

Warszawa, 27.04.2017

Prof. dr hab.n. med. Anna Nasierowska-Guttmejer
Zakład Patomorfologii CSK MSWiA w Warszawie,
Zakład Patologii, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Aleksandry Gos

pt. „*Molekularna charakterystyka czerniaków w III stopniu
zaawansowania klinicznego*”

Praca doktorska mgr Aleksandry Gos została wykonana w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Promotorem jest prof. dr hab. med. Piotr Rutkowski.

Czerniak skóry, mimo że stanowi niewielki procent nowotworów złośliwych skóry (około 4%), jest główną przyczyną zgonów (około 80%) chorych na nowotwory rozwijające się w wymienionej lokalizacji. Według danych amerykańskich obserwowany jest stały wzrost zachorowań na czerniaka, określany na 3% rocznie. W Polsce według danych Krajowego Rejestru Nowotworów w 2013 roku stwierdzono 3027 zachorowań (1613 u kobiet i 1414 u mężczyzn) oraz 1400 zgonów (661 u kobiet i 739 u mężczyzn) chorych na ten nowotwór. Szerokie stosowanie dermatoskopii do badania zmian skórnych przyczyniło się z jednej strony do usuwania zmian podejrzanych w kierunku czerniaka określanych przez dermatologów terminem atypowych zmian melanocytarnych, z drugiej zaś strony do wykrywania czerniaka na etapach wczesnego jego rozwoju pod postacią proliferacji atypowych melanocytów w naskórku, czerniaka in situ (Tis) lub z płytką inwazją. Decyzje terapeutyczne podejmowane są na podstawie stopnia zaawansowania (*Stage*) nowotworu w oparciu o mikroskopową klasyfikację pTNM AJCC/UICC 8. wydanie 2017 na podstawie a. cechy guza pierwotnego (pT); głębokości naciekania w mm według Breslova i obecności owrzodzenia, b. stanu regionalnych węzłów chłonnych (pN); liczby węzłów chłonnych z przerzutami niejawnymi klinicznie (*clinically occult*), jawnymi klinicznie (*clinically evident*) i

obecności przerzutów in-transit i/lub przerzutów mikrosatelitarnych, c. przerzutów odległych (pM). Stopnie zaawansowania I i II (Stage I, Stage II) wiążą się z dobrym rokowaniem, wskaźnikiem 5-letniego przeżycia 90 – 60% i odpowiadają czerniakowi bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych wykluczonych na podstawie patomorfologicznego badania węzła/ów wartowniczych. Stopień III (Stage III) identyfikuje chorych z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych, przerzutami do węzłów chłonnych i/lub przerzutami mikrosatelitarnymi i/lub przerzutami in-transit i bez przerzutów odległych. Chorzy w Stopniu III klinicznego/patologicznego zaawansowania stanowią potencjalną grupę responderów na leczenie uzupełniające. Stanowią oni materiał badawczy w niniejszej pracy doktorskiej. Do diagnostyki czerniaka, poza podstawową patomorfologiczną, wkroczyła diagnostyka molekularna. Stanowi ona bardzo ważny element poznawczy, ale istotnym jest iż znalazła zastosowanie w terapii chorych. W ostatnich latach nadzieję na postępy w leczeniu chorych na czerniaka budzą immunoterapia i terapia celowana molekularnie. W przypadku immunoterapii zastosowanie znajduje przeciwciało monoklonalne z rodziny immunoglobulin blokujące antygen 4 związane z limfocytami T cytotoksycznymi (CTLA-4), którego celem jest wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej. Przykładem leku typu przeciwciał blokujących CTLA-4 i zwiększających aktywację limfocytów jest ipilimumab. Jego działanie staje się silniejsze przy zastosowaniu przeciwciała blokujących również inne supresyjne szlaki sygnałowe, np. zależne od cząsteczek PD-1. W przypadkach stosowania terapii celowanej molekularnie stosuje się monoterapię inhibitorami BRAF dabrafenibem lub dającą lepsze wyniki w połączeniu z inhibitorami MAK czyli dabrafenib z tramenitibem.

Mgr Aleksandra Gos w pracy doktorskiej w rozdziale „Wprowadzenie” zawartym na 25 stronach dokładnie omówiła epidemiologię oraz patomorfologiczną i molekularną diagnostykę czerniaka. Przedstawiła swoją wiedzę z zakresu zaburzeń molekularnych oraz metod diagnostyki molekularnej, które stanowiły podstawę merytoryczną sformułowanego przez Nią celu pracy. Doktorantka zaprezentowała szeroką wiedzę na temat deregulacji na poziomie receptorów kinazy tyrozynowej i kodujących je genów *EGFR*, *KIT* i *MET*, ścieżek sygnałowych MAPK i uczestniczących w niej białek RAS (NRAS, HRAS i KRAS), z których najczęściej dochodzi w czerniaku do mutacji genu *NRAS* (20% przypadków) oraz ścieżki sygnałowej PI3K/AKT. W ścieżce sygnałowej MAPK efektorami białek NRAS są białka z rodziny kinaz serynowo-treoninowych RAF, z których największe znaczenie w biologii czerniaka ma białko BRAF. Gen *BRAF* może być zmutowany w około 60% przypadków czerniaka, zwykle (95% przypadków) w formie jednonukleotydowej substytucji V600E. Poza

szczegółowym omówieniem zaburzeń molekularnych, Doktorantka przedstawiła optymalne warunki otrzymania dobrej jakości materiału tkankowego do badania molekularnego. Prawidłowe jego utrwalenie w formalinie i ocena przez patomorfologa są warunkami koniecznymi warunkującymi prawidłowy wynik badania molekularnego. Mgr Aleksandra Gos przedstawiła także molekularne metody badawcze wymieniając bezpośrednio sekwencjonowanie poszczególnych fragmentów DNA metodą Sanger oraz test (Roche) oparty na technice ilościowego PCR i przeprowadzany na dedykowanym mu urządzeniu cobas R Analyzer. Druga z wymienionych metod służy do identyfikacji mutacji V600E w genie *BRAF*. Wymieniony test Roche został opracowany po wprowadzeniu dabrafenibu do terapii czerniaka i wykorzystywany jest do wykrywania dwóch najczęstszych mutacji w genie *BRAF*: V600E i V600K. Doktorantka zwróciła uwagę, iż w ostatnich latach nastąpiła intensyfikacja badań nad znalezieniem skutecznej terapii czerniaka, z czym bezpośrednio wiążą się oczekiwania na poznanie nowych mutacji potencjalnie mogących stanowić cele dla terapii. Szczególne oczekiwania wiążą się z techniką sekwencjonowania genomowego NGS (*next generation sequencing-NGS*), która ukierunkowuje analizę na poszczególne fragmenty genomu, geny lub konkretne eksony danych genów. Obszerna i uporządkowana wiedza przedstawiona przez Doktorantkę we „Wprowadzeniu” stanowi zrozumiały przekaz w zakresie aktualnego stanu wiedzy i umiejscowienia problematyki diagnostyczno-klinicznej badanej w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Głównym celem postawiony przez Doktorantkę było oznaczenie częstości mutacji w genach *BRAF* i *NRAS* w grupie chorych na czerniaka w stopniu III oraz określenie wpływu tych mutacji na rokowanie chorych. Dodatkowo mgr Aleksandra Gos porównała metody oznaczania zmian obserwowanych w genie *BRAF* pod kątem specyficzności i dokładności.

Materiał badawczy stanowiły 256 przypadki poddane badaniu DNA, 11 innych przypadków wykluczono na podstawie małej zawartości tkanki nowotworowej (poniżej 5%) lub niskiego stężenia DNA. Materiał biologiczny stanowił materiał tkankowy utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie archiwizowany w Zakładzie Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Celem wyboru dobrej jakości materiału wszystkie przypadki były ponownie oceniane przez doświadczonego patomorfologa. Bloki parafinowe pochodziły od chorych leczonych w Klinice Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. W każdym przypadku były dostępne dane kliniczno-patologiczne i obserwacje po limfadenektomii. Podkreślenia wymaga, iż u wszystkich chorych rozpoznano

czerniaka w stopniu III, czyli klinicznie stwierdzonymi i histopatologicznie potwierdzonymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych. Czas obserwacji wyniósł od 4 do 186 miesięcy, z medianą czasu obserwacji 53 miesiące. W badanej grupie chorych wyróżniono podgrupę 103 przypadków o nieznanym punkcie wyjścia, w których przerzut do węzłów chłonnych był pierwszą manifestacją choroby.

Doktorantka przeprowadziła analizę statusu mutacyjnego genów *BRAF* i *NRAS* za pomocą sekwencjonowania sangerowskiego. Badanie wykonane u 250 chorych wykazało obecność mutacji w genie *BRAF* w 154 przypadkach (62%) w tym w 141 przypadkach V600E, a w genie *NRAS* u 42 chorych (17% przypadków). Nie zaobserwowano zależności między występowaniem mutacji w genach *BRAF* i *NRAS*, a przeżyciem wolnym od nawrotu choroby ani przeżyciem całkowitym. Obecność mutacji w genach *BRAF* i *NRAS* nie wykluczała się wzajemnie, a w 54 przypadkach nie wykryto mutacji w wymienionych genach. Analiza 5-letnich przeżyć całkowitych (OS) w badanej grupie wyniosła 43,6% licząc od czasu wycięcia zmiany pierwotnej oraz 32,6% licząc od daty limfadenektomii. Nie zaobserwowano wpływu obecności mutacji w genie *BRAF* na przeżycie całkowite chorych. Czynniki o negatywnym znaczeniu rokowniczym okazały się płeć męska, przerzut do więcej niż jednego węzła chłonnego i naciek pozatorebkowy węzła chłonnego. W grupie 181 chorych stwierdzono nawrót choroby, a u 135 chorych przerzuty odległe w momencie nawrotu. Nie stwierdzono różnic w grupach z mutacją w genie *BRAF* i w genie *NRAS*, w porównaniu do grupy bez mutacji w odniesieniu do częstości występowania nawrotu choroby. W odrębnej grupie badawczej 103 czerniaków o nieznanym punkcie wyjścia mutację w genie *BRAF* stwierdzono w 55 przypadkach (53%) i mutację w genie *NRAS* w 14 przypadkach (14%). 5-letnie przeżycie całkowite (OS) dla tej grupy chorych wyniosło 34%. Nie obserwowano korelacji między OS, a obecnością mutacji w obu genach. Stwierdzono jednak negatywny wpływ obecności mutacji w genach *BRAF* i *NRAS* na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby (RFS) [18 vs. 19 vs. 31% odpowiednio dla przypadków z mutacją w obu genach i bez mutacji]. Najważniejszym czynnikiem prognostycznym wpływającym na OS w tej grupie chorych okazała się liczba węzłów chłonnych z przerzutami powyżej 1.

Doktorantka następnie porównała dwie metody oznaczania mutacji w genie *BRAF* tj. sekwencjonowania sangerowskiego i cobas 4800 BRAF V600 Test. Wyniki porównywalne uzyskano w 215/226 przypadków. Porównanie obydwu technik wykazało wysoką skuteczność i zgodność przy stosowaniu w rutynowej diagnostyce.

Dodatkowo w grupie 102 chorych przeprowadzono analizę statusu mutacyjnego 50 genów za pomocą sekwencjonowania eksomowego i porównywano je za pomocą sekwencjonowania sangerowskiego. Stwierdzono ponad 100 zmian w 29 genach, a obecność ich w 75% potwierdzono metodą sekwencjonowania sangerowskiego. Badania te wskazały na wysoką heterogenność zmian mogącą przekładać się na rokowanie.

Doktorantka wyciągnęła 4 grupy wniosków stwierdzając, iż

1. Mutacje w genach *BRAF* i *NRAS* odpowiadały molekularnemu typowi czerniaka wywodzącego się ze skóry nieuszkodzonej przez przewlekłe działanie promieni słonecznych oraz u chorych w stopniu III zaawansowania klinicznego czerniaka nie wykazywały istotnego wpływu na OS I RFS,
2. Obecność mutacji w genach *BRAF* i *NRAS* w czerniakach o nieznanym ognisku pierwotnym koreluje z obniżonym RFS, ale nie ma przełożenia na długość całkowitego przeżycia,
3. Wiek bloków parafinowych przy zachowaniu prawidłowych warunków przechowywania nie jest czynnikiem ograniczającym ich zastosowanie do analiz molekularnych. Test cobas wykazuje wyższą czułość w przypadku materiału gorszej jakości, a sekwencjonowanie sangerowskie umożliwia oznaczenie rzadszych mutacji,
4. Dla przeszło połowy badanych przypadków wykazano obecność przynajmniej jednej dodatkowej mutacji w jednym z badanych genów, dla 16 przypadków nie wykazano mutacji w żadnym z badanych genów.

Podsumowując, pozytywnie oceniam wszystkie etapy pracy doktorskiej mgr Aleksandry Gos. Forma prezentacji wyników i dyskusja przebiegają w sposób prawidłowy. Piśmiennictwo w liczbie 191 zawiera aktualne i ważne pozycje uwzględnione w niniejszej pracy. Podkreślenia wymaga staranność wykonania badań i przedstawienia wyników. Ważnym etapem niniejszej pracy było przygotowanie materiału badawczego, który stanowiły bloczki parafinowe zbierane w archiwum Zakładu Patologii Centrum Onkologii-Instytutu od 1995 roku. Z dużego zbioru przypadków patomorfolog wyselekcjonował materiał biologiczny dobrej jakości do badań molekularnych.

W mojej opinii praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Gos do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Niniejsza praca doktorska jest podsumowaniem kilkuletniej pracy wykonanej w ramach pracy finansowanej ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu i ze środków przyznanych na działalność statutową Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Doktorantka jest pierwszym autorem jednej pracy i współautorem dwóch prac zawierających analizy opisane w niniejszej pracy doktorskiej. Opublikowane one zostały w czasopismach w 2014 roku o IF 4.532, 2.001 i 1.409 (Ann Sur Oncol, Int J Clin Exp Pathol i Oncol Lett).