

dr hab. n. med. Dariusz Nejc
Klinika Chirurgii Onkologicznej UM w Łodzi
Ul. Paderewskiego 4
93-509 Łódź

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Gos pt.:
„Molekularna charakterystyka czerniaków w III stopniu zaawansowania klinicznego”

Biologia molekularna odgrywa coraz większą rolę w diagnostyce i leczeniu chorych na nowotwory złośliwe. U chorych na czerniaka postęp w leczeniu wiąże się między innymi z rozwojem leczenia ukierunkowanego molekularnie. Oznaczanie statusu mutacji BRAF jest wymagane u chorych z przerzutowym czerniakiem – pozwala na podjęcie prawidłowych decyzji terapeutycznych i włączenie odpowiedniego leczenia. Pomimo znacznego postępu w poznaniu biologii czerniaka, w III stopniu zaawansowania choroby (przerzuty do węzłów regionalnych i/albo przerzutów in-transit) przeżycia wynoszą od około 30 do 80%. Przyczyny powyższej rozbieżności nie są dostatecznie wyjaśnione. Poszukuje się markerów, które pozwoliłyby na podział tej grupy na chorych lepiej i gorzej rokujących. W czerniakach zaawansowanych występuje wiele zmian molekularnych takich jak mutacje, delecje, insercje, zmiany na poziomie chromosomowym i zmiany epigenetyczne. Podejmowane są próby wykorzystania tych zmian do selekcji chorych do grup o różnym rokowaniu. W związku z tym wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za trafny i uzasadniony.

Przedstawiona mi zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie praca mgr Aleksandry Gos pt.: „Molekularna charakterystyka czerniaków w III stopniu zaawansowania klinicznego” celem oceny jako rozprawa na stopień doktora nauk medycznych, została wydana w Warszawie w 2017 roku. Praca zawiera 117 stron, 15 rycin i łącznie 16 tabel. Doktorantka zamieszcza w pracy 191 pozycji piśmiennictwa. Układ pracy jest klasyczny.

Wstęp rozprawy został napisany bardzo ciekawie i przejrzystie. Rozpoczyna go przedstawienie ogólnej charakterystyki choroby, epidemiologii, klasyfikacji i oceny zaawansowania czerniaków. Następnie doktorantka opisała klasyfikację molekularną czerniaków, kluczowe ścieżki molekularne i zmiany na poziomie chromosomowym. Rozdział jest bardzo czytelny zarówno dla specjalisty biologii molekularnej i dla onkologa.

Założenia i cele pracy są sformułowane jasno. Doktorantka postanowiła 1) oznaczyć częstość mutacji w genach BRAF i NRAS w jednolitej grupie przypadków czerniaka w III stopniu zaawansowania klinicznego i określić wpływ obecności tych mutacji na rokowanie

chorych ; 2) oznaczyć częstość mutacji w genach BRAF i NRAS w grupie rzadkich przypadków czerniaka o nieznanym ognisku pierwotnym z przerzutami do węzłów chłonnych i określić wpływ obecności tych mutacji na rokowanie chorych oraz wyodrębnić różnice w podłożu molekularnym w tej grupie chorych; 3) porównać metody oznaczania zmian w genie BRAF; 4) określić w grupie badanej częstość i typy mutacji towarzyszących i potencjalnych nowych mutacji wiodących, ocenić ich współwystępowanie z mutacjami BRAF i NRAS oraz określić ich wpływ na przebieg choroby w III stopniu zaawansowania klinicznego.

Do badań Doktorantka włączyła 250 chorych z potwierdzonym rozpoznaniem czerniaka w III stopniu zaawansowania klinicznego (III B, C; TxN1-3M0 wg kryteriów AJCC z 2010 roku). Chorzy byli leczeni w Klinice Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie w latach 1995 - 2010. Okres obserwacji wynosił od 4 do 186 miesięcy, z medianą wynoszącą 53 miesiące. Kryteria włączenia i wyłączenia chorych z grupy badanej oraz opis materiału biologicznego są przedstawione jasno. Materiał biologiczny stanowiły 267 bloki parafinowe (zawierające przerzuty czerniaka do węzłów chłonnych) z archiwum Zakładu Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie oraz dla podgrupy czerniaków o nieznanym ognisku pierwotnym (63 na 103 bloki) z instytucji współpracujących (Cancer Institute Gustave Roussy, Erasmus University Medical Center –Daniel den Hoeden Cancer Center, Uniwersytet Medyczny w Łodzi). Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej oraz świadomą zgodę chorych na użycie ich materiału do badań.

Doktorantka przeprowadziła:

- izolację DNA ze skrawków parafinowych z użyciem zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology) wg protokołu producenta;
 - analizę statusu mutacyjnego danego genu przy użyciu bezpośredniego sekwencjonowania metodą Sanger – dla genu BRAF ekson 11 i 16, NRAS ekson 1 i 2, dla 16 przypadków czerniaka skóry dłoni stóp i o nieznanym ognisku pierwotnym również analizę fragmentu genu – KIT ekson 9,11,13 i 17;
 - porównanie wykrywania mutacji w kodonie V600 genu BRAF przy użyciu bezpośredniego sekwencjonowania i testu cobas®4800 BRAF V600Mutation Test
 - przy użyciu platformy sekwencjonowania eksomowego – system Ion AmpliSeq™ Cancer Panel v2 wykrywanie mutacji w panelu 50 genów powiązanych z rozwojem nowotworów.
- Przedstawiony materiał i metody badawcze uzupełniają załączniki 1-5.

Opis **Materiału oraz Metodyki** przeprowadzonego badania jest logiczny i spójny.

Wyniki zostały przedstawione bardzo obszernie i precyzyjnie. Tekst uzupełniają tabele i ryciny oraz załącznik nr 6. Doktorantka przedstawiła wyniki wykrywania mutacji w genie

BRAF, NRAS, KIT; mutacji BRAF i NRAS w podgrupie czerniaków o nieznanym ognisku pierwotnym; mutacji w panelu 50 genów powiązanych z rozwojem nowotworu przy użyciu Ion AmpliSeq™ Cancer Panel v2 oraz określiła znaczenie kliniczne mutacji w genach BRAF i NRAS i przedstawiła wyniki porównania wykrywania mutacji w kodonie V600 genu BRAF przy użyciu bezpośredniego sekwencjonowania i testu cobas®4800 BRAF V600Mutation Test.

Doktorantka stwierdziła obecność mutacji w genie BRAF w 61,6% przypadków, większość w kodonie V600 (91,6% mutacji w genie BRAF, większość w kodonie Q61 eksonu 2); obecność mutacji w genie NRAS w 16,8 %, nie stwierdziła obecności mutacji w genie NRAS w żadnym przypadku z obecnością mutacji w genie BRAF; obecność mutacji w eksonie 11 genu KIT w 3 na 56 preparatów i eksonie 13 KIT w 1 na 56 preparatów w podgrupie z pierwotnym czerniakiem na stopie, dłoni lub o nieznanym ognisku pierwotnym). Doktorantka wykazała istotną statystycznie korelację obecności mutacji w genie BRAF z młodszym wiekiem chorych w momencie rozpoznania i odwrotny trend w dla mutacji w genie NRAS: nie zaobserwowała wpływu obecności mutacji w genie BRAF i NRAS na całkowite przeżycie chorych i czas od rozpoznania do nawrotu choroby; w podgrupie czerniaków o nieznanym ognisku pierwotnym wykazała obecność mutacji w genie BRAF u 53,4% chorych (większość w kodonie V600), obecność mutacji w genie NRAS w 13,6% przypadków, nie stwierdziła obecności mutacji w genie NRAS w żadnym przypadku z obecnością mutacji w genie BRAF, odsetki 5-letnich przeżyć wolnych od nawrotu choroby były istotnie niższe z mutacją w genie BRAF – 18,3%, NRAS 19,4% niż bez mutacji – 31,3%. W wyniku porównania wykrywania mutacji w kodonie V600 genu BRAF przy użyciu bezpośredniego sekwencjonowania i testu cobas®4800 BRAF V600Mutation Test, doktorantka uzyskuje taki sam status mutacyjny kodonu V600 w 95,13% wyników. W rozdziale 4.4 doktorantka opisuje wyniki wykrywania mutacji dodatkowych – w przypadkach BRAF/NRAS + wykazała obecność co najmniej jednej dodatkowej mutacji (46 na 68 próbek), w grupie bez mutacji BRAF i NRAS wykazała obecność przynajmniej jednej mutacji w 18 na 34 przypadki.

Dyskusja jest napisana nowocześnie i dojrzałe. Świadczy o doskonałej znajomości przez Doktorantkę tematyki z zakresu biologii molekularnej czerniaków. Układ rozdziału oraz poziom i dogłębność dyskusji, analizy danych z dostępnej literatury i porównanie z wynikami uzyskanymi przez Doktorantkę – uznają za wzorcowo przeprowadzoną dyskusję.

Wnioski, w liczbie czterech wynikają z przeprowadzonego badania. Są czytelne i odpowiadają celom postawionym w pracy.

Piśmiennictwo obejmuje 191 pozycji oraz 3 narzędzia online. Jest prawidłowo dobrane i zamieszczone w kolejności alfabetycznej. Wśród cytowanych prac znalazły się pozycje opublikowane w języku polskim.

Praca jest napisana starannie i jest dobrze zredagowana.

Z obowiązku recenzenta muszę wskazać drobne nieścisłości jakie wkradły się w tekst rozprawy, np.: 1) w opisie metodyki pracy nie umieszczono metod analizy statystycznej, 2) odnośniki do pozycji piśmiennictwa w tekście pracy zawierają nazwisko autora i rok publikacji – przedstawienie w tekście numeru pozycji wg mnie jest bardziej przejrzyste

Muszę podkreślić że poczynione przeze mnie uwagi nie umniejszają mojej **bardzo wysokiej oceny** recenzowanej rozprawy.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska pt: „Molekularna charakterystyka czerniaków w III stopniu zaawansowania klinicznego” odpowiada ustawowym wymogom stawianym rozprawie na stopień doktora nauk medycznych i niniejszym przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie wniosek o dopuszczenie mgr Aleksandry Gos do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny, oraz obszerność przedstawianego w rozprawie materiału i dogłębność jego analizy, wnioskuję o jej **wyróżnienie**.

Łódź 22.05.2017

dr hab. n. med. Dariusz Nejc