

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

Lek. Anety Borkowskiej

**pt. „Charakterystyka immunohistochemiczna i analiza molekularna
wybranych genów czerniaków zlokalizowanych w obrębie rąk i stóp u chorych
leczonych w Centrum Onkologii-Instytucie”**

Praca doktorska w formie monotematycznego cyklu publikacji

Promotor: prof. dr hab. n. med. Piotr Rutkowski

Promotor pomocniczy: dr n. med. Anna Szumera-Ciećkiewicz

Klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia WHO 2018 roku opublikowana w 4. wydaniu Klasyfikacji Nowotworów Skóry wprowadziła podział czerniaków na podstawie czynników epidemiologicznych, klinicznych, histopatologicznych i molekularnych. Głównym parametrem histopatologicznym dzielącym czerniaki na typy okazały się zmiany posłoneczne w skórze wywołane działaniem promieni UV. Pierwsza kategoria zmian melanocytarnych wywołana jest działaniem promieni słonecznych. W skórze o dużym stopniu uszkodzenia wynikającym ze skumulowanej wysokiej dawki promieniowania (ang. *high cumulative skin damage, high-CSD*) rozwijają się czerniaki lentiginalne (LM) i desmoplastyczne, natomiast w skórze z niewielkim stopniem uszkodzona słonecznego / sporadycznie narażonej na promieniowanie UV (*low-CSD*) występują czerniaki powierzchownie szerzące się. Drugą kategorię stanowią czerniaki rozwijające się w skórze bez kumulacji zmian posłonecznych. Włączono do niej czerniaki rzadziej spotykane jak akralne kończynowo-podpaznokciowe oraz typu Spitz, błękitne, śluzówkowe, rozwijające się w znamionach wrodzonych i naczyńiówce oka. Osobną kategorię stanowi czerniak guzkowy, który nie ma związku z wymienionymi kategoriami zmian melanocytarnych. Do istotnych zmian w klasyfikacji WHO 2018 weryfikujących dotychczasową wiedzę na temat zmian melanocytarnych należy zdefiniowanie dziewięciu dróg patogenezы odzwierciedlających zaburzenia molekularne na drodze transformacji nowotworu i korelujących z typami histologicznymi. Szczególną grupę

wśród nich stanowią czerniaki akralne, zaliczone do 5. grupy patogenetycznej wg klasyfikacji WHO 2018, rozwijające się w obrębie gładkiej wewnętrznej skóry rąk i stóp z wyszczególnieniem lokalizacji pod paznokciowej. Charakteryzuje je specyficzny obraz mikroskopowy. W większości przypadków rozwijają się bez poprzedzającego ich etapu znamienia. Rozwój czerniaków następuje w wyniku zaburzeń chromosomowych melanocytów usytuowanych w strefie połączenia skórno-naskórkowego na obwodzie języków naskórka wnikaających w głąb podścieliska. Histologia gładkiej skóry wewnętrznej powierzchni rąk i stóp oraz macierz płytki paznokcia, determinują szybką ścieżkę karcinogenezy z wnikaniem atypowych melanocytów do głębokich warstw skóry i predysponują do agresywnego przebiegu czerniaka akralnego. Inne typy czerniaka mogą również występować na skórze rąk i stóp, ale zwykle lokalizują się na powierzchni grzbietowej, co wiąże się z inną drogą patogenetyczną niż czerniaki akralne. W kontekście nowej klasyfikacji WHO 2018 czerniaka i poruszonych w niej aspektów histopatologicznych oraz molekularnych, uważam wybór celu prac stanowiących cykl opublikowanych badań za bardzo uzasadniony i mieszczący się w bieżącym nurcie światowych badań naukowych. Szczególnie podkreślenia wymaga wybór czerniaków zlokalizowanych w obrębie rąk i stóp jako trafny materiał badawczy, z uwagi na rzadkie ich występowanie, trudności diagnostyczne niejednokrotnie opóźniające rozpoznanie, a związane z histologią skóry tej okolicy oraz rodzaj zaburzeń molekularnych odmiennych od innych zmian melanocytarnych.

Praca doktorska składa się z listy publikacji wchodzących w skład cyklu, aktywności powiązanych z cyklem prac, streszczenia prac wchodzących w skład cyklu w języku polskim i angielskim oraz opublikowanych artykułów wchodzących w skład cyklu.

Monotematyczny cykl publikacji stanowią trzy artykuły o łącznym *impact factor* 6,606 według *Journal Citation Reports* i łącznej punktacji MNiSW 380 opublikowane w latach 2020- 2021;

1. Borkowska AM, Szumera-Ciećkiewicz A, Spalek MJ, Teterycz P, Czarnecka AM, Rutkowski PŁ. *Clinicoapthological Features and Prognostic Factors of Primary Acral Melanomain Caucasians*, J Clin Med. 2020 Sep 16;9(9):2996
2. Borkowska AM, Szumera-Ciećkiewicz A, Spalek MJ, Teterycz P, Czarnecka A, Kowalik A, Rutkowski P. *Mutation profile of primary subungual melanoma in Caucasians*. Oncotarget; 2020 JUN 23;11(25):2404-24013.

3. Borkowska AM, Szumera-Ciećkiewicz A, Chraszczewska M, Sokół K, Goryń T, Rutkowski PŁ. *Clinical Significance of Tumor Microenvironment in Acral Melanoma: A Large Single-Institution Study of Caucasians*. J Clin Med. 2021 Apr 1;10(7):1452.

Doktorantka podjęła się zbadania cech klinicznych, histopatologicznych oraz czynników prognostycznych i wyników leczenia chorych na czerniaka rąk i stóp z uwzględnieniem podgrupy czerniaków podpaznokciowych. Następnie określiła profil mutacji genetycznych w pierwotnych czerniakach podpaznokciowych stosując sekwencjonowanie nowej generacji wykonując analizę wymienionych miejsc w 50 genach uznanych powszechnie za związane ze zmianami nowotworowymi. W trzecim etapie celem Doktorantki była ocena mikrośrodowiska i jego wpływu na rokowanie chorych z czerniakiem rąk i stóp na podstawie cech klinicznych, histopatologicznych i wyników przeżycia 70 chorych. W swojej analizie skupiała się na ocenie limfocytów naciekających guz (TILs) z uwzględnieniem ekspresji PD-L1 mającej znaczenie prognostyczne i predykcyjne w wybranych nowotworach przy jednocześnie nieokreślonej roli w czerniaku. W mojej opinii Doktorantka prawidłowo sformułowała poszczególne cele niniejszej rozprawy doktorskiej. Badała parametry prognostyczne w wydzielonej grupie czerniaków, a także podjęła się próby oceny roli predykcyjnej wybranych biomarkerów.

Aby zrealizować postawione cele, Doktorantka dokonała bardzo pracochłonnego przeglądu dokumentacji medycznej wszystkich chorych leczonych na czerniaka w latach 1997 – 2014 w Narodowym Instytucie Onkologii w Warszawie. Z grupy 2537 chorych leczonych na pierwotnego czerniaka skóry wyodrębniła 247 (9,7%) przypadków czerniaka rąk i stóp. Podzieliła je następnie na czerniaki nie-podpaznokciowe (Non-SUM) i podpaznokciowe (SUM) (1,8% populacji).

Wyniki Doktorantka przedstawiła szczegółowo w przystępnej formie tabeli wraz z analizą statystyczną. Jako patomorfolog, szczególną uwagę zwróciłam na rozpoznanie typów histologicznych czerniaka wśród czerniaków SUM i Non-SUM. Znalazł się on jako jeden z czynników klinicznopatologicznych poddanych analizie statystycznej. Z badań w niniejszej pracy wynika, iż typ akralny (ALM) wystąpił w 39% czerniaka rąk i dłoni i w 70,6% czerniaka podpaznokciowego. Pozostałymi okazały się typowe czerniaki guzkowe, powierzchownie naciekające i lentiginalne. Wyniki tych badań wskazują na heterogenność histologiczną czerniaków rąk i stóp oraz podpaznokciowych, która między innymi wynika z lokalizacji na powierzchni wewnętrznej, gładkiej lub zewnętrznej grzbietowej. Kolejne

wyniki badań dotyczące analizy przeżycia w korelacji z parametrami klinicznymi (wiek, płeć) i mikroskopowymi (podtyp histologiczny badany jako jeden parametr, owrzodzenie, grubość w mm wg Breslova, stan zaawansowania i status węzła chłonnego wartowniczego) pozwoliły wyciągnąć istotne wnioski potwierdzające, iż pacjenci z lokalizacją czerniaków w skórze rąk i stóp wykazują gorsze przeżycie całkowite w porównaniu z całą populacją czerniaków, a płeć męska i dodatni status biopsji węzłów chłonnych wartowniczych jest niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym. Na uwagę zasługuje, iż w badanej grupie dominowały czerniaki stóp.

W kolejnym etapie Doktorantka zbadała profil genetyczny w 31 czerniakach podpaznokciowych z podziałem na podtypy. Czerniak typu akralnego (ALM) dominował w tej grupie (76% przypadków). Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami innych badaczy wskazującymi na wysokie odsetki mutacji w genach *KIT* i *NRAS* w wymienionym typie czerniaka.

W trzecim etapie Doktorantka badając mikrośrodowisko guza wykonałam badania immunohistochemiczne celem oceny nacieków limfocytarnych jak CD4, CD8, FOXP3 i TILs oceniając stopień, gęstość i rozmieszczenie komórek. Analiza badań wykazała że TILs są istotnymi biomarkerami w predykcji statusu zajęcia węzła chłonnego wartowniczego. Rokowanie było natomiast niezależne od ekspresji PD-L1 na komórkach czerniaka. Nie wykazano korelacji między ekspresją PD-L1 a cechami klinicznymi i histopatologicznymi.

W podsumowaniu należy podkreślić umiejętność planowania badań, prowadzenie wieloczynnikowej analizy i wyciągnięcia adekwatnych wniosków mających przełożenie na klinikę przez lek. Anetę Borkowską. Uzyskane wyniki są unikalne w odniesieniu do innych publikacji o zasięgu międzynarodowym oraz uzupełniają je o wyniki przeprowadzone na grupie chorych diagnozowanych i leczonych w jednym ośrodku onkologicznym. Uwaga moja dotyczy ewentualnych kontynuowanych badań i sugestii, aby uwzględnić w analizach czynników prognostycznych, predykcyjnych lub molekularnych typy histologiczne czerniaków rąk i stóp odpowiadające odrębnej drodze patogenezy i zaleceniom klinicznym. Jak Doktorantka wykazała czerniaki SUM i NonSUM pod względem histologicznym nie są grupą jednorodną.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską w formie monotematycznego cyklu pt. „Charakterystyka immunohistochemiczna i analiza molekularna wybranych genów czerniaków zlokalizowanych w obrębie rąk i stóp u chorych leczonych w Centrum Onkologii-

Instytucie” oceniam wysoko. Odpowiada ustawowym wymogom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych i niniejszym przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie wniosek o dopuszczenie lek. Anety Borkowskiej do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny, wagę aktualną przedstawionego tematu oraz obszerność przedstawionego tematu i dogłębność analizy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. n. med. Anna Nasierowska-Guttmejer