekorzystnym wpływie na rozwój choroby nowotworowej natomiast niska ekspresja GPR19 może stanowić pozytywny czynnik prognostyczny w przebiegu raka kory nadnerczy być może poprzez obniżoną wrażliwość komórek nadnerczy na obecną w środowisku guza adropinę.

Przytoczone powyżej wnioski pozwalają stwierdzić, że adropina oraz jej receptor pełnią istotną rolę w patogenezie guzów nadnerczy. Przeprowadzone badania, dają możliwość wpisania adropiny w szereg bioaktywnych peptydów wpływających na procesy zachodzące w nadnerczach, w tym nowotworzenie. Wydaje się, że ten wpływ zachodzi lokalnie na drodze auto/parakrynowej. Jednakże dokładny wpływ adropiny i jej receptora na etiopatogenezę guzów nadnerczy, dalej pozostaje niejasny.

7 Supplement



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 725/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 125 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 488); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2147 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego upublicznienia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsorów (Dz. U. 2004 nr 161, poz. 1654 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. połączonych upublicznienia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsorów (Dz. U. Nr 181, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 10 kwietnia 2006r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem pacjentów (Dz. U. 2006 Nr 104, poz. 1188); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 10 kwietnia 2006r. w sprawie ogłoszenia niniejszego ogłoszenia niniejszego ogłoszenia niniejszego ogłoszenia niniejszego ogłoszenia (Dz. U. Nr 184, poz. 1187); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wznowienia wniosków zgłaszanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub apternego wyrobu medycznego do implantacji oraz wycofania opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 200); Ustawy z dnia 28 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego upublicznienia odpowiedzialności cywilnej badacza i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobu (Dz. U. 2010, Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Medycznych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biologicznych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 491); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wznowienia badań klinicznych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wycofania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 8, poz. 491); w oparciu o Deklarację Helvidius - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi przyjęty KCH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 14 czerwca 2018 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu i główny badacz: dr n. med. Hanna Komarowska

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Klinika Endokrynologii Przemiany Materii i Chorób
Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Członkowie zespołu

badawczego:

dr hab. Marcin Ruciński prof. UM

mgr anal. med. Paulina Milecka

Temat badań:

„Analiza markerów molekularnych związanych z patogenezą guzów nadnerczy”.

Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na wydzieleniu tematu rozprawy doktorskiej mgr anal. med. Pauliny Mileckiej pt.: „Adropina i jej receptor w guzach nadnerczy człowieka”, zgodnie z Aneks nr 2 z dnia 14.06.2018r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 255/15 z dnia 05.03.2015r.

Metodyka pozostaje bez zmian.

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Ad.e)

INFORMACJA DLA PACJENTA

Celem badań pt. „**Analiza markerów molekularnych związanych z patogenezą guzów nadnerczy**” jest ocena czynników uczestniczących w patogenezie guzów nadnerczy na różnych poziomach. Są to nowatorskie badania mające na celu poszerzenie naszej wiedzy na temat guzów nadnerczy. Mamy nadzieję, że badania te w przyszłości będą pomocne w diagnostyce, a być może i leczeniu osób z guzami nadnerczy.

Główną wartością proponowanego projektu będzie analiza zmian na poziomie DNA, transkryptomu oraz mikro RNA w skrawkach nowotworowych ludzkich nadnerczy. Planowane badania mają doprowadzić do wykazania zależności pomiędzy zmianami w obrębie sekwencji DNA, ekspresji mRNA oraz mikroRNA.

Analizę tę przeprowadzimy w tkankach usuniętych guzów nadnercza. Badania nie będą wiązały się z poszerzeniem zakresu operacji (materiał do badań będzie pobierany z usuniętych uprzednio w celach terapeutycznych guzów).

Wybrane markery będziemy również oceniać we krwi. W związku z tym od każdego pacjenta zostanie dodatkowo pobrane 10 ml krwi. Krew będzie pobierana przy okazji wykonywania innych badań diagnostycznych.

Uczestnictwo w badaniu nie wiąże się z dodatkowym ryzykiem dla pacjenta. Nie przewiduje się dodatkowego ubezpieczenia. Pacjenci objęci będą rutynowym ubezpieczeniem podczas hospitalizacji i leczenia ambulatoryjnego.

Udział w badaniu jest dobrowolny. Pacjent ma możliwość wycofania się z badania na każdym etapie jego trwania z prawem dalszego leczenia w tej samej klinice.

Dane osobowe pacjenta nie będą przekazywane osobom trzecim. Wyniki badań będą opublikowane bez podawania danych osobowych pacjenta.

Ad. f)

FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY PACJENTA

Dobrowolnie wyrażam zgodę na udział w badaniach pt. „**Analiza markerów molekularnych związanych z patogenezą guzów nadnerczy.**” Wyrażam zgodę na pobranie krwi w ilości 10ml. Wyrażam również zgodę na wykonanie analiz molekularnych w tkance usuniętego guza.

Została mi udzielona usta oraz pisemna informacja na temat charakteru i celu prowadzonych badań.

Wiem, że mogę zadawać pytania osobie prowadzącej badanie i że uzyskam na nie odpowiedzi.

Wiem, że mogę odstąpić od udziału w badaniu na każdym jego etapie.

Wiem, że uczestnictwo w badaniu nie wiąże się z dodatkowym ryzykiem dla pacjenta.

Wyrażam zgodę, na przetwarzanie i opublikowanie wyników otrzymanych badań.

Miejscowość i data

czytelny podpis pacjenta

czytelny podpis prowadzącego badanie

8 Spis rycin

Rycina 1. Dane pochodzące z bazy RNA-seq przedstawiające ekspresję genu ENHO w różnych narządach człowieka.	12
Rycina 2. Schemat budowy adropiny z uwzględnieniem peptydu sygnałowego i fragmentu bioaktywnego. Źródło: http://www.mdpi.com/1422-0067/19/5/129	13
Rycina 3. Porównanie sekwencji aminokwasowej adropiny u szczura, myszy, człowieka oraz bydła domowego. Opracowanie na podstawie danych https://www.uniprot.org	13
Rycina 4. Dane pochodzące z bazy RNA-seq przedstawiające ekspresję genu GPR19 w różnych narządach człowieka. Źródło: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2842/?report=expression (opracowanie własne).	14
Rycina 5. Uproszczony schemat steroidogenezy oraz prezentacja enzymów występujących w poszczególnych warstwach kory nadnerczy. Źródło: Turcu & Auchus 2018.	17
Rycina 6. Wykres pudełkowy przedstawiający poziom ekspresji genu ENHO w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy (metoda qPCR). Zaznaczona mediana, IQR oraz wartości minimum i maksimum. Ekspresja określona u indywidualnych pacjentów została przedstawiona na wykresie w postaci kropek. Pacjenci, u których nie wykazano ekspresji badanego genu zostali usunięci z analizy	38
Rycina 7. Wykres pudełkowy przedstawiający poziom ekspresji genu GPR19 w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy (metoda qPCR). Zaznaczona mediana, IQR oraz wartości minimum i maksimum. Ekspresja określona u indywidualnych pacjentów została przedstawiona na wykresie w postaci kropek. Pacjenci, u których nie wykazano ekspresji badanego genu zostali usunięci z analizy. Wynik testu post-hoc Tukeya został przedstawiony w postaci liter, gdzie różne litery wskazują na różnice statystyczne pomiędzy poszczególnymi grupami.	39
Rycina 8. Macierz korelacji Pearsona dla ekspresji genu ENHO oraz GPR19 dla wszystkich grup. Skala przedstawia intensywność koloru odpowiadającą współczynnikowi korelacji. Istotność statystyczna została zaznaczona za pomocą gwiazdek. ($p < 0.05$ - *, $p < 0.01$ - **, $p < 0.001$ - ***).	40
Rycina 9. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy nadnerczową ekspresją genu GPR19, a nadnerczową ekspresją genu ENHO w następujących grupach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).	41
Rycina 10. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy nadnerczową ekspresją genu ghreliny (GHRL), a nadnerczową ekspresją genu GPR19 w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).	42
Rycina 11. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy ekspresją adiponektyny u pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu ENHO w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).	43
Rycina 12. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy ekspresją adiponektyny u pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu GPR19 w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).	44
Rycina 13. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy stężeniem HDL w krwi od pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu GPR19 w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).	45

Rycina 14. Wykres przedstawiający korelację Pearsona pomiędzy stężeniem siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEAS) we krwi pacjentów, a nadnerczową ekspresją genu ENHO w przypadkach: adenoma, carcinoma, hiperplazja, mielolipoma, pheochromocytoma oraz dla wszystkich wymienionych grup razem (all).....	46
Rycina 15. Wykres pudełkowy przedstawiający poziom stężenia adropiny w surowicy krwi w grupie kontrolnej (osoby zdrowe- nadnercza prawidłowe) oraz w grupach badanych (różne typy guzów nadnerczy). Zaznaczona mediana, IQR, wartość minimum i maksimum. Ekspresja indywidualnych przypadków została przedstawiona na wykresie w postaci kropek.....	47
Rycina 16. Wykres pudełkowy przedstawiający stężenie adropiny w surowicy krwi pacjentów z rakiem kory nadnercza przed zabiegiem usunięcia guza oraz u tych samych pacjentów po zabiegu usunięcia guza. Zaznaczona mediana, wartość minimum i maksimum. Ekspresja indywidualnych przypadków została przedstawiona na wykresie w postaci kropek.....	47
Rycina 17. Wykres pudełkowy przedstawiający czynność hormonalną guza wśród pacjentów, dla których dokonano pomiaru stężenia adropiny w surowicy krwi. Uwzględniono podział na grupy: adenoma, carcinoma, mielolipoma, pheochromocytoma. Na wykresie posłużono się skrótami literowymi, gdzie N = nieaktywny guz, A = guz wydzielający aldosteron, K= guz wydzielający kortyzol, A, K= guz wydzielający androgeny i kortyzol, acth zależny, oraz NA- brak informacji.	48
Rycina 18. Macierz korelacji Pearsona dla adropiny oraz oznaczonych danych klinicznych. Skala przedstawia intensywność koloru odpowiadającą współczynnikowi korelacji. Istotność statystyczna została zaznaczona za pomocą gwiazdek. ($p < 0.05$ -*, $p < 0.01$ -**, $p < 0.001$ -***)	49
Rycina 19. Wykres liniowej korelacji pomiędzy stężeniem adropiny, a stężeniem kortyzolu w godzinach porannych- pobranie godzina 8 rano, w przypadku surowic pacjentów z uwzględnieniem grup adenoma, carcinoma, mielolipoma i pheochromocytoma.....	50
Rycina 20. Analiza przeżycia z wykorzystaniem krzywych Kaplana-Meiera dla 92 przypadków raka kory nadnercza z bazy TCGA. Dane dotyczące ekspresji ENHO i GPR19 zostały podzielone na grupę o wysokiej (powyżej mediany) i niskiej ekspresji (poniżej mediany). Po lewej stronie przedstawiono profil ekspresji genów. RPKM (ang. Reads per kilo base per million mapped reads).	51
Rycina 21. Efekt działania adropiny w stężeniu 10^{-8} M na proliferację hodowli komórek HAC15. Na wykresie kolor niebieski reprezentuje grupę komórek poddanych działaniu adropiny. Kolor czarny przedstawia przebieg proliferacji komórek z grupy kontrolnej. Grafika przedstawia znormalizowany indeks komórkowy w czasie, w obecności adropiny. Na wykresie przedstawiono wartości średnie z 8 prób oraz SD.	52
Rycina 22. Wydzielanie aldosteronu (A) i kortyzolu (B) przez komórki HAC15, w efekcie 24 godzinnego działania adropiny. Kontrola pozytywna komórki HAC15 potraktowane Forskoliną i ACTH przez 24 godziny. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$	54
Rycina 23. Wydzielanie kortyzolu przez komórki raka kory nadnercza (ACC) w hodowli pierwotnej, w efekcie 24 godzinnego działania adropiny w stężeniu 10^{-8} M. Kontrola pozytywna komórki raka kory nadnercza (ACC) w hodowli pierwotnej potraktowane ACTH w stężeniu 10^{-7} przez 24 godziny. *, $p < 0.05$; **, $P < 0.01$	54
Rycina 24. Immunoekspresja STAR, CYP11A1, CYP11B1 w hodowli komórek HAC15. Obrazowe wyniki (A) komórek z linii HAC15 dla grup badanych: komórki inkubowane przez 24h z ACTH, forskoliną i adropiną, oraz grupy kontrolnej. Pozytywna reakcja wiązania przeciwciała została uwidoczniła w kolorze zielonym, jądra komórkowe zostały wybarwione w kolorze niebieskim za pomocą odczynnika DAPI. (B) Densytometryczna analiza intensywności fluorescencji (N= 30/grupa). W analizie statystycznej wykorzystano test U Manna-Whitneya. *, $p < 0.05$; ***, $P < 0.001$	57
Rycina 25. Wykres typu punktowego przedstawiający zależność w profilu transkryptomicznych komórek HAC15 inkubowanych z ACTH, forskoliną lub adropiną. Porównanie przedstawiono	

między ACTH a kontrolą (górny panel), forskoliną a kontrolą (środkowy panel) oraz adropiną a kontrolą (dolny panel). Każdy punkt określa indywidualny gen. Geny o podwyższonej ekspresji zaznaczono zielonym kolorem, natomiast geny o obniżonej ekspresji - czerwonym. Geny uznane za nieróżnicujące zaznaczono szarym kolorem..... 58

Rycina 26. Analiza grup ontologicznych regulowanych przez badane substancje A) Wykres bąbelkowy przedstawiający wzbogacone grupy ontologiczne genów różnicujących w trzech analizowanych porównaniach. Na wykresie przedstawiono tylko te grupy ontologiczne, które spełniają ustalone kryteria odcięcia ($p < 0,05$). Wielkość każdego bąbelka odzwierciedla liczbę genów uczestniczących w danej grupie ontologicznej Czerwony kolor bąbelka oznacza, że ekspresja genów, danej grupy GO, jest podwyższona, natomiast niebieski kolor odpowiada obniżonej ekspresji. B) Szczegółowa analiza pięciu wzbogaconych grup ontologicznych genów z bazy danych DAVID GO BP, przedstawiona w postaci wykresu kołowego. Symbole genów różnicujących przedstawiono po lewej stronie wykresu wraz z ich wartościami fold change, odwzorowanymi za pomocą skali kolorów (zielony = wyższa ekspresja; czerwony = niższa ekspresja). Kolor szary odpowiada ekspresji poniżej wartości odcięcia. Kolorowe linie łączące określają przynależności genów do poszczególnych grup ontologicznych. 59

9 Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna grupy badanej, której materiał tkankowy został wykorzystany w badaniach. Uwzględniony podział na grupy: adenoma, carcinoma, hiperplasia, mielolipoma, pheochromocytoma. Dane jakościowe zostały przedstawione jako liczba obserwacji w danej kategorii (N), Natomiast dane ilościowe jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (IQR). Dla danych ilościowych zastosowano test chi-kwadrat. Do danych ilościowych zastosowano test Kruskala-Wallisa z post hoc testem sumy rang Wilcoxon. Małe litery reprezentują wynik testu post hoc, w którym grupy istotnie różniące się od siebie posiadają odmienne litery..... 20

Tabela 2. Czynność hormonalna guza u pacjentów, od których wykorzystano materiał tkanowy. Uwzględniono grupy carcinoma i adenoma. 21

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna grup badanych, których surowica krwi została wykorzystany w badaniach. Uwzględniony podział na grupy: adenoma, carcinoma, hiperplasia, mielolipoma, pheochromocytoma. Dane jakościowe zostały przedstawione jako liczba obserwacji w danej kategorii (N), Natomiast dane ilościowe jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (IQR). Dla danych ilościowych zastosowano test chi-kwadrat. Do danych ilościowych zastosowano test Kruskala-Wallisa z post hoc testem sumy rang Wilcoxon. Małe litery reprezentują wynik testu post hoc, w którym grupy istotnie różniące się od siebie posiadają odmienne litery..... 21

Tabela 4. Parametry i etapy reakcji Real- Time PCR. 26

Tabela 5. Sekwencje starterów użytych w reakcji RT-PCR. W tabeli przedstawiono sekwencje starterów forward i revers. 27

Tabela 6. Wykaz grup i liczebność przypadków poddanych badaniu stężenia adropiny testem ELISA w surowicy krwi pobranej przy przyjęciu na oddział, przed wdrożeniem leczenia. ... 33

Tabela 7. Wykaz grup i liczebność przypadków poddanych badaniu stężenia adropiny testem ELISA w surowicy krwi pobranej od pacjentów poddanych adrenalekomii z powodu ACC, pobranie przed i po zabiegu. 33

Tabela 8. Medium z hodowli linii HAC 15 wykorzystane do ilościowego pomiaru aldosteronu metodą ELISA. Medium zebrano po 24 godzinnej ekspozycji na ACTH, forskolin i adropinę w odpowiednich stężeniach. Medium kontrolne zebrano po 24 godzinnej hodowli bez ekspozycji na dodatkowe odczynniki.....	34
Tabela 9. Medium z hodowli linii HAC 15 wykorzystane do ilościowego pomiaru kortyzolu metodą ELISA. Medium zebrano po 24 godzinnej ekspozycji na ACTH, forskolin i adropinę w odpowiednich stężeniach. Medium kontrolne zebrano po 24 godzinnej hodowli bez ekspozycji na dodatkowe odczynniki.....	36
Tabela 10. Medium z hodowli pierwotnej ACC wykorzystane do ilościowego pomiaru kortyzolu metodą ELISA. Medium zebrano po 24 godzinnej ekspozycji na ACTH i adropinę w odpowiednich stężeniach. Medium kontrolne bez ekspozycji na dodatkowe odczynniki zebrano po 24 godzinnej hodowli.	36
Tabela 11. Sumaryczne wartości ekspresji genu ENHO w poszczególnych grupach.	38
Tabela 12. Sumaryczne wartości $\log_2$ (ekspresji) genu GPR19 w poszczególnych grupach..	39
Tabela 13. Wartości p poszczególnych porównań testu post-hoc ekspresji genu GPR19 w poszczególnych grupach testu Tukeya.	39
Tabela 14. Grupy i ich liczebność. Badanie stężenia adropiny w surowicy krwi pacjentów.	46
Tabela 15. Efekt wpływu adropiny w stężeniu 10^{-8} M na poziom sekrecji hormonów w grupie badanej komórek HAC15 względem kontroli.....	53
Tabela 16. Efekt wpływu ACTH 10^{-7} M na poziom sekrecji hormonów w grupie HAC15 badanej względem kontroli.	53
Tabela 17. Efekt wpływu Forskoliny w stężeniu $25 \mu\text{M}$ na poziom sekrecji hormonów w grupie badanej HAC15 względem kontroli.	53
Tabela 18. Efekt wpływu adropiny w stężeniu 10^{-8} M i ACTH w stężeniu 10^{-7} M na poziom sekrecji hormonu- kortyzolu w grupie komórek ACC w hodowli pierwotnej względem kontroli	55
Tabela 19. Efekt wpływu stymulacji adropiną w 24 hodowli HAC15 na ekspresję białka: STAR, CYP11A1, CYP11B1. Wyniki przedstawiono w postaci mediany z znormalizowanej wartości CTCF- skorygowanej całkowitej fluorescencji komórek.	56

10 Streszczenie

10.1 Streszczenie

Paulina Milecka

Adropina i jej receptor w guzach nadnerczy człowieka

Istnieje szereg bioaktywnych peptydów biorących udział w regulacji homeostazy metabolicznej organizmu. Udowodniono także ich wpływ na funkcjonowanie nadnerczy w sposób pośredni, poprzez oś podwzgórzowo-przysadkowo- nadnerczową lub bezpośrednio oddziałując na komórki kory lub rdzenia nadnerczy. Wykazano również, iż mogą one modulować procesy patologiczne, w tym nowotworzenie. W niniejszej pracy założono hipotezę, że adropina - nowo poznany bioaktywny peptyd, może modulować progresję guzów nadnerczy a jej wydzielanie może stanowić czuły marker postępu choroby. W związku z powyższym głównym celem pracy jest zbadanie roli adropiny oraz jej receptora w patogenezie poszczególnych typów guzów nadnerczy: adenoma, carcinoma, pheochromocytoma, myelolipoma, hyperplasia.

Cel realizowano poprzez porównanie ekspresji genu kodującego adropinę (ENHO) oraz jej receptora (GPR19) w nadnerczach prawidłowych oraz w różnych typach guzów nadnerczy (metoda qPCR). Nie uzyskano istotnych statystycznie wyników dla ekspresji ENHO na poziomie mRNA względem kontroli, natomiast ekspresja genu GPR19 była znacząco wyższa w adenoma, carcinoma i mielolipoma w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Następnie porównano stężenia wydzielonej do krążenia adropiny, badanej w surowicy krwi pacjentów z różnych typów guzów nadnerczy w odniesieniu do grupy zdrowych osób (kontrola) (metoda ELISA). Uzyskano wyniki nieistotne statystycznie.

Dodatkowo porównano stężenia adropiny wydzielonej do krwi u pacjentów przed zabiegiem chirurgicznego usunięcia raka kory nadnercza i po wykonanym zabiegu (metoda ELISA). Uzyskano wzrost stężenia adropiny w surowicy krwi po usunięciu guza.

Za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona określono zależności między nadnerczową ekspresją genu ENHO, GPR19, a zebranymi danymi klinicznymi oraz ekspresją innych genów. Przeprowadzono łącznie 30 analiz dla każdego genu. Wykazano istotnie statystycznie korelacje dla ekspresji genu ENHO w odniesieniu do ekspresji genu GPR19 oraz adiponektyny i stężeniem DHEAS. Ekspresja genu GPR19 korelowała z ekspresją ENHO, GHRL, adiponektyny oraz stężeniem: HDL.

Również za pomocą współczynnika korelacji Pearsona zbadano zależności między zbadanym stężeniem wydzielonej adropiny, a zebranymi danymi klinicznymi m.in. BMI, glukoza, HDL, LDL, TG (metody korelacji danych liczbowych). Korelacja wystąpiła pomiędzy stężeniem wydzielonej do krążenia adropiny, a stężeniem kortyzolu z godziny 8:00 rano.

Ponadto poddano analizie dane z publicznej bazy TCGA by określić wpływ nadnerczowej ekspresji ENHO oraz GPR19 na przeżycie pacjentów z rakiem nadnerczy. Wykazano, że poziom ekspresji genu ENHO nie ma istotnie statystycznego wpływu na przeżywalność pacjentów, a pacjenci z niską ekspresją GPR19 cechują się istotnym statystycznie dłuższym czasem przeżycia w odniesieniu do pacjentów z wysoką ekspresją genu GPR19.

Wykonano również doświadczenia z wykorzystaniem linii komórkowej HAC15 oraz pierwotnej hodowli ACC.

Wykorzystując metodę z zastosowaniem xCelligence Real Time Cell Analyzer- RTCA określono, że adropina stymuluje proliferację komórek HAC15.

Ponadto oznaczono stężenia aldosteronu i kortyzolu wydzielanego przez komórki HAC15 pod wpływem działania adropiny (metoda ELISA). Wykazując hamujący wpływ adropiny na proces steroidogenezy. Hamujący wpływ adropiny na poziom kortyzolu (metoda ELISA) wykazano również w hodowli pierwotnej raka nadnerczy.

Następnie zbadano efekt działania adropiny sprawdzając ekspresję, na poziomie białka, genów odpowiedzialnych za steroidogenezę: STAR, CYP11A1, CYP11B1. W tym celu posłużono się metodą immunofluorescencji. Istotny statystycznie spadek ekspresji względem kontroli uzyskano w przypadku białka STAR oraz CYP11A1.

Zbadano również wpływ adropiny na regulację profilu transkryptomicznego komórek HAC15. Wykorzystano mikromacierze do zbadania ekspresji ponad 34 tysięcy genów. Adropina podwyższała ekspresję 31 genów, a obniżała 6. By sprawdzić jakie procesy biologiczne są regulowane przez adropinę wykonano analizę wzbogacenia genów różnicujących w obrębie grup ontologicznych bazy GO BP. Do określenia roli genów użyto bazy danych ontologii genów - David. W przypadku analizy efektu wywieranego przez adropinę względem grupy kontrolnej adropina istotnie statystycznie stymulowała geny uczestniczące w odpowiedzi na nadtlenek wodoru oraz hamowała ekspresję genów uczestniczących w następujących procesach biologicznych: tworzenie pęczków mikrotubul, cytokineza, cytokineza mitotyczna.

Najważniejsze uzyskane wnioski:

- Ekspresja genu GPR19 jest podwyższona w grupie guzów wywodzących się z kory nadnerczy: adenoma, carcinoma i mielolipoma względem kontroli. W związku z czym ekspresja GPR19 nie może pełnić czułego i specyficznego markera różnicującego poszczególne typy guzów kory nadnerczy
- Silna korelacja pomiędzy ekspresją genu ENHO, a ekspresją genu GPR19 świadczy o koregulacji genu ENHO i GPR19. Zależność występująca pomiędzy ekspresją wyżej wymienionych genów obecna we wszystkich grupach badanych guzów może wskazywać na auto i parakryny wpływ adropiny na komórki rdzenia i kory nadnerczy podczas procesu kancerogenezy.
- Adropina wpływa na proliferację komórek HAC15 reprezentujących fenotyp raka kory nadnercza co w powiązaniu z gorszą przeżywalnością pacjentów z wysoką ekspresją jej receptora, może świadczyć o jej niekorzystnym wpływie na rozwój choroby nowotworowej

10.2 Abstract

Paulina Milecka

ADROPIN AND ITS RECEPTOR IN HUMAN ADRENAL TUMOURS

There are a number of bioactive peptides involved in the regulation of metabolic homeostasis in the body. They have also been shown to affect adrenal function indirectly, through the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, or by directly acting on the cortical or medullary cells. It has also been shown that they are able to modulate pathological processes, including carcinogenesis. In this dissertation, it was hypothesised that adropin, a newly discovered bioactive peptide, may modulate the adrenal tumour progression, and that its secretion may constitute a sensitive marker of disease progression. Therefore, the main objective of this thesis is to investigate the role of adropin and its receptor in the pathogenesis of the following adrenal tumour types: adenoma, carcinoma, pheochromocytoma, myelolipoma, hyperplasia.

The aim was to compare the expression of the gene encoding adropin (ENHO) and its receptor (GPR19) in normal adrenal glands, as well as in different types of adrenal tumours (qPCR method). No statistically significant results were obtained for ENHO expression at the mRNA level compared to the control group, whereas GPR19 gene expression was significantly higher in adenoma, carcinoma and myelolipoma in comparison to the controls.

Subsequently, the concentrations of adropin secreted into the circulatory system were analysed in the serum of patients with different types of adrenal tumours as compared to a group of healthy subjects (control) (using the ELISA method). The results were statistically insignificant. In addition, adropin concentrations in the bloodstream of patients prior to and after a surgical removal of adrenocortical carcinoma were compared (the ELISA method). An increase in the serum adropin concentration following tumour removal was observed.

The Pearson's linear correlation coefficient was used to determine the relationships between adrenal expression of ENHO gene, GPR19, and the clinical data collected, as well as the expression of other genes. A total of 30 analyses were performed for each gene. Statistically significant correlations were demonstrated for ENHO gene expression with regard to GPR19 and adiponectin gene expression and DHEAS concentration. GPR19 gene expression correlated with ENHO, GHRL and adiponectin expression as well as with the concentrations of HDL.

The Pearson correlation coefficient was also applied to analyse correlations between the secreted adropin concentration and the collected clinical data, including BMI, glucose, HDL, LDL, TG (numerical data correlation methods). The correlation was found between the concentration of the secreted adropin and the cortisol concentration at 8:00h.

In addition, data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) were analysed to determine the effect of the adrenal ENHO and GPR19 expression on the survival rates of adrenal cancer patients. It was demonstrated that the level of ENHO gene expression does not have a statistically significant impact on patients' survival, whereas patients with a low GPR19 expression show a statistically significant longer survival period in comparison to patients with a high GPR19 gene expression.

Experiments using HAC15 cell line and ACC primary culture were also performed.

Using the xCelligence Real Time Cell Analyzer (the RTCA method), it was determined that adropin stimulates HAC15 cell proliferation.

Furthermore, the concentrations of aldosterone and cortisol secreted by HAC15 cells following the exposure to adropin were found (the ELISA method) demonstrating the inhibitory effect of adropin on steroidogenesis. The inhibitory effect of adropin on cortisol levels (the ELISA method) was also revealed in the primary culture of adrenocortical carcinoma.

Subsequently, the impact of adropin at the protein level was evaluated by testing the expression of genes responsible for steroidogenesis, i.e. STAR, CYP11A1, CYP11B1. Thus, the immunofluorescence method was applied. A statistically significant decrease in STAR and CYP11A1 expression was observed in comparison to the control group.

The effect of adropin on the regulation of the transcriptomic profile of HAC15 cells was also investigated. Microarrays were used to investigate the expression of over 34 000 genes. Adropin upregulated the expression of 31 genes, whereas 6 genes were downregulated. In order to verify which biological processes are regulated by adropin, the enrichment analysis of differential genes within GO BP ontology database groups was performed. The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) was used to determine the role of genes. In the analysis of the effect exerted by adropin with respect to the control group, adropin significantly stimulated genes involved in the response to hydrogen peroxide, whereas it inhibited the expression of genes involved in other biological processes, such as microtubule bundle formation, cytokinesis, mitotic cytokinesis.

The following key observations have been made:

- GPR19 gene expression is upregulated in adrenocortical tumours, i.e. adenoma, carcinoma and myelolipoma compared to the controls. Therefore, GPR19 expression cannot serve as a sensitive and specific marker to differentiate between various types of adrenocortical tumours.
- The strong correlation between gene expression of ENHO and GPR19 indicates a co-regulation between ENHO and GPR19 genes. The relationship between the expression of the above-mentioned genes presents in all groups of tumours investigated may indicate an auto- and paracrine effect of adropin on the adrenal medullary and cortical cells in the process of carcinogenesis.
- Adropin affects the proliferation of HAC15 cells, a phenotype of adrenocortical carcinoma which combined with poorer survival rates in patients with a high expression of its receptor may indicate that it has a detrimental effect in tumour development.

11 Piśmiennictwo

1. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: Clinical update. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006;91:2-27-37 .
2. Else T, Kim AC, Sabolch A, Raymond VM, Kandathil A, Caoili EM, Jolly S, Miller BS, Giordano TJ, Hammer GD. Adrenocortical carcinoma. *Endocrine Reviews* 2014;35:382-326.
3. Corssmit EPM, Dekkers OM. Screening in adrenal tumors. *Current Opinion in Oncology* 2019;31:243-6.
4. Komarowska H, Rucinski M, Tyczewska M, Sawicka-Gutaj N, Szyszka M, Hernik A, Klimont A, Milecka P, Migasiuk L, Biczysko M, Idasiak-Piechocka I, Karczewski M, Czarnywojtek A, Ruchala M. Ghrelin is overexpressed in adrenal cancers and stimulates proliferation and migration of ACC cell line. *Endocr Abstr.* 2018; <http://www.endocrine-abstracts.org/ea/0056/ea0056p128.htm>.
5. Bhargava P, Sangster G, Haque K, Garrett J, Donato M, D'Agostino H. A Multimodality Review of Adrenal Tumors. *Current Problems in Diagnostic Radiology* 2019;48;605-15.
6. Turner DJ, Miskulin J. Management of adrenal lesions. *Current Opinion in Oncology* 2009;21:34-40.
7. Audenet F, Méjean A, Chartier-Kastler E, Rouprêt M. Adrenal tumours are more predominant in females regardless of their histological subtype: A review. *World J Urol* 2013; 31:1037-43.
8. Farrugia FA, charalampopoulos A. Pheochromocytoma. *Endocr Regul* 2019; 53:191-212.
9. Sbardella E, Grossman AB. Pheochromocytoma: An approach to diagnosis. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 2020;43:101346.
10. Petr EJ, Else T. Adrenocortical carcinoma (ACC): When and why should we consider germline testing? *Presse Medicale* 2018;47:119-25.
11. Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PLM, Douglas F, George E, Sköldbberg F, Husebye ES, Eng C, Maher ER. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet* 2001; 69:49-54.
12. Sharma E, Dahal S, Sharma P, Bhandari A, Gupta V, Amgai B, Dahal S. The Characteristics and Trends in Adrenocortical Carcinoma: A United States Population Based Study. *J Clin Med Res* 2018; 10:636-40.
13. Vaidya A, Nehs M, Kilbridge K. Treatment of Adrenocortical Carcinoma. *Surgical Pathology Clinics* 2019;12:997-1006.
14. Berruti A, Fassnacht M, Haak H, Else T, Baudin E, Sperone P, et al. Prognostic role of overt hypercortisolism in completely operated patients with adrenocortical cancer. *Eur Urol* 2014; 65:832-8.
15. Jouinot A, Bertherat J. Adrenocortical carcinoma: Differentiating the good from the poor prognosis tumors. *European Journal of Endocrinology* 2018;178:215-30.
16. Angelousi A, Kyriakopoulos G, Nasiri-Ansari N, Karageorgou M, Kassi E. The role of epithelial growth factors and insulin growth factors in the adrenal neoplasms. *Ann Transl Med* 2018; 6:253-253.
17. Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, Moffitt RA, Danilova L, Murray BA, et al. Comprehensive pan-genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Cancer Cell* 2016; 29:723-36.
18. Sbiera S, Schnull S, Assie G, Voelker H-U, Kraus L, Beyer M, Ragazzon B, Beuschlein F, Willenberg HS, Hahner S, Saeger W, Bertherat J, Allolio B, Fassnacht M. High Diagnostic and Prognostic Value of Steroidogenic Factor-1 Expression in Adrenal

- Tumors. *Mol Endocrinol* 2010; 24:1675-1675.
19. Soon PSH, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. Molecular Markers and the Pathogenesis of Adrenocortical Cancer. *Oncologist* 2008;13:548-61.
 20. Fishbein L. Pheochromocytoma/Paraganglioma: Is This a Genetic Disorder? *Current Cardiology Reports* 2019;21:104.
 21. Gniado E, Carracher CP, Sharma S. Simultaneous occurrence of germline mutations of SDHB and TP53 in a patient with metastatic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105:991-5.
 22. Neumann HPH, Young WF, Eng C. Pheochromocytoma and Paraganglioma. *N Engl J Med* 2019; 381:552-65.
 23. Koopman K, Gaal J, de Krijger RR. Pheochromocytomas and paragangliomas: New developments with regard to classification, genetics, and cell of origin. *Cancers* 2019;11:1070.
 24. Schreiner F, Beuschlein F. Disease monitoring of patients with pheochromocytoma or paraganglioma by biomarkers and imaging studies. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 2020;34:101347.
 25. Park JJ, Park BK, Kim CK. Adrenal imaging for adenoma characterization: Imaging features, diagnostic accuracies and differential diagnoses. *British Journal of Radiology* 2016; 89:2015.
 26. Lam AK yin. Update on Adrenal Tumours in 2017 World Health Organization (WHO) of Endocrine Tumours. *Endocrine Pathology* 2017;28:213-27.
 27. Hodgson A, Pakbaz S, Mete O. A Diagnostic Approach to Adrenocortical Tumors. *Surgical Pathology Clinics* 2019;12:967-95.
 28. Seccia TM, Caroccia B, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Rossi GP. The Biology of Normal Zona Glomerulosa and Aldosterone-Producing Adenoma: Pathological Implications. *Endocrine Reviews* 2018; <https://academic.oup.com/edrv/advance-article/doi/10.1210/er.2018-00060/5051322>.
 29. Decmann Á, Perge P, Tóth M, Igaz P. Adrenal myelolipoma: a comprehensive review. *Endocrine* 2018;59:7-15.
 30. Campbell MJ, Obasi M, Wu B, Corwin MT, Fananapazir G. The radiographically diagnosed adrenal myelolipoma: what do we really know? *Endocrine*. 2017;
 31. Adapa S, Naramala S, Gayam V, Gavini F, Dhingra H, Hazard FKG, Aeddula NR, Konala VM. Adrenal Incidentaloma: Challenges in Diagnosing Adrenal Myelolipoma. *J Investig Med High Impact Case Reports* 2019; 7:232-47.
 32. Agrons MM, Jensen CT, Habra MA, Menias CO, Shaaban AM, Wagner-Bartak NA, Roman-Colon AM, Elsayes KM. Adrenal cortical hyperplasia: Diagnostic workup, subtypes, imaging features and mimics. *British Journal of Radiology* 2017;90:170330.
 33. Lotfi CFP, Kremer JL, Passaia BDS, Cavalcante IP. The human adrenal cortex: Growth control and disorders. *Clinics* 2018;73: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113920/?report=classic>.
 34. Kopacek C, Prado MJ, da Silva CMD, de Castro SM, Beltrão LA, Vargas PR, Grandi T, Rossetti MLR, Spritzer PM. Clinical and molecular profile of newborns with confirmed or suspicious congenital adrenal hyperplasia detected after a public screening program implementation. *J Pediatr (Rio J)* 2019; 95:282-90.
 35. Omata K, Satoh F, Morimoto R, Ito S, Yamazaki Y, Nakamura Y, Anand SK, Guo Z, Stowasser M, Sasano H, Tomlins SA, Rainey WE. Cellular and genetic causes of idiopathic hyperaldosteronism. *Hypertension* 2018; 72:874-80.
 36. Kumar KG, Trevaskis JL, Lam DD, Sutton GM, Koza RA, Chouljenko VN, et al. Identification of Adropin as a Secreted Factor Linking Dietary Macronutrient Intake with Energy Homeostasis and Lipid Metabolism. *Cell Metab* 2008; 8:468-81.

37. Goetze JP, Albrethsen J. Adropin: A new regulatory peptide in cardiovascular endocrinology. *Regulatory Peptides* 2014;190-191:41-2.
38. Aydin S, Aydin S, Kuloglu T, Kalayci M, Yilmaz M, Çakmak T, Eren MN. Elevated adropin: A candidate diagnostic marker for myocardial infarction in conjunction with troponin-I. *Peptides* 2014; 58:91-7.
39. Marczuk N, Cecerska-Heryś E, Jesionowska A, Dołęgowska B. Adropin - physiological and pathophysiological role. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej* 2016;70:981-8.
40. Bolayir HA, Kivrak T, Gunes H, Bolayir A, Karaca I. Adropin and circadian variation of blood pressure. *Kardiol Pol* 2018; 6:776-82.
41. Butler AA, Tam CS, Stanhope KL, Wolfe BM, Ali MR, O'Keeffe M, St-Onge MP, Ravussin E, Havel PJ. Low circulating adropin concentrations with obesity and aging correlate with risk factors for metabolic disease and increase after gastric bypass surgery in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:3783-91.
42. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S. Copeptin, adropin and irisin concentrations in breast milk and plasma of healthy women and those with gestational diabetes mellitus. *Peptides* 2013; 47:66-70.
43. Niepolski L, Grzegorzewska AE. Salusins and adropin: New peptides potentially involved in lipid metabolism and atherosclerosis. *Advances in Medical Sciences* 2016;61:282-7.
44. Stein LM, Yosten GLC, Samson WK. Adropin acts in brain to inhibit water drinking: Potential interaction with the orphan G protein-coupled receptor, GPR19. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2016; 310:476-80.
45. Rao A, Herr DR. G protein-coupled receptor GPR19 regulates E-cadherin expression and invasion of breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2017; 1864:1318-27.
46. Martin AL, Steurer MA, Aronstam RS. Constitutive activity among orphan class-A G protein coupled receptors. *PLoS One*. 2015;1-12.
47. Lewandowicz AM, Kowalski ML, Pawliczak R. [RGS proteins (regulators of G protein signaling) and their roles in regulation of immune response]. *Postepy Hig Med Dosw* 2004; 58:312-20.
48. Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, Al-Omran M, Teoh H, Verma S. Adropin is a novel regulator of endothelial function. *Circulation* 2010; 122:185-92.
49. Yosae S, Soltani S, Sekhavati E, Jazayeri S. Adropin-A novel biomarker of heart disease: A systematic review article. *Iranian Journal of Public Health* 2016;45:1568-76.
50. Ganesh Kumar K, Zhang J, Gao S, Rossi J, McGuinness OP, Halem HH, Culler MD, Mynatt RL, Butler AA. Adropin deficiency is associated with increased adiposity and insulin resistance. *Obesity* 2012; 20:1394-402.
51. Li L, Xie W, Zheng XL, Yin WD, Tang CK. A novel peptide adropin in cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta* 2016;453:107-13.
52. Shahjouei S, Ansari S, Pourmotabbed T, Zand R. Potential roles of adropin in central nervous system: Review of current literature. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2016;3: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmolb.2016.00025/abstract>.
53. Wong CM, Wang Y, Lee JTH, Huang Z, Wu D, Xu A, Lam KSL. Adropin is a brain membrane-bound protein regulating physical activity via the NB-3/notch signaling pathway in mice. *J Biol Chem* 2014; 289:25976-86.
54. Mu D, Jiang X, Sheldon RA, Fox CK, Hamrick SEG, Vexler ZS, Ferriero DM. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model. *Neurobiol Dis* 2003; 14:524-34.

55. Lin HY, Wu CL, Huang CC. The akt-endothelial nitric oxide synthase pathway in lipopolysaccharide preconditioning-induced hypoxic-ischemic tolerance in the neonatal rat brain. *Stroke* 2010; 41:1543-51.
56. Yates R, Katugampola H, Cavlan D, Cogger K, Meimaridou E, Hughes C, Metherell L, Guasti L, King P. Adrenocortical Development, Maintenance, and Disease. In: *Current Topics in Developmental Biology* 2013;106:239-312.
57. Malendowicz LK. 100th anniversary of the discovery of the human adrenal fetal zone by Stella Starkel and Lesław Węgrzynowski: How far have we come? *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2010;48:491-506.
58. Pihlajoki M, Dörner J, Cochran RS, Heikinheimo M, Wilson DB. Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. *Frontiers in Endocrinology* 2015;6:1-13.
59. Kempná P, Flück CE. Adrenal gland development and defects. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008;22:77-93.
60. Malendowicz LK, Nussdorfer GG. Investigations on the acute effects of neuropeptides on the pituitary-adrenocortical function in normal and cold-stressed rats: I. Bombesin and Neuromedin B. *Exp Toxicol Pathol* 1995; 47:31-4.
61. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 379:62-73.
62. Stewart PM, Newell-Price JDC. Therapeutic corticosteroids. In: *Williams textbook of endocrinology* 2011;492-5.
63. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2015;444:275-96.
64. Malendowicz LK, Rucinski M, Belloni AS, Ziolkowska A, Nussdorfer GG. Leptin and the Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *International Review of Cytology* 2007;263:63-102.
65. Paschke L, Zemleduch T, Rucinski M, Ziolkowska A, Szyszka M, Malendowicz LK. Adiponectin and adiponectin receptor system in the rat adrenal gland: Ontogenetic and physiologic regulation, and its involvement in regulating adrenocortical growth and steroidogenesis. *Peptides* 2010; 31:1715-24.
66. Brunton PJ, Russell JA. Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to centrally administered orexin-A are suppressed in pregnant rats. *J Neuroendocrinol* 2003; 15:66-7.
67. Dworakowska* D, Drabarek* A, Wenzel I, Babińska A, Świątkowska-Stodulska R, Sworczak K. Rak kory nadnercza (ACC) — przegląd piśmiennictwa i doświadczenia własne. *Endokrynol Pol.* 2015;65;492-512.
68. Elbanan MG, Javadi S, Ganeshan D, Habra MA, Rao Korivi B, Faria SC, Elsayes KM. Adrenal cortical adenoma: current update, imaging features, atypical findings, and mimics. *Abdominal Radiology* 2020;45:905-16.
69. Klimaszewska-Adamus K, Kajdas L, Szczepański T, Jarzumbek A, Jędzura A, Ziora K. Adrenal tumor in type of myelolipoma at 14-year-old girl with congenital adrenal hypertrophy. *Pediatr Endocrinol* 2015; 14:43-8.
70. Nergiz S, Altinkaya SO, Kurt Ömürlü I, Yuksel H, Küçük M, Demircan Sezer S. Circulating adropin levels in patients with endometrium cancer. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31:730-5.
71. Tuna BG, Atalay PB, Altunbek M, Kalkan BM, Dogan S. Effects of Chronic and Intermittent Calorie Restriction on Adropin Levels in Breast Cancer. *Nutr Cancer* 2017;60:1003-10.
72. Fang H, Judd RL. Adiponectin regulation and function. *Compr Physiol* 2018;8:1031-1063.
73. Alamri BN, Shin K, Chappe V, Anini Y. The role of ghrelin in the regulation of glucose

- homeostasis. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 2016;26: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/hmbci-2016-0018/html>.
74. Sovetkina A, Nadir R, Fung JNM, Nadjarpour A, Beddoe B. The Physiological Role of Ghrelin in the Regulation of Energy and Glucose Homeostasis. *Cureus* 2020; <https://www.cureus.com/articles/29811-the-physiological-role-of-ghrelin-in-the-regulation-of-energy-and-glucose-homeostasis>.
 75. Poher AL, Tschöp MH, Müller TD. Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides* 2018;100:236-42.
 76. Jasaszewili M, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Adropin as a fat-burning hormone with multiple functions—review of a decade of research. *Molecules* 2020;25:549.
 77. Gad AA, Balenga N. The Emerging Role of Adhesion GPCRs in Cancer. *ACS Pharmacology and Translational Science* 2020;3:29-42.
 78. Wang T, Rainey WE. Human adrenocortical carcinoma cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012;351:58-65.
 79. Chen YC, Huang BM. Primary culture of rat adrenocortical cells and assays of steroidogenic functions. *J Vis Exp* 2019; 59016.
 80. Wang T, Rowland JG, Parmar J, Nesterova M, Seki T, Rainey WE. Comparison of aldosterone production among human adrenocortical cell lines. *Horm Metab Res* 2012; 44:245-50.
 81. Rege J, Turcu AF, Else T, Auchus RJ, Rainey WE. Steroid biomarkers in human adrenal disease. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2019;190:273-80.
 82. Mangelis A, Dieterich P, Peitzsch M, Richter S, Jühlen R, Hübner A, Willenberg HS, Deussen A, Lenders JWM, Eisenhofer G. Computational analysis of liquid chromatography-tandem mass spectrometric steroid profiling in NCI H295R cells following angiotensin II, forskolin and abiraterone treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;155:67-75.
 83. Pinto C, Papa D, Hübner M, Mou TC, Lushington GH, Seifert R. Activation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms by forskolin analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;235:27-36.
 84. Asif AR, Ljubojevic M, Sabolic I, Shnitsar V, Metten M, Anzai N, Müller GA, Burckhardt G, Hagos Y. Regulation of steroid hormone biosynthesis enzymes and organic anion transporters by forskolin and DHEA-S treatment in adrenocortical cells. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2006; 291:1351-9.
 85. Taylor MJ, Sanjanwala AR, Morin EE, Rowland-Fisher E, Anderson K, Schwendeman A, Rainey WE. *Endocrinology* 2016;157:3122-9.
 86. Cherradi N, Brandenburger Y, Rossier MF, Vallotton MB, Stocco DM, Capponi AM. Atrial natriuretic peptide inhibits calcium-induced steroidogenic acute regulatory protein gene transcription in adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* 1998;12:962-72.
 87. Byrd JA, Dean CE, Fossum TW, Hargis BM. Effect of bursal anti-steroidogenic peptide (BASP) on cortisol biosynthesis in ACTH-stimulated canine adrenocortical carcinoma cells in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;47:35-42.
 88. Liang F, Kapoun AM, Lam A, Damm DL, Quan D, O'Connell M, Protter AA. B-type natriuretic peptide inhibited angiotensin II-stimulated cholesterol biosynthesis, cholesterol transfer, and steroidogenesis in primary human adrenocortical cells. *Endocrinology* 2007;148:3722-9.
 89. Neri G. Thyrotropin-releasing hormone inhibits glucocorticoid secretion of rat adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology*. 1993;133:511-4.
 90. Elfekih H, Abdelkrim A Ben, Marzouk H, Saad G, Gribaa M, Hasni Y, Maaroufi A. Congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta-hydroxylase deficiency in a tunisian

- family. *Pan Afr Med J* 2020;36: <https://www.panafrican-med-journal.com/content/article/36/226/full>.
91. Jasaszwili M, Wojciechowicz T, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Effects of adropin on proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells and rat primary preadipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2019;496:110532.
 92. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 1997;17:5946-51.
 93. Pei L, Castrillo A, Tontonoz P. Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77. *Mol Endocrinol* 2006;20:786-94.
 94. Noro E, Yokoyama A, Kobayashi M, Shimada H, Suzuki S, Hosokawa M, Takehara T, Parvin R, Shima H, Igarashi K, Sugawara A. Endogenous purification of NR4A2 (Nurr1) identified poly(ADP-ribose) polymerase 1 as a prime coregulator in human adrenocortical H295R cells. *Int J Mol Sci* 2018; 19:1406.
 95. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology* 2017;11:613-9.
 96. Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 2014;289:8735-41.
 97. He H-J. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. *World J Diabetes* 2012;3:94.
 98. Shin S, Wakabayashi J, Yates MS, Wakabayashi N, Dolan PM, Aja S, Liby KT, Sporn MB, Yamamoto M, Kensler TW. Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolide. *Eur J Pharmacol* 2009;620:138-44.
 99. Zheng Y, Lin Z-Y, Xie J-J, Jiang F-N, Chen C-J, Li J-X, Zhou X, Zhong W-D. ARRDC3 Inhibits the Progression of Human Prostate Cancer Through ARRDC3-ITGβ4 Pathway. *Curr Mol Med* 2017;17: <http://www.eurekaselect.com/154738/article>.
 100. Arakaki AKS, Pan WA, Lin H, Trejo JA. The α -arrestin ARRDC3 suppresses breast carcinoma invasion by regulating G protein-coupled receptor lysosomal sorting and signaling. *J Biol Chem* 2018;293:3350-62.
 101. Chen Y, Tian D, Chen X, Tang Z, Li K, Huang Z, Fu Y, Feng Y, Yang Z. ARRDC3 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Epithelial Ovarian Cancer Based on Data Mining. *Int J Gen Med* 2021;14:967-81.
 102. Nakamura M, Takano A, Thang PM, Tsevegjav B, Zhu M, Yokose T, Yamashita T, Miyagi Y, Daigo Y. Characterization of KIF20A as a prognostic biomarker and therapeutic target for different subtypes of breast cancer. *Int J Oncol* 2020;57:277-88.
 103. Shen T, Yang L, Zhang Z, Yu J, Dai L, Gao M, Shang Z, Niu Y. KIF20A affects the prognosis of bladder cancer by promoting the proliferation and metastasis of bladder cancer cells. *Dis Markers*. 2019;1-9.
 104. Li X, Huang W, Huang W, Wei T, Zhu W, Chen G, Zhang J. Kinesin family members KIF2C/4A/10/11/14/18B/ 20A/23 predict poor prognosis and promote cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res* 2020;12:1614-1639.
 105. Liu Z, Sun Q, Wang X. PLK1, A potential target for cancer therapy. *Translational Oncology* 2017; 10:22-32.

