

AUTOREFERAT
OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

Dr n. med. Piotr Donizy
Katedra i Zakład Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
E-mail: piotrdonizy@wp.pl

Wrocław, maj 2018

1. Imię i nazwisko: Piotr Donizy

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Dyplom lekarza – Wydział Lekarski, Akademia Medyczna we Wrocławiu, 2011

Doktor nauk medycznych – Wydział Lekarsko-Stomatologiczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, 2015

Tytuł rozprawy doktorskiej: Karcinogeneza gruczołu piersiowego w świetle badań nad deregulacją podziałów mitotycznych, procesami naprawy uszkodzeń DNA oraz polaryzacją i mobilnością komórkową (obroniona z wyróżnieniem)

Promotor: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Hałoń

Tytuł specjalisty w dziedzinie patomorfologia – Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi, 2018; kierownik specjalizacji: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Hałoń

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2011-2012 – staż podyplomowy, Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu

2012-2015 – studia doktoranckie, Katedra oraz Zakład Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

2012-2017 – etat rezydencki, Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu

03.2016 - obecnie – adiunkt, Katedra oraz Zakład Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl publikacji składających się z 7 prac oryginalnych o łącznej punktacji: IF: 14,36, Pkt. MNiSW/KBN: 165.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Rokownicze znaczenie wybranych parametrów histomorfologicznych i immunohistochemicznych guza pierwotnego jako potencjalnie użytecznych do oceny prognozy u pacjentów z czerniakiem skóry

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

- 1. Piotr Donizy**, Maciej Kaczorowski, Agnieszka Hałoń, Marek Leśkiewicz, Rafał Matkowski. Lymphangioinvasion in H&E staining is strongly associated with poor clinical outcome in lymph-node negative cutaneous melanoma patients. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2016; Vol.54 no.3; s.126-133
IF: 1.389
Pkt. MNiSW/KBN: 15.000
- 2. Piotr Donizy**, Przemysław Biecek, Maciej Kaczorowski, Agnieszka Hałoń, Adam Maciejczyk, Rafał Matkowski. Contrary effect of two types of spatial distribution (diffuse *versus* marginal) of CD8-positive lymphocytes on clinical outcome in melanoma patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2016; Vol.9 no.8; s.8415-8423
IF: 1.706
Pkt. MNiSW/KBN: 25.000
- 3. Piotr Donizy**, Przemysław Biecek, Agnieszka Hałoń, Rafał Matkowski. $BILL^{CD8}$ – a multivariable survival model as a simple and clinically useful prognostic tool to identify high-risk cutaneous melanoma patients. *Anticancer Res.* 2016; Vol.36 no.9; s.4739-4748
IF: 1.937
Pkt. MNiSW/KBN: 20.000
- 4. Piotr Donizy**, Maciej Kaczorowski, Przemysław Biecek, Agnieszka Hałoń, Teresa Szkudlarek, Rafał Matkowski. Golgi-related proteins GOLPH2 (GP73/GOLM1) and GOLPH3 (GOPP1/MIDAS) in cutaneous melanoma: patterns of expression and prognostic significance. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; Vol.17 no.10; s.1-18
IF: 3.226
Pkt. MNiSW/KBN: 30.000
- 5. Piotr Donizy**, Przemysław Biecek, Agnieszka Hałoń, Adam Maciejczyk, Rafał Matkowski.: Nucleoli cytomorphology in cutaneous melanoma cells - a new prognostic approach to an old concept. *Diagn.Pathol.* 2017 Vol.12; art.88 [9 s.]
IF: 2.025
Pkt. MNiSW/KBN: 25.000
- 6. Piotr Donizy**, Konrad Pagacz, Jakub Marczuk, Wojciech Fendler, Adam Maciejczyk, Agnieszka Hałoń, Rafał Matkowski.: Upregulation of FOXP1 is a new independent unfavorable prognosticator and a specific predictor of lymphatic dissemination in cutaneous melanoma patients. *OncoTargets Ther.* 2018 Vol.11; s.1413-1422
IF: 2.612
Pkt. MNiSW/KBN: 25.000

7. **Piotr Donizy**, Maciej Kaczorowski, Przemysław Biecek, Agnieszka Hałoń, Rafał Matkowski.: Nuclear pseudoinclusions in melanoma cells: prognostic fact or artifact? The possible role of Golgi phosphoprotein 3 overexpression in nuclear pseudoinclusions generation. *Pathol.Int.* 2018 Vol.68 no.2; s.117-122
IF: 1.465
Pkt. MNiSW/KBN: 25.000

Łączny Impact factor cyklu prac: 14,36, Pkt. MNiSW/KBN: 165

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Czerniak skóry jest jednym z najbardziej heterogennych nowotworów człowieka w kontekście prognozy długoterminowej, zarówno u pacjentów diagnozowanych we wczesnym klinicznym stadium zaawansowania (stopień I i II), jak również w bardziej zaawansowanych stadiach choroby, szczególnie w stopniu III. Klinicznie trudny do przewidzenia przebieg choroby obrazują dane dotyczące odsetka 5-letnich przeżyć w III stopniu zaawansowania, w którym rozrzut przeżyć 5-letnich waha się od 14% do 85%. Jak do tej pory jedynymi powszechnie aprobowanymi i używanymi w praktyce klinicznej histopatologicznymi czynnikami prognostycznymi w czerniaku skóry są parametry ujęte w 8. edycji klasyfikacji AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), obejmujące grubość nacieku wg Breslowa oraz obecność owrzodzenia. Pozostałe czynniki histomorfologiczne, które powinny być standardowo opisywane w każdym raporcie histopatologicznym obejmującym pierwotne rozpoznanie czerniaka, takie jak: wskaźnik mitotyczny, obecność i gradacja limfocytarnego nacieku zapalnego, limfangioinwazja, obecność regresji i ognisk mikrosatelitozy wymagają dalszych, wielośrodkowych badań, które doprecyzują ich prognostyczne znaczenie. Drugim, klinicznie stwierdzanym i histopatologicznie potwierdzanym najważniejszym czynnikiem rokowniczym w czerniaku jest status regionalnych węzłów chłonnych.

De facto prognozowanie rokowania u pacjentów z czerniakiem skóry jest możliwe głównie w momencie pierwotnego rozpoznania histopatologicznego na podstawie parametrów histomorfologicznych określonych przez CAP (*College of American Pathologists*) oraz poprzez detaliczne badanie kliniczne pacjenta (kliniczny status regionalnych węzłów chłonnych z ich ewentualną następową ewaluacją w badaniu mikroskopowym po selektywnej limfadenektomii oraz obecność lub brak przerzutów odległych stwierdzanych w badaniach obrazowych). To właśnie właściwe opisanie wszystkich szczegółowych parametrów histomorfologicznych w momencie diagnozy czerniaka warunkuje precyzyjną stratyfikację prognostyczną i wdrożenie ewentualnego, bardziej agresywnego leczenia lub co najmniej wzmożoną obserwację kliniczną.

W części przypadków pomimo leczenia podjętego we wczesnych stadiach zaawansowania klinicznego dochodzi do progresji choroby. W przypadku rozsiewu nowotworowego stosowane dotychczas klasyczne leczenie systemowe nie prowadzi do poprawy przeżycia,

pomimo obserwowanych przypadków okresowej remisji. Olbrzymi postęp, jaki dokonał się na przełomie ostatnich dziesięcioleci w badaniach nad biologią molekularną czerniaka zaowocował powstaniem kilku obiecujących, ukierunkowanych molekularnie leków. Leczenie czerniaka z ich użyciem jest obecnie na etapie badań klinicznych. Jednak wiele pytań i zagadnień w obrębie złożonego procesu progresji czerniaka skóry wciąż pozostaje bez odpowiedzi, stąd też konieczność intensywnej eksploracji tej dziedziny onkologii i patomorfologii.

Celami poniższej rozprawy habilitacyjnej są:

- (1) ocena rokowniczego znaczenia limfangioinwazji u pacjentów z czerniakiem, ze szczególnym uwzględnieniem roli tego parametru u pacjentów bez przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych;
- (2) analiza rokowniczego znaczenia odsetka i przestrzennej dystrybucji limfocytów CD8⁺ i CD4⁺ stanowiących subpopulacje TILs (*tumor-infiltrating lymphocytes*);
- (3) stworzenie punktowego modelu prognostycznego bazującego na szczegółowych parametrach histopatologicznych guza pierwotnego wraz z oceną jego potencjalnej roli w identyfikacji pacjentów wysokiego ryzyka zgonu nowotworowego;
- (4) ocena znaczenia prognostycznego białek strukturalnych aparatu Golgiego w nowotworowych melanocytach, makrofagach towarzyszących guzowi (*tumor-associated macrophages*, TAMs) i fibroblastach towarzyszących guzowi (*cancer-associated fibroblasts*, CAFs);
- (5) ocena wybranych parametrów cytomorfologii jąderek (obecność, wielkość oraz ich liczba) jako potencjalnie użytecznych parametrów rokowniczych u pacjentów z czerniakiem skóry wraz z analizą korelacji ich obecności z ekspresją wybranych białek zaangażowanych w regulację przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (SPARC, N-cadherin), adhezję i mobilność komórkową (ALCAM, ADAM-10), regulację podziałów komórkowych (PLK1) i przeżycia komórek nowotworowych (FOXP1) oraz funkcjonowanie aparatu Golgiego (GOLPH3, GP73);
- (6) analiza znaczenia prognostycznego ekspresji białka FOXP1 w komórkach czerniaka i podścielisku guza wraz ze szczegółowym opisaniem wzorców immunoreaktywności;
- (7) ocena znaczenia prognostycznego obecności pseudoinkluzy wewnątrzjądrowych (NPIs, *nuclear pseudo-inclusions*) w komórkach czerniaka wraz z analizą korelacji ich obecności z ekspresją wybranych białek zaangażowanych w regulację przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (SPARC, N-cadherin), adhezję i mobilność komórkową (ALCAM, ADAM-10), regulację podziałów komórkowych (PLK1) i przeżycia komórek nowotworowych (FOXP1) oraz funkcjonowanie aparatu Golgiego (GOLPH3, GP73).

Ad.1. Pierwszy artykuł stanowiący element rozprawy habilitacyjnej pt. „*Lymphangi invasion in H&E staining is strongly associated with poor clinical outcome in lymph-node negative cutaneous melanoma patients*” dotyczy analizy znaczenia prognostycznego limfangioinwazji (LYI), czyli obecności zatorów z komórek nowotworowych w naczyniach limfatycznych. Rozsiew nowotworowych melanocytów drogą naczyń chłonnych stanowi jeden z kluczowych etapów progresji czerniaka. Obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych jest jednym z najistotniejszych czynników znacząco pogarszających rokowanie. Pacjenci bez węzłowych ognisk przerzutowych cechują się *a priori* lepszą prognozą długoterminową, jednak należy pamiętać, że jest to wciąż heterogenna grupa w kontekście rokowania – stąd też ważnym elementem badań w dermatopatologii jest poszukiwanie nowych czynników prognostycznych mogących lepiej stratyfikować prognostycznie pacjentów bez przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych.

Celem pracy była analiza korelacji pomiędzy szczegółowymi parametrami histopatologicznymi i klinicznym a obecnością LYI oraz analiza wpływu tego czynnika na rokowanie, ze szczególnym uwzględnieniem grupy pacjentów bez węzłowych ognisk przerzutowych. Grupę badawczą stanowiło 104 pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem skóry w latach 2005-2010 w Dolnośląskim Centrum Onkologii.

Obecność limfangioinwazji została stwierdzona u 28.8% pacjentów. Analiza statystyczna wykazała, że wzrost grubości nacieku wg skal Breslowa i Clarka ściśle koreluje z obecnością limfangioinwazji. Ponadto, istotnie częściej występowała ona w guzach charakteryzujących się owrzodzeniem oraz wysokim wskaźnikiem mitotycznym. Co więcej, w podtypie kończynowym (*acral-lentiginous melanoma*) znamienne częściej obserwowano zatory w naczyniach limfatycznych. Nie wykazano istotnych zależności pomiędzy LYI i pozostałymi parametrami histopatologicznymi, takimi jak: TILs, faza wzrostu, obecność ognisk mikrosatelitozy czy cechami regresji. Analiza krzywych Kaplana-Meiera wykazała, że LYI jest czynnikiem wyraźnie złej prognozy zarówno w całej grupie pacjentów, jak również u pacjentów bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (istotnie krótsze: czas przeżycia ogólnego (OS, *overall survival*), czas przeżycia specyficzny dla choroby nowotworowej (CSOS, *cancer-specific overall survival*) oraz czas wolny od nawrotu (DFS, *disease-free survival*).

Konkludując, parametr LYI powinien być zawarty w każdym raporcie histopatologicznym, który dotyczy rozpoznania czerniaka, ponieważ może stanowić istotne, dodatkowe źródło dotyczące rokowania u pacjentów z czerniakiem. Co więcej, obecność LYI w guzie pierwotnym u pacjenta bez klinicznych wykładników zajęcia węzłów chłonnych może być swoistym markerem „niemych” kliniczne ognisk przerzutowych. Powyższe wstępne obserwacje wymagają oceny w wielośrodkowych badaniach kohortowych, które określiłyby przydatność prognostyczną LYI u pacjentów z czerniakiem skóry.

Ad.2. W kolejnej pracy pt. „*Contrary effect of two types of spatial distribution (diffuse versus marginal) of CD8-positive lymphocytes on clinical outcome in melanoma patients*” został poddany analizie jeden z aspektów odpowiedzi immunologicznej jako potencjalnego czynnika prognostycznego w czerniaku, a mianowicie ocena odsetka limfocytów CD4⁺ i CD8⁺. Badanie objęło 68 pacjentów ze stwierdzoną w badaniu histopatologicznym obecnością nacieku limfocytarnego (TILs brisk i non-brisk wg *Collage of American Pathologists*). Ekspresję CD4 i CD8 oznaczono przy użyciu metod immunohistochemicznych. Odsetek dodatnich limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ został oceniony w 5 dużych polach widzenia (powiększenie 400×). Dodatkowo, zaobserwowano dwa przestrzenne wzorce dystrybucji subpopulacji limfocytów: rozlany (naciek limfocytarny zlokalizowany przypadkowo oraz rozproszony wśród komórek nowotworowych) i brzeźny (naciek limfocytarny zlokalizowany wyłącznie przypadkowo względem zasadniczej masy guza).

Analiza immunoreaktywności antygenów CD4 i CD8 wykazała zdecydowaną dominację subpopulacji limfocytów CD8⁺ w badanych guzach. Średni odsetek limfocytów CD8⁺ wynosił 69% a limfocytów CD4⁺ 11%. U 15 pacjentów zaobserwowano całkowity brak limfocytów CD4⁺. Przestrzenna dystrybucja limfocytów CD8⁺ wykazywała dominująco typ rozlany (58.8% przypadków), natomiast limfocyty CD4⁺ były obserwowane w większości przypadków jako zlokalizowane brzeźnie (83% przypadków).

Wysoki odsetek limfocytów CD8⁺ był ściśle skorelowany z mniejszą grubością nacieku wg Breslowa oraz brakiem limfangioinwazji. Co więcej, rozlany wzorec dystrybucji limfocytów CD8⁺ był także związany z mniejszą grubością nacieku wg Breslowa i niską aktywnością mitotyczną guza pierwotnego. Z kolei brzeźny typ dystrybucji limfocytów CD8⁺ był znamienne związane z obecnością owrzodzenia i zatorami z komórek nowotworowych w świetle naczyń limfatycznych. Nie wykazano żadnych istotnych zależności pomiędzy odsetkiem limfocytów CD4⁺ i analizowanymi parametrami kliniczno-patologicznymi.

Analiza przeżyć Kaplana-Meiera wykazała, że wysoki odsetek limfocytów CD8⁺ (≥70% globalnej populacji TILs) jest istotnie związany z korzystnym rokowaniem u pacjentów z czerniakiem w kontekście przeżycia całkowitego specyficznego dla choroby nowotworowej. Podobną zależność stwierdzono w grupie pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych. Co ważne, analiza wpływu na przeżycia wolne od nawrotu (DFS) wykazała brak wpływu wysokiego odsetka limfocytów CD8⁺ na istotne skrócenie czasu wolnego od nawrotu czerniaka, zarówno w całej grupie pacjentów, jak i w grupie bez przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych.

Zaobserwowano, że istotne statystycznie znaczenie prognostyczne ma także typ przestrzennej dystrybucji limfocytów CD8⁺, ponieważ wykazano, że lokalizacja brzeźna jest ściśle związana z niekorzystnym rokowaniem zarówno w aspekcie przeżycia całkowitego specyficznego dla choroby nowotworowej oraz przeżycia wolnego od nawrotu. Z kolei rozlana dystrybucja limfocytów CD8⁺ była ściśle skorelowana z wyraźnie lepszą kliniczną prognozą. Odsetek limfocytów CD4⁺ oraz typ ich przestrzennej dystrybucji nie miał żadnego wpływu na rokowanie u pacjentów z czerniakiem.

Reasumując, ocena odsetka limfocytów CD8⁺ oraz ich przestrzennej dystrybucji w obrębie guza pierwotnego może być niezwykle istotna i pomocna w stratyfikacji prognostycznej pacjentów z czerniakiem.

Ad.3. Główna idea generowania modeli prognostycznych w badaniach nad czerniakiem opiera się na stworzeniu prostego i przyjaznego dla użytkownika algorytmu, który z największym prawdopodobieństwem oszacowałby ryzyko zgonu nowotworowego. W dostępnym piśmiennictwie zostało opisanych kilka modeli prognostycznych opartych w dużej mierze na klasycznych, standardowych czynnikach histopatologicznych i parametrach klinicznych obejmujących wiek pacjenta, lokalizację guza pierwotnego, grubość nacieku wg Breslowa oraz obecność owrzodzenia. W artykule pt. „*BILL^{CD8} – a multivariable survival model as a simple and clinically useful prognostic tool to identify high-risk cutaneous melanoma patients*” została podjęta próba stworzenia modelu prognostycznego opartego na wybranych parametrach histopatologicznych i immunologicznych guza pierwotnego.

Model prognostyczny *BILL^{CD8}* bazujący na grupie 86 pacjentów z czerniakiem skóry, obejmuje dwa główne parametry: grubość nacieku wg Breslowa oraz obecność i gradację limfocytarnego nacieku zapalnego (TILs), które okazały się być najważniejszymi czynnikami prognostycznymi wyłoniłymi spośród wszystkich analizowanych parametrów histopatologicznych guza pierwotnego przy wykorzystaniu modelu regresji logistycznej. Kolejnym krokiem było zastosowanie metody drzew decyzyjnych do analizy wpływu dodatkowego parametru, jakim był odsetek subpopulacji limfocytów CD8⁺ na ryzyko zgonu nowotworowego.

W proponowanym modelu przyznawane są dwa punkty, jeśli grubość nacieku jest większa niż 2 mm oraz jeden punkt, jeśli nie stwierdza się obecności limfocytarnego nacieku zapalnego. Wraz ze wzrostem liczby punktów znacząco rośnie ryzyko zgonu z powodu czerniaka. W przypadku uzyskania 3 punktów prawdopodobieństwo zgonu nowotworowego w obserwacji 4-letniej wynosi 75%, natomiast u pacjentów, którzy uzyskali 0 punktów (grubość nacieku wg Breslowa ≤ 2 mm oraz non-brisk lub brisk TILs) ryzyko zgonu wynosi 0%. W następnej analizie wykorzystującej drzewa decyzyjne z uszczegółowieniem subpopulacji TILs wykazano znaczący, korzystny wpływ wysokiego odsetka limfocytów CD8⁺ (>50% globalnej populacji limfocytów) na ryzyko zgonu u pacjentów z grubością nacieku wg Breslowa większą niż 2 mm – u tych pacjentów ryzyko zgonu wynosi 28%, z kolei w przypadku niskiego odsetka limfocytów CD8⁺ w czerniakach z grubością nacieku powyżej 2 mm ryzyko zgonu wynosi aż 67%.

Główne parametry prognostyczne w czerniaku, tj. grubość nacieku wg Breslowa oraz obecność i intensywność limfocytarnego nacieku zapalnego z określeniem odsetka limfocytów CD8⁺ mogą posłużyć z wysoką skutecznością do precyzyjnej stratyfikacji prognostycznej pacjentów, a co za tym idzie, pozwolą zintensyfikować częstość wizyt kontrolnych i szybciej rozpoznać potencjalną wznowę lub rozsiew i zastosować właściwe leczenie. Powyższy model prognostyczny nie jest kosztochłonny i pracochłonny, i co ważne, nie wymaga użycia dodatkowych metod biologii molekularnej, co umożliwia jego

implementację do rutynowego postępowania w każdym ośrodku zajmującym się leczeniem czerniaka.

Ad.4. Kolejna publikacja pt. „*Golgi-related proteins GOLPH2 (GP73/GOLM1) and GOLPH3 (GOPP1/MIDAS) in cutaneous melanoma: patterns of expression and prognostic significance*” stanowiąca element rozprawy habilitacyjnej obejmuje zagadnienia immunoreaktywności dwóch białek strukturalnych aparatu Golgiego (GOLPH2 i GOLPH3) w komórkach czerniaka, makrofagach towarzyszących guzowi (TAMs, *tumor-associated macrophages*) oraz fibroblastach towarzyszących guzowi (CAFs, *cancer-associated fibroblasts*). Jest to pierwsze w piśmiennictwie doniesienie opisujące wzorce ekspresji białek GOLPH2 i GOLPH3 w komórkach czerniaka i dwóch typach komórek podścieliskowych w korelacjach ze szczegółowymi parametrami kliniczno-patologicznymi i analizą ich znaczenia rokowniczego.

Immunohistochemiczna (IHC) ocena ekspresji białek GOLPH2 i GOLPH3 została przeprowadzona przy wykorzystaniu bloczków parafinowych pochodzących od 100 pacjentów z czerniakiem skóry. Dodatkowo wykonano analizę ekspresji powyższych białek w 30 znamionach łagodnych oraz 20 fragmentach skóry bez zmian patologicznych. Immunoreaktywność powyższych białek była oceniana przy wykorzystaniu skali półilościowej w nowotworowych melanocytach oraz makrofagach i fibroblastach towarzyszących guzowi (TAMs i CAFs).

Dla potwierdzenia obecności TAMs i CAFs w nacieku nowotworowym wykonano reakcje IHC z przeciwciałami przeciwko antygenom CD68 i SMA oraz kontrolną reakcję z przeciwciałem anti-Melan-A. Dodatni wynik anti-CD68 oraz ujemne statusy anti-SMA i Melan-A wskazywały na morfologię makrofagalną, z kolei dodatni wynik anti-SMA oraz ujemne statusy anti-CD68 i Melan-A wskazywały na fibroblasty. W każdym z analizowanych wątpliwych przypadków finalna interpretacja obrazu mikroskopowego opierała się oprócz barwień IHC, na ocenie cytomorfologii komórek. Dopiero nałożenie wyników badań IHC na odpowiednią cytomorfologię niewykazującą fenotypu komórki nowotworowej (małe, normochromatyczne jądro, bez istotnych zaburzeń kształtu jądra, praktycznie niewidoczne jąderko, prawidłowy stosunek jądro-cytoplazmatyczny) upoważniało do zaklasyfikowania danej komórki jako makrofaga lub fibroblasta. Celem uniknięcia błędów interpretacyjnych związanych z oceną reakcji IHC przy wykorzystaniu brązowego chromogenu w kontekście oceny ekspresji białek GOLPH2 oraz GOLPH3 w makrofagach towarzyszących guzowi (które mogą być zawierać melaninę i imitować pozytywną reakcję), przeprowadzono kontrolne reakcje IHC w aparacie Autostainer Link używając odczynników detekcyjnych EnVision™ G/2 System/AP Rabbit/Mouse/Permanent Red (nr K 5355, DAKO), których chromogen miał barwę czerwoną.

Analiza wykazała, że wzrost immunoreaktywności GOLPH2 i GOLPH3 w komórkach czerniaka był istotnie skorelowany ze wzrostem grubości nacieku wg skal Breslowa i Clarka, z obecnością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych, zwiększonym ryzykiem wznowy miejscowej, obecnością limfangioinwazji, owrzodzeniem guza pierwotnego oraz

wysokim wskaźnikiem mitotycznym. Co więcej, wzrost ekspresji GOLPH3 w komórkach czerniaka był istotnie związany ze spadkiem intensywności TILs.

Z kolei wzrost ilości GOLPH2- oraz GOLPH3-dodatnich makrofagów ściśle korelował z cieńszym guzem pierwotnym, brakiem owrzodzenia, silnym limfocytarnym naciekiem zapalnym, brakiem limfangioinwazji oraz obniżonym ryzykiem wznowy lokoregionalnej. Dodatkowo, podwyższona ilość GOLPH3-dodatnich makrofagów była znamienne związane z niskim potencjałem proliferacyjnym guza pierwotnego. Co więcej, u pacjentów z podwyższoną ilością makrofagów wykazujących ekspresję GOLPH2 nie wykazano obecności przerzutów odległych.

Analiza immunoreaktywności GOLPH3 w fibroblastach towarzyszących guzowi wykazała, że wzrost ilości GOLPH3-dodatnich fibroblastów ściśle korelował z cieńszym guzem pierwotnym, brakiem owrzodzenia, niskim wskaźnikiem mitotycznym oraz brakiem limfangioinwazji. Co więcej, podwyższona ilość GOLPH3-dodatnich makrofagów była ściśle związana z brakiem przerzutów węzłowych i odległych.

Analiza krzywych Kaplana-Meiera wykazała znaczący niekorzystny wpływ na rokowanie podwyższonej ekspresji GOLPH2 i GOLPH3 w kontekście istotnie skróconego czasu przeżycia wolnego od nawrotu (DFS) i krótszego czasu przeżycia specyficznego dla choroby nowotworowej (CSOS). Z kolei, wzrost immunoreaktywności analizowanych białek w TAMs wiązał się z istotnie wydłużonym DFS i CSOS. Podobne zależności zaobserwowano dla ekspresji GOLPH3 w fibroblastach towarzyszących guzowi.

Konkludując, wyniki powyższego badania wskazują na istotną rolę białek strukturalnych aparatu Golgiego (GOLPH2 i GOLPH3) w progresji czerniaka skóry. Należy podkreślić fakt, że powyższy artykuł jest pierwszym raportem w piśmiennictwie opisującym szczegółowo wzorce ekspresji GOLPH2 i GOLPH3 w nowotworowych melanocytach i komórkach podścieliskowych z określeniem ich korelacji z detalicznym raportem kliniczno-patologicznym.

Ad.5. Publikacja pt. „*Nucleoli cytomorphology in cutaneous melanoma cells - a new prognostic approach to an old concept*” dotyczy analizy znaczenia prognostycznego wybranych parametrów cytomorfologii jąderek (obecność, wielkość, liczba w pojedynczej komórce) u pacjentów z czerniakiem skóry.

Jąderko jest ultrastrukturalnym elementem jądra komórkowego, które w barwieniu H&E (hematoksylina i eozyna) jest widoczne jako okrągły/owalny fragment, silnie eozynochłonny z uwagi na wysoką zawartość białek. Zmiany cytomorfologii jąderek (pojawienie się ich w komórkach oraz ocena wielkości) stanowią jedną z ważniejszych histopatologicznych cech nowotworów złośliwych, obok nieprawidłowych figur podziału, pogrubiałej i nieregularnej błony jądrowej oraz grudkowej struktury chromatyny.

Celem powyższej pracy był szczegółowy opis cytomorfologii jąderek w 96 preparatach barwionych H&E pochodzących z guzów pierwotnych oraz korelacja tych parametrów ze

szczegółowym raportem kliniczno-histopatologicznym. Dodatkowo, przeprowadzono analizę korelacji obecności, wielkości i liczby jąderek z parametrami immunoreaktywności wybranych białek zaangażowanych w liczne procesy wewnątrzkomórkowe, m.in. w regulację przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (białka SPARC, N-cadherin), adhezję i mobilność komórkową (ALCAM, ADAM-10), regulację podziałów komórkowych (PLK1) i przeżycia komórek nowotworowych (FOXP1) oraz funkcjonowanie aparatu Golgiego (GOLPH3, GP73)

Zostały wprowadzone trzy cytomorfologiczne parametry charakteryzujące jąderka. Obecność jąderek odnosi się do globalnej/zbiorczej oceny obecności jąderek w jądrach komórek czerniaka z zastosowaniem poniższego algorytmu grupującego: 0: brak jąderek w komórkach czerniaka, 1: niewielka ilość komórek z obecnością jąderek ($\leq 20\%$ komórek czerniaka w ocenianym pojedynczym preparacie guza pierwotnego barwionym H&E), 2: wysoki odsetek komórek wykazuje obecność jąderek ($>20\%$ komórek czerniaka w ocenianym pojedynczym preparacie guza pierwotnego barwionym H&E). Rozmiar jąderka odnosi się do wielkości obserwowanych jąderek (0: brak jąderek w jądrach komórek czerniaka, 1: obecne mikrojąderka (*inconspicuous nucleoli*), 2: obecne makrojąderka (*prominent nucleoli*). Liczba jąderek w jądrach komórek czerniaka była oceniona wg poniższego algorytmu: 0: brak jąderek w jądrach komórek czerniaka, 1: pojedyncze mikro- lub makrojąderko w jądrze, 2: dwa lub więcej jąderek przypadających na jedno jądro komórki czerniaka.

Wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy wysokim odsetkiem komórek czerniaka z obecnością zauważalnych i/lub wyraźnych jąderek a większym zaawansowaniem guza pierwotnego (pT). Co więcej, także wielkość samych jąderek (obecność makrojąderek) korelowała z bardziej zaawansowanym procesem nowotworowym. Nie zaobserwowano żadnych innych znaczących zależności pomiędzy parametrami cytomorfologicznymi jąderek a pozostałymi cechami klinicznymi, m.in. statusem regionalnych węzłów chłonnych czy obecnością przerzutów odległych. Analiza korelacji parametrów jąderek ze szczegółowymi parametrami histopatologicznymi wykazała, że wysoki odsetek komórek czerniaka z widocznymi jąderkami i obecność makrojąderek są ściśle związane ze wzrostem grubości guza pierwotnego wg skal Breslowa i Clarka oraz wysokim wskaźnikiem mitotycznym. Wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy wysokim odsetkiem komórek czerniaka z obecnością zauważalnych i/lub wyraźnych jąderek a typem guzkowym czerniaka. Wszystkie trzy parametry morfologii jąderek były istotnie statystycznie związane z obecnością owrzodzenia guza pierwotnego. Co ciekawe, mikrosatelitoza była znamienne skorelowana z obecnością makrojąderek w komórkach czerniaka. Z kolei brak limfocytarnego nacieku zapalnego był związany z wysokim odsetkiem komórek czerniaka z wyraźnymi jąderkami.

Dodatkowo, przeprowadzona analiza korelacji z parametrami ekspresji wcześniej ocenianych białek wykazała istotną statystycznie korelację pomiędzy obecnością makrojąderek i zwiększoną liczbą jąderek w jądrze komórkowym a obniżoną immunoreaktywnością GOLPH3 w makrofagach towarzyszących guzowi. Nie wykazano innych znamienych statystycznie zależności pomiędzy parametrami cytomorfologii jąderek a ekspresją innych badanych białek zaangażowanych w regulację przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego

(SPARC, N-cadherin), adhezję i mobilność komórkową (ALCAM, ADAM-10), regulację podziałów komórkowych (PLK1) oraz przeżycia komórek nowotworowych (FOXP1).

Analiza krzywych Kaplana-Meiera wykazała, że wysoki odsetek komórek z jąderkami oraz zwiększona liczba jąderek w jądrach (ale nie ich wielkość) były ściśle skorelowane z wyraźnie krótszym czasem przeżycia specyficznym dla choroby nowotworowej oraz czasem wolnym od nawrotu.

Reasumując, czerniaki skóry, w których stwierdza się wysoki odsetek komórek nowotworowych z wyraźnymi jąderkami (makrojąderkami) oraz ze zwiększoną liczbą jąderek w jądrze komórkowym charakteryzują się bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym.

Ad.6. W publikacji pt. *„Upregulation of FOXP1 is a new independent unfavorable prognosticator and a specific predictor of lymphatic dissemination in cutaneous melanoma patients”* badane były rola i znaczenie prognostyczne ekspresji białka FOXP1 w komórkach czerniaka i podścielisku guza wraz ze szczegółowym opisaniem wzorców immunoreaktywności.

FOXP1 jest plejotropowym białkiem odgrywającym istotną rolę w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej (różnicowanie i dojrzewanie limfocytów B oraz monocytów), rozwoju narządów wewnętrznych (m.in.: zastawki serca, płuca, przełyk) oraz włókien nerwowych. Dodatkowo, oprócz pełnienia funkcji regulatorowych w rozwoju prawidłowych tkanek człowieka, jest także zaangażowany w proces karcinogenezy. Należy jednak podkreślić fakt, że rola i znaczenie białka FOXP1 w nowotworach człowieka jest nie do końca wyjaśnione, a wyniki dotychczasowych badań są niejednoznaczne. Poniższa praca jest pierwszym doniesieniem dotyczącym analizy ekspresji FOXP1 w czerniaku skóry ze szczegółową analizą korelacji z raportem kliniczno-patologicznym oraz przeżyciem pacjentów.

Immunoreaktywność FOXP1 była oceniana w 96 przypadkach czerniaka skóry w komórkach nowotworowych (TCs, *tumor cells*) oraz komórkach podścieliska guza pierwotnego (SCs, *stromal cells*).

Nadekspresja FOXP1 w komórkach czerniaka była ściśle skorelowana z obecnością przerzutów w węzle wartowniczym oraz regionalnych węzłach chłonnych. Co ciekawe, wzrost immunoreaktywności FOXP1 w podścielisku guza pierwotnego wiązał się mniejszą grubością nacieku, brakiem owrzodzenia oraz ujemnym statusem regionalnych węzłów chłonnych. Analiza przeżycia Kaplana-Meiera potwierdziła niekorzystny wpływ nadekspresji FOXP1 na prognozę długoterminową u pacjentów z czerniakiem skóry. Co więcej, analiza wielozmienna wykazała niezależny wpływ na rokowanie zwiększonej immunoreaktywności FOXP1 w komórkach czerniaka.

Powyższe obserwacje wskazują na istotną rolę białka FOXP1 w progresji czerniaka skóry i wskazują na jego ważną rolę w procesie przerzutowania drogą naczyń chłonnych. Powyższa hipoteza wymaga dalszych badań, które miałyby na celu wyjaśnienie mechanizmów

molekularnych, które regulują wewnątrzkomórkowe, FOXP1-zależne szlaki melanomagenety.

Ad.7. W ostatniej publikacji stanowiącej cykl habilitacyjny pt. „*Nuclear pseudoinclusions in melanoma cells: prognostic fact or artifact? The possible role of Golgi phosphoprotein 3 overexpression in nuclear pseudoinclusions generation*” badane i opisywane było znaczenie prognostyczne obecności psuedoinkluzji wewnątrzjądrowych (NPIs, *nuclear pseudoinclusions*) w komórkach czerniaka. Przeprowadzono także analizę korelacji ich obecności z parametrami immunoreaktywności wybranych białek zaangażowanych w liczne procesy wewnątrzkomórkowe, m.in. w regulację przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (białka SPARC, N-cadherin), adhezję i mobilność komórkową (ALCAM, ADAM-10), regulację podziałów komórkowych (PLK1) i przeżycia komórek nowotworowych (FOXP1) oraz funkcjonowanie aparatu Golgiego (GOLPH3, GP73).

Pseudoinkluzje wewnątrzjądrowe (NPIs) nazywane także wodniczkami wewnątrzjądrowymi są istotnymi parametrami cytomorfologicznymi wykorzystywanymi w codziennej praktyce histopatologicznej w diagnostyce m.in.: raka brodawkowego tarczycy oraz oponiaków. NPIs są inwaginacjami/wpukleniami cytoplazmy do jądra komórkowego. Kluczowym elementem różnicującym NPIs od prawdziwych inkluzji wewnątrzjądrowych jest brak bezpośredniego kontaktu z nukleoplazmą. Prawdziwe inkluzje wewnątrzjądrowe stanowiące agregaty m.in. elementów strukturalnych wirusów lub substancji cytoplazmatycznych (glikogen, immunoglobuliny, surfaktant, itp.) nie są otoczone przez błonę jądrową.

Pseudoinkluzje wewnątrzjądrowe zdefiniowano jako struktury o charakterze wewnątrzjądrowych wodniczek zawierające treść o barwliwości i morfologicznej strukturze zbliżonej do otaczającej je cytoplazmy lub jaśniejszej. Szacowana objętość pojedynczej NPI przypadającej na jedną komórkę powinna wynosić minimum 30% całkowitej objętości komórki czerniaka. Przypadek został uznawany za dodatni (obecność NPIs) jeśli zostało stwierdzonych minimum 5 komórek z wyżej opisanymi inkluzjami wewnątrzjądrowymi w 5 randomizowanych dużych polach widzenia (400×).

Obecność NPIs była ściśle skorelowana z wysokim wskaźnikiem mitotycznym oraz owrzodzeniem guza pierwotnego. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy obecnością NPIs a takimi parametrami histopatologicznymi jak: grubość nacieku wg Breslowa i Clarka, typ histopatologiczny, obecność i gradacja TILs, limfangioinwazja, regresja oraz mikrosatelitoza. Nie wykazano żadnej istotnej zależności pomiędzy obecnością NPIs a takimi parametrami klinicznymi jak: wiek w momencie diagnozy, płeć, lokalizacja guza pierwotnego, pT, status regionalnych węzłów chłonnych, obecność przerzutów odległych, status węzła wartowniczego oraz ewentualna wznowa miejscowa. Analiza krzywych Kaplana-Meiera wykazała, że obecność NPIs w komórkach czerniaka była istotnie skorelowana z krótszym czasem specyficznym dla choroby nowotworowej. Nie wykazano istotnego wpływu obecności NPIs na czas wolny od nawrotu. Co ciekawe, wykazano znamiennej statycznie zależność pomiędzy obecnością NPIs a wysoką ekspresją białka GOLPH3 w komórkach czerniaka. Co więcej, spadek immunoreaktywności GOLPH3

makrofagach towarzyszących guzowi był także istotnie związany z obecnością NPIs w komórkach czerniaka. Nie wykazano istotnych zależności pomiędzy NPIs a ekspresją białek związanych z regulacją EMT (SPARC, N-cadherin), adhezji i mobilności komórkowej (ALCAM, ADAM-10), regulacji podziałów mitotycznych (PLK1) oraz przeżycia komórek nowotworowych (FOXP1).

Patogeneza powstawania NPIs jest wciąż nie do końca poznana, jednakże zostało zaproponowanych kilka hipotez tłumaczących ich generowanie. Jedna z nich zakłada, że niekontrolowany wzrost syntezy białek w komórkach nowotworowych skutkuje zwiększeniem ilości cytoplazmy, która wywiera czysto fizycznie duży nacisk na jądro komórkowe prowadząc najpierw do inwaginacji/wpukleń cytoplazmy w obręb jądra komórkowego, a w dalszych konsekwencjach prowadząc do powstania NPIs. W opinii autorów jest to jeden z najbardziej prawdopodobnych mechanizmów etiopatologicznych, bowiem traktuje NPIs jako swoisty wykładnik niezwykle aktywnych, dynamicznych cytoplazmatycznych procesów translacyjnych zachodzących w cytoplazmie nowotworowych melanocytów.

Konkludując, wykazano że obecność NPIs w komórkach czerniaka jest związana niekorzystnym rokowaniem u pacjentów z czerniakiem skóry w kontekście skróconego czasu specyficznego dla choroby nowotworowej. Czerniaki skóry z obecnością NPIs cechują się wysokim wskaźnikiem mitotycznym oraz obecnością owrzodzenia. Powyższe obserwacje wskazują, że NPIs jako parametr morfologiczny oceniany w standardowym preparacie H&E podczas rutynowej diagnostyki histopatologicznej może być dodatkowym czynnikiem, który w większym niż dotychczasowym stopniu sprecyzuje potencjalne rokowanie pacjentów z czerniakiem skóry.

Wnioski końcowe i potencjalne praktyczne wykorzystanie wyników badań

Precyzyjne określenie prognozy długoterminowej u pacjentów z czerniakiem skóry stanowi kluczowy element procesu diagnostyczno-terapeutycznego. Najbardziej newralgicznym z klinicznego punktu widzenia jest moment diagnozy histopatologicznej, ponieważ to parametry histomorfologiczne i immunopatologiczne guza pierwotnego, obok badania klinicznego pacjenta mogą zaklasyfikować pacjenta do odpowiedniej grupy rokowniczej. Wyodrębnienie pacjentów o potencjalnie gorszym rokowaniu ma najistotniejsze znaczenie w obecnym czasie, ponieważ pozwala zwiększyć ilość wizyt kontrolnych i znacznie wcześniej wykryć ewentualną wznowę lub ognisko przerzutowe i co się z tym wiąże, wdrożyć odpowiednie leczenie.

Powyższa rozprawa habilitacyjna jest próbą poszukiwania nowych histomorfologicznych i immunopatologicznych czynników prognostycznych, które pomogłyby onkologom w lepszej i bardziej precyzyjnej stratyfikacji prognostycznej pacjentów z czerniakiem skóry.

Wnioski

1. Ocena limfangioinwazji powinna być zawarta w każdym raporcie histopatologicznym, który dotyczy rozpoznania czerniaka, ponieważ może stanowić istotne, dodatkowe źródło dotyczące rokowania u pacjentów z czerniakiem. Co więcej, obecność LYI w guzie pierwotnym u pacjenta bez klinicznych wykładników zajęcia węzłów chłonnych może być swoistym markerem „niemych” klinicznie ognisk przerzutowych.
2. Ocena odsetka limfocytów CD8⁺ oraz ich przestrzennej dystrybucji w obrębie guza pierwotnego może być pomocna w stratyfikacji prognostycznej pacjentów z czerniakiem – wysoki odsetek limfocytów CD8⁺ w rozlanej dystrybucji przestrzennej stanowi istotny czynnik korzystnej prognozy u pacjentów z czerniakiem skóry.
3. Model prognostyczny BILL^{CD8} stanowiący konkluzję badań nad znaczeniem prognostycznym podstawowych parametrów histopatologicznych połączonych z oceną odsetka limfocytów CD8⁺ może posłużyć z wysoką skutecznością do precyzyjnej stratyfikacji prognostycznej pacjentów, a co za tym idzie, może pozwolić zintensyfikować częstość wizyt kontrolnych i szybciej rozpoznać potencjalną wznowę lub rozsiew i zastosować właściwe leczenie. Powyższy model prognostyczny nie jest kosztochłonny i pracochłonny, i co ważne, nie wymaga użycia dodatkowych metod biologii molekularnej, co umożliwia jego implementację do rutynowego postępowania w każdym ośrodku zajmującym się leczeniem czerniaka i podkreśla jego potencjalną, dużą użyteczność kliniczną.
4. Ocena ekspresji GOLPH2 i GOLPH3 w materiale tkankowym pochodzącym z resekcji guza pierwotnego jest parametrem prognostycznym o podwójnej roli, ponieważ wysoka immunoreaktywność powyższych białek w nowotworowych melanocytach jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym informującym klinicystę o wysokim prawdopodobieństwie zgonu nowotworowego z powodu czerniaka, z kolei wzrost ekspresji w komórkach podścieliskowych wiąże się z istotnie lepszym rokowaniem – stosunkowo niski koszt powyższych oznaczeń może dawać lepszy, bardziej precyzyjny wgląd w biologię danego czerniaka.
5. Czerniaki skóry, w których stwierdza się wysoki odsetek komórek nowotworowych z wyraźnymi jąderkami (makrojąderkami) oraz ze zwiększoną liczbą jąderek w jądrze komórkowym charakteryzują się bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym.
6. Zwiększona ekspresja białka FOXP1 odgrywa istotną rolę w progresji czerniaka skóry i wskazuje na jego ważną rolę w procesie przerzutowania drogą naczyń chłonnych.
7. Obecność NPIs w komórkach czerniaka jest związana niekorzystnym rokowaniem u pacjentów z czerniakiem skóry w kontekście skróconego czasu specyficznego dla choroby nowotworowej. NPIs jako parametr morfologiczny, który może być oceniony w standardowym preparacie H&E podczas rutynowej diagnostyki histopatologicznej może być dodatkowym czynnikiem, który w większym niż dotychczasowym stopniu sprecyzuje potencjalne rokowanie pacjentów z czerniakiem skóry.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)

Analiza bibliometryczna dorobku

Mój całkowity dorobek naukowy stanowią 42 publikacje pełnotekstowe (32 oryginalne pełnotekstowe prace naukowe w czasopismach z „impact factor”, 1 oryginalna pełnotekstowa praca naukowa w czasopiśmie bez „impact factor”, 2 opisy przypadków w czasopismach z „impact factor” oraz 7 prac poglądowych w czasopismach z „impact factor”) oraz 39 streszczeń ze zjazdów międzynarodowych i 18 streszczeń ze zjazdów krajowych.

Sumaryczna punktacja za prace oryginalne, opisy przypadków oraz publikacje poglądowe wynosi: **IF = 73,076 oraz KBN/MNiSW = 875 pkt.**

Aktualna liczba cytowań moich prac (bez autocytowań) wynosi 229, **indeks Hirscha 9** (wg *Web of Science Core Collection*, z dnia 19.04.2018).

Punktacja cyklu przedłożona jako rozprawa habilitacyjna obejmuje 7 publikacji oryginalnych (**IF = 14,36, KBN/MNiSW = 165 pkt.**).

Po wyłączeniu publikacji wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego, mój dorobek naukowy obejmuje 35 publikacji pełnotekstowych (25 oryginalnych pełnotekstowych prac naukowych w czasopismach z „impact factor”, 1 oryginalna pełnotekstowa praca naukowa w czasopiśmie bez „impact factor”, 2 opisy przypadków w czasopismach z „impact factor” oraz 7 prac poglądowych w czasopismach z „impact factor”) o łącznej punktacji: **IF = 58,716 oraz KBN/MNiSW = 710 pkt.**

Jestem pierwszym autorem w 16 publikacjach, drugim autorem w 11 publikacjach, a ostatnim autorem w 3 publikacjach.

Omówienie głównych kierunków badań niezwiązanych z tematyką cyklu habilitacyjnego

Moje główne tematy badań poza tematyką cyklu habilitacyjnego ogniskują się na zagadnieniach wymienionych poniżej:

1. Rak wewnątrzprzewodowy (DCIS, *ductal carcinoma in situ*) oraz wczesny rak piersi – analiza nowych immunohistochemicznych czynników prognostycznych i predykcyjnych.
2. Rola remodelingu macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, *extracellular matrix*) oraz znaczenie prognostyczne limfangiogenezy w pacjentów z wczesnym i zaawansowanym rakiem żołądka.
3. Poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku jajnika i pierwotnym raku jajowodu.
4. Neoangiogeneza stymulowana niskoenergetycznym światłem laserowym u pacjentów po ekstrakcji zębów ze wskazań stomatologicznych zakażonych wirusem HIV.

5. Patologia transplantacyjna: nowe histopatologiczne i immunohistochemiczne parametry dysfunkcji nerki przeszczepionej w oparciu o materiał tkankowy pochodzący z biopsji nerek przeszczepionych.
6. Heterogenność manifestacji klinicznych i rola kliniczno-histopatologicznych algorytmów w prawidłowej diagnostyce chorób IgG4-zależnych.
7. Nowe czynniki histopatologiczne i immunohistochemiczne w czerniaku gałki ocznej.

Ad.1) Ważnym kierunkiem moich dotychczasowych aktywności naukowych było poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych we wczesnym raku piersi oraz poszukiwania markerów potencjalnej inwazyjności u pacjentek z rakiem wewnątrzprzewodowym (DCIS, *ductal carcinoma in situ*).

Opisaliśmy nowy czynnik niekorzystnej prognozy u pacjentek z wczesnym rakiem piersi bez przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych, a więc *a priori* cechujących się korzystnym rokowaniem. Tym obiecującym markerem okazał się być enzym PARP-1 (polimeraza poly(ADP-rybozy) 1), który jest białkiem odgrywającym kluczową rolę w naprawie jednoniciowych uszkodzeń DNA poprzez mechanizm wycięcia zasad. Co więcej, stanowi ono niezwykle obiecujący punkt uchwytu terapii ukierunkowanej molekularnie z wykorzystaniem inhibitorów PARP-1. Badania wykazały, że nadekspresja PARP-1 w lokalizacji jądrocytoplazmatycznej w komórkach raka piersi u pacjentek z wczesnym rakiem piersi bez przerzutów w węzłach chłonnych ściśle koreluje z istotnie skróconym czasem przeżycia specyficznego dla choroby nowotworowej (CSOS) (**Donizy P, Pietrzyk G, Halon A, Kozyra C, Gansukh T, Lage H, Surowiak P, Matkowski R. Nuclear-cytoplasmic PARP-1 expression as an unfavorable prognostic marker in lymph node-negative early breast cancer: 15-year follow-up.** *Oncol. Rep.* 2014, 31(4):1777-1787). Przeprowadzona została także immunocytochemiczna analiza ekspresji PARP-1 w 3 modelach komórkowych opartych o chemiooporne linie komórkowe raka piersi, raka żołądka i raka trzustki. Wykazano, że chemiooporne linie komórkowe odznaczały się zwiększoną ekspresją PARP-1 w jądrze komórkowym, przy istotnie zmniejszonej immunoreaktywności cytoplazmatycznej. Warty podkreślenia jest praktyczny wymiar powyższych badań, bowiem stwierdzono, że 66% wczesnych raków piersi charakteryzuje się nadekspresją białka PARP-1, a co za tym idzie może być zakwalifikowana do ewentualnej terapii inhibitorami PARP-1. Jest to pierwszy w piśmiennictwie głos w dyskusji nad nowym kryterium doboru pacjentek do terapii anty-PARP-1 z wykorzystaniem odczynu immunohistochemicznego, a nie jak do tej pory, analizą mutacji genów BRCA1 i 2. W kolejnej pracy wykazaliśmy istotne korelacje pomiędzy zwiększoną ekspresją jądrocytoplazmatyczną PARP-1 w komórkach raka piersi a cytomorfologicznymi wykładnikami specyficznego śmiertelnego parthanatos, co stanowiło pierwszą na świecie pracę bazującą na materiale klinicznym, która potwierdzała rezultaty badań *in vitro*, traktujące o ważnej roli PARP-1 w indukcji parthanatos (**Donizy P, Halon A, Surowiak P, Pietrzyk G, Kozyra C, Matkowski R. Correlation between PARP-1 immunoreactivity and cytomorphological features of parthanatos, a specific cellular death in breast cancer cells.** *Eur. J. Histochem.* 2013, 57:e35). Dalsze badania wykazały ścisły

związek pomiędzy nadekspresją białek rodziny ERM (*ezrin/radixin/moesin*) i Rho (RhoA, RhoB i Cdc42) i obecnością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych u pacjentek z wczesnym rakiem gruczołu piersiowego (Hałoń A, **Donizy P**, Surowiak P, Matkowski R. ***ERM/Rho protein expression in ductal breast cancer***. Cell. Oncol. (Dordr) 2013, 36(3):181-190). Dalsze poszukiwania nowych markerów prognostycznych ujawniły, że kinaza podobna 1 (polo-like kinase 1, PLK1) może funkcjonować jako niezależny czynnik niekorzystnej prognozy u pacjentek z rakiem piersi, ściśle korelując z istotnie krótszym czasem przeżycia specyficznym dla choroby nowotworowej (CSOS) (**Donizy P**, Hałoń A, Surowiak P, Kaczorowski M, Kozyra C, Matkowski R. ***Augmented expression of polo-like kinase 1 (PLK1) is a strong predictor of shorter cancer-specific overall survival in early stage breast cancer – 15-year follow-up***. Oncol Lett 2016, 12(3):1667-1674).

W pracach dotyczących poszukiwania nowych czynników inwazyjności w obrębie DCIS w materiale pochodzącym z biopsji stereotaktycznych gruczołu piersiowego wykazano, że wysoka ekspresja białka SPARC w komórkach luminalnych, mioepitelialnych oraz fibroblastach podścieliska jest znamienne skorelowana z obecnością ognisk raka inwazyjnego w materiale pooperacyjnym (Szynglarewicz B, Kasprzak P, **Donizy P**, Biecek P, Hałoń A, Matkowski R. ***Ductal carcinoma in situ on stereotactic biopsy of suspicious breast microcalcifications: expression of SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) can predict postoperative invasion***. J.Surg.Oncol. 2016 Vol.114 no.5; s.548-556). Analiza immunoreaktywności białka Snail1 również wykazała, że jego wzmożona ekspresja w obrębie komórek luminalnych DCIS jest znamienne skorelowana z obecnością ognisk raka inwazyjnego w obrębie materiału pooperacyjnego (Szynglarewicz B, Kasprzak P, **Donizy P**, Biecek P, Hałoń A, Matkowski R. ***Epithelial-mesenchymal transition inducer Snail1 and invasive potential of intraductal breast cancer***. J.Surg.Oncol. 2017 Vol.116 no.6; s.696-705).

Ad.2) Drugim ważnym aspektem moich badań nad karcinogenezą była próba określenia znaczenia prognostycznego remodelingu macierzy pozakomórkowej w kontekście analizy ekspresji wybranych metaloproteinaz (MMP-2 i 9) oraz ich inhibitorów (TIMP-1 i 2) a także czynników proangiogennych (VEGF-C i D oraz VEGFR3) u pacjentów z rakiem żołądka. Wykazano, że niska immunoreaktywność MMP-2 w komórkach raka żołądka i w fibroblastach towarzyszących guzowi jest ściśle związana z niekorzystnym rokowaniem w obserwacji długoterminowej. Jest to jedna pierwszych prac naukowych, która wskazuje na plejotropowe i nie do końca poznane mechanizmy działania złożonej sieci metaloproteinaz, które funkcjonowały do tej pory jako markery złej prognozy, a jak się okazało w przypadku raka żołądka wysoki poziom ekspresji MMP-2 wiązał się z bardziej korzystnym klinicznym przebiegiem (**Donizy P**, Rudno-Rudzińska J, Kaczorowski M, Kabarowski J, Frejlich E, Kielan W, Matkowski R, Hałoń A. ***Disrupted balance of MMPs/TIMPs in gastric carcinogenesis-paradoxical low MMP-2 expression in tumor and stromal compartments as a potential marker of unfavorable outcome***. Cancer Invest. 2015, 33(7):286-293). Drugi kierunek badań nad biologią raka żołądka obejmował zagadnienia limfangiogenezy i prognostycznego znaczenia gęstości naczyń limfatycznych około- i wewnątrzguzowych (m.in.: **Donizy P**, Rudno-Rudzinska J, Halon A, Dziegala M, Kabarowski J, Frejlich E,

Dziegiel P, Kielan W, Matkowski R. *Intratumoral but not peritumoral lymphatic vessel density measured by D2-40 expression predicts poor outcome in gastric cancer – ROC curve analysis to find cut-off point*. Anticancer Res. 2014, 34(6):3113-3118; Rudno-Rudzinska J, **Donizy P**, Frejlich E, Kotulski K, Dziegiel P, Halon A, Kielan W. *Lymphangiogenesis in early and advanced gastric cancer: is there any difference?* J. Gastroenterol. Hepatol. 2014, 29(4):107-111).

Ad.3.) Ważnym etapem w moim rozwoju naukowym był aktywny udział w wielośrodkowych badaniach (Uniwersytet Charité w Berlinie, Uniwersytet Semmelweisa w Budapeszcie, Centrum Badań Medycznych w Ulan Bator, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu) nad nowotworami żeńskiego narządu rodowego – rakiem jajnika i pierwotnym rakiem jajowodu w kontekście poszukiwania nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych oraz badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych raka jajnika nad mechanizmami oporności wielolekowej, która stanowi kluczowy problem w onkologii ginekologicznej. Najważniejsza publikacja, która ukazała się w tym obszarze badań dotyczy analizy immunoreaktywności TIMP-2 (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2*) w materiale tkankowym pochodzącym od 43 pacjentek z rakiem jajnika w różnym stopniu zaawansowania wg FIGO oraz ewaluację jego ekspresji metodą immunocytochemiczną z wykorzystaniem 6 linii komórkowych raka jajnika połączoną z oceną wrażliwości na cisplatynę, paklitaxel i topotekan, które stanowią podstawowe armamentarium chemioterapeutyczne (Haloń A, Nowak-Markwitz E, **Donizy P**, Matkowski R, Maciejczyk A, Gansukh T, Gyorffy B, Spaczyński M, Zabel M, Lage H, Surowiak P. *Enhanced immunoreactivity of TIMP-2 in the stromal compartment of tumor as a marker of favorable prognosis in ovarian cancer patients*. J. Histochem. Cytochem. 2012, 60(7):491-501). Dwie kolejne publikacje, których jestem współautorem dotyczyły znaczenia ekspresji dwóch podtypów molekularnych receptora estrogenowego (ER *alpha* i ER *beta*) w preparatach raka jajnika oraz ocenę ich ekspresji metodą immunocytochemiczną z wykorzystaniem 11 linii komórkowych raka jajnika połączoną z oceną wrażliwości na cisplatynę (Haloń A, Materna V, Drąg-Zalesińska M, Nowak-Markwitz E, Gansukh T, **Donizy P**, Spaczyński M, Zabel M, Dietel M, Lage H, Surowiak P. *Estrogen receptor alpha expression in ovarian cancer predicts longer overall survival*. Pathol. Oncol. Res. 2011, 17:511-518; Haloń A, Nowak-Markwitz E, Maciejczyk A, Pudełko M, Gansukh T, Gyorffy B, **Donizy P**, Murawa D, Matkowski R, Spaczyński M, Lage H, Surowiak P. *Loss of estrogen receptor beta expression correlates with shorter overall survival and lack of clinical response to chemotherapy in ovarian cancer patients*. Anticancer Res. 2011, 31:711-718). Kolejnym elementem badań związanych z szeroko pojętą onkologią ginekologiczną była immunohistochemiczna eksploracja niezwykle rzadkiego nowotworu, jakim jest pierwotny rak jajowodu (PFTC, *primary fallopian tube cancer*). Chciałbym podkreślić fakt, że nasz zespół zgromadził jedną z największych baz tego nowotworu na świecie (70 przypadków z dokładną charakterystyką kliniczną). W tym projekcie badawczym zajmowałem się prognostycznym znaczeniem ekspresji i subkomórkowej dystrybucji białka MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) w komórkach raka jajowodu. Wykazano, że immunoreaktywność MRP2 w błonie jądrowej jest ściśle skorelowana z niekorzystną

prognozą, odróżnicowaniem komórek nowotworowych oraz opornością na cisplatynę (Hałoń A, Materna V, **Donizy P**, Matkowski R, Rabczyński J, Lage H, Surowiak P. *MRP2 (ABCC2, cMOAT) expression in nuclear envelope of primary fallopian tube cancer cells is a new unfavorable prognostic factor*. Arch. Gynecol. Obstet. 2013, 287(3):563-570).

Ad.4.) Kolejnym elementem mojej dotychczasowej pracy naukowo-klinicznej było przeprowadzenie badań nad neoangiogenezą stymulowaną niskoenergetycznym światłem laserowym u pacjentów zakażonych wirusem HIV po ekstrakcji zębów ze wskazań stomatologicznych. Wykazaliśmy we współpracy z zespołem stomatologów, że zastosowanie niskoenergetycznej terapii laserowej po usunięciu zęba u pacjentów HIV-dodatnich znacznie skraca proces gojenia rany poekstrakcyjnej poprzez wzrost liczby nowych naczyń krwionośnych (wyznakowanych immunohistochemicznie przeciwciałem anti-CD34) w porównaniu z ranami bez zastosowania terapii laserowej (Halon A, **Donizy P**, Dziegala M, Dobrakowski R, Simon K. *Tissue laser biostimulation promotes post-extraction neoangiogenesis in HIV-infected patients*. Lasers Med. Sci. 2015, 30(2):701-706).

Ad.5.) W spektrum moich zainteresowań diagnostyczno-naukowych znajdują się także zagadnienia dotyczące nefropatologii transplantacyjnej. Przeszczepianie nerek jest uznaną metodą leczenia schyłkowej niewydolności nerek, która pozwala na wydłużenie przeżycia chorych oraz uzyskania jakości życia zbliżonej do tej występującej u osób zdrowych. Postęp jaki dokonał się na przestrzeni ostatnich lat w leczeniu immunosupresyjnym znacząco zmniejszył częstość epizodów ostrego odrzucania, ale wciąż obserwujemy niezadowalające rezultaty w kontekście czasu przeżycia przeszczepionego narządu. Transplantologia kliniczna zwraca coraz większą uwagę na obecność przeciwciał nie-HLA jako czynników, które mogą uszkadzać przeszczep. Powstawanie tych przeciwciał jest konsekwencją nadmiernej reaktywności limfocytów B w wyniku niedostatecznej ich supresji. Przeciwciała nie-HLA skierowane są przeciwko różnym determinantom antygenowym obecnym w obrębie śródbłonna naczyń krwionośnych, m.in.: przeciwko receptorowi typu I dla angiotensyny II (anty-AT1R) i przeciwko receptorowi A dla endoteliny 1 (anty-ETAR). Znaczenie tych przeciwciał zarówno w ostrym odrzucaniu jak i w przewlekłej dysfunkcji przeszczepu nie zostało dokładnie poznane. W naszych badaniach prowadzonych we współpracy z Katedrą i Kliniką Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (kierownik: Prof. Marian Klinger) została oznaczona metodą immunohistochemiczną ekspresja AT1R oraz ETAR w materiale tkankowym pochodzącym z biopsji nerki przeszczepionej ze wskazań nefrologicznych u 170 pacjentów. Wykazano, że wysoka immunoreaktywność AT1R w nabłonku cewek nerkowych jest znamienne skorelowana z utratą przeszczepu (Sas A, **Donizy P**, Kościelska Kasprzak K, Kamińska D, Mazanowska O, Krajewska M, Chudoba P, Korta K, Hałoń A, Klinger M, Banasik M. *The histopathological relevance of angiotensin II type 1 receptor (AT1-Receptor) in renal transplant biopsy*. Transplant Proc 2018, w druku). Z kolei ekspresja ETAR w śródbłonku małego i średniego kalibru naczyń tętniczych jest istotnie związana z ostrą martwicą cewek nerkowych (ATN, acute tubular necrosis) oraz odrzucaniem przeszczepu zależnym od przeciwciał (AMR, antibody-mediated rejection) (Nowańska K, **Donizy P**, Kościelska-Kasprzak K, Kamińska D, Krajewska M, Mazanowska O, Madziarska K, Zmonarski S, Chudoba P, Małkiewicz B,

Hałoń A, Klinger M, Banasik M. *Endothelin A (ETA) receptors expressed in renal blood vessels (small and intermediate arteries) of renal transplant patients are connected with acute tubular necrosis (ATN) or antibody mediated rejection (AMR)*. Transplant Proc 2018, w druku).

Ad.6.) Kolejnym aspektem mojej pracy jako patologa jest diagnostyka histopatologiczna chorób ze spektrum IgG4-zależnych, ze szczególnym uwzględnieniem ich heterogenności manifestacji klinicznych i roli kliniczno-histopatologicznych algorytmów w prawidłowej diagnostyce tej grupy chorób. Powyższa aktywność diagnostyczno-naukowa prowadzona jest dominująco z Katedrą i Kliniką Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (kierownik: Prof. Piotr Wiland). Choroby IgG4-zależne są rzadkimi przewlekłymi chorobami przebiegającymi z obecnością przewlekłego nacieku zapalnego złożonego dominująco z plazmocytów IgG4⁺ oraz masywnym włóknieniem zajętego narządu. Złotym standardem diagnostyki tej grupy chorób jest biopsja zajętego narządu i detaliczna ocena histopatologiczna (stwierdzenie charakterystycznego typu włóknienia, tzw. *storiform fibrosis*) wraz z wykonaniem odczynów immunohistochemicznych w kierunku plazmocytów oraz immunoglobulin IgG i IgG4 z określeniem ich globalnego odsetka. Z uwagi na niespecyficzne objawy kliniczne diagnostyka tej grupy chorób może być znacznie utrudniona, stąd wynika konieczność interdyscyplinarnego podejścia do diagnostyki chorób ze spektrum IgG4-zależnych. Współpraca z Katedrą i Kliniką Reumatologii i Chorób Wewnętrznych zaowocowała opisem 4 przypadków klinicznych wraz z pełnym raportem histopatologicznym, których byłem współautorem (Sebastian A, Sebastian M, Misterska-Skóra M, **Donizy P**, Hałoń A, Chlebicki A, Lipiński A, Wiland P. *The variety of clinical presentations in IgG4-related disease in Rheumatology*. Rheumatol.Int. 2018 Vol.38 no.2; s.303-309).

Ad.7.) Ostatni element moich badań dotyczy poszukiwania nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w czerniaku gałki ocznej. Powyższe badanie jest prowadzone we współpracy z Kliniką Okulistyki i Onkologii Okulistycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (kierownik: Prof. Bożena Romanowska-Dixon). Projekt ten jest na etapie tworzenia kliniczno-patologicznej bazy danych pacjentów. Planowane jest włączenie około 300 pacjentów leczonych enukleacją bez wcześniejszej jakiegokolwiek terapii. Wstępnym rezultatem naszej współpracy jest praca pogładowa dotycząca klinicznych, histopatologicznych oraz cytogenetycznych czynników prognostycznych w czerniaku gałki ocznej (Berus T, Hałoń A, Markiewicz A, Orłowska-Heitzman J, Romanowska-Dixon B, **Donizy P**. *Clinical, histopathological and cytogenetic prognosticators in uveal melanoma - a comprehensive review*. Anticancer Res. 2017 Vol.37 no.12; s.6541-6549).

Kierowanie i udział w projektach badawczych

- Nowe czynniki prognostyczne i predykcyjne w czerniaku złośliwym skóry; 2016-2018, grant własny UMW (ST.B130.16.049); pełniona funkcja: kierownik;
- Model prognostyczny i predykcyjny w raku gruczołu piersiowego w oparciu o nowe markery deregulacji podziałów mitotycznych i zaburzeń budowy wrzeciona kariokinetycznego (Borealin/Dasra B, BUBR1, PLK1, PARP-1) oraz białek strukturalno-funkcjonalnych aparatu Golgiego (GOLPH3, AKAP-9); 2013-2016; grant własny UMW (Pbmn157); pełniona funkcja: główny wykonawca;
- Wybrane markery przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej jako potencjalne czynniki prognostyczne i predykcyjne w czerniaku skóry; 2012-2015; grant własny UMW (Pbmn108); pełniona funkcja: wykonawca;
- Kliniczne, patologiczne i humoralne czynniki mające wpływ na wyniki i jakość leczenia onkologicznego; 2012-2015; grant własny UMW (ST-594); pełniona funkcja: wykonawca.

Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową

- Pierwsza nagroda (Best Poster Award) za najlepszą prezentację posteru pt. „*Clinical significance of gastric cancer immunoprofile related to angiogenesis (VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3) and enzymatic degradation of extracellular matrix (MMP-2,9/TIMP-1,2)*” podczas 10th International Gastric Cancer Congress, 19-22 June 2013, Verona (Italy);
- Pierwsza nagroda (Best Poster Award) za najlepszą prezentację posteru pt. „*High density of intratumoral lymphatic vessels measured by D2-40/podoplanin is associated with lymph node metastases and predicts poor outcome in gastric cancer patients*” podczas 10th International Gastric Cancer Congress, 19-22 June 2013, Verona (Italy);
- Stypendium im. Ludwika Hirszfelda przyznawane przez Prezydenta Wrocławia dla Najlepszego Doktoranta w dziedzinie nauk medycznych i biologicznych (2014);
- Stypendium Ministra Zdrowia za wybitne osiągnięcia naukowe (2015);
- Nagroda Indywidualna I stopnia JM Rektora UMW we Wrocławiu za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej (2017).

Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych

- **Piotr Donizy**, Agnieszka Hałoń, Julia Rudno-Rudzińska, Jędrzej Kabarowski, Wojciech Kielan, Rafał Matkowski. 2014. *The quest for a useful immunohistochemical profile associated with disrupted balance of MMPs/TIMPs and lymphangiogenic factors in gastric cancer prognosis - a Herculean task?* The Scientific Meeting of the Japan-Hungary-Poland Surgical Society "A triangle of collaboration for the development of advanced surgery - take off for the future". Tokio, Japonia.

- **Piotr Donizy**, Przemysław Biecek, Agnieszka Hałoń, Rafał Matkowski. 2015. *BILL^{CD8} - a multivariable survival model based on detailed histopathological parameters of primary tumors in cutaneous melanoma patients*. 20th World Congress on Advances in Oncology and 18th International Symposium on Molecular Medicine. Ateny, Grecja.
- **Piotr Donizy**, Przemysław Biecek, Agnieszka Hałoń, Rafał Matkowski. 2016. *Wieloczynnikowy model prognostyczny BILL^{CD8} jako proste i klinicznie użyteczne narzędzie do oceny rokowania u pacjentów z czerniakiem skóry*. XX Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Patologów "Patomorfologia - od makroskopii do genu". Warszawa, Polska.
- **Piotr Donizy**, Jakub Marczuk, Konrad Pagacz, Wojciech Fendler, Agnieszka Halon, Rafał Matkowski. 2017. *Up-regulation of FOXP1 in melanoma cells is a new unfavourable prognosticator and a specific predictor of lymphatic dissemination in cutaneous melanoma patients*. European Congress of Pathology "Pathology for patient care". Amsterdam, Holandia.

Współpraca międzynarodowa

Byłem uczestnikiem międzynarodowego projektu realizowanego przez Katedrę Histologii i Embriologii UMW (Prof. Paweł Surowiak) oraz Instytut Patologii Uniwersytetu Humboldta w Berlinie (Prof. Hermann Lage, Dr Verena Materna) i Uniwersytet Semmelweisa w Budapeszcie (Prof. Balázs Györffy), który dotyczył poszukiwania nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w wybranych nowotworach (rak piersi, rak jajnika, chłoniaki nieziarnicze, rak płuca, pierwotny rak jajowodu). Powyższa współpraca zaowocowała powstaniem 7 publikacji pełnotekstowych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej, w których jestem współautorem (w jednym artykule jestem pierwszym autorem).

Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Jestem współautorem 57 doniesień konferencyjnych (39 streszczeń ze zjazdów międzynarodowych oraz 18 ze zjazdów krajowych). Jestem pierwszym autorem w 16 doniesieniach, drugim autorem w 21 oraz ostatnim autorem w 2 doniesieniach zjazdowych.

Szczegółowy wykaz streszczeń zjazdowych potwierdzony przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu przedstawiono w osobnym załączniku.

Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

- Polskie Towarzystwo Patologów (PTP), 2012-do chwili obecnej;

- Europejskie Towarzystwo Patologów (ESP, *European Society of Pathology*), 2012-do chwili obecnej;
- Towarzystwo Badań nad Czerniakiem (SMR, *The Society for Melanoma Research*), 2015-do chwili obecnej.

Jestem także członkiem Polskiej Roboczej Grupy Hepatopatologicznej (SMURFy) ds. wdrażania standardów diagnostyki histopatologicznej oligobiopsji wątroby.

Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki

Aspekt popularyzacji nauki aktywnie realizuję poprzez kierowanie pracami Studenckiego Koła Naukowego Histopatologii. Pod moją opieką merytoryczną prace naukowe sześciu studentów Wydziału Lekarskiego UMW zdobywały czołowe miejsca podczas Studenckich Konferencji Naukowych:

- **I nagroda** podczas VIII International Students' Conference of Young Medical Researches, Wrocław 2018; stud. Jakub Marczuk, Justyna Kuźmińska, Karolina Roczek, *Prognostic relevance of microsatellitosis in cutaneous melanoma patients – a true metastatic tumor spread or an effect of inaccurate tumor sampling? A new insight into 8th edition of AJCC melanoma staging*;
- **I nagroda** podczas VII International Students' Conference of Young Medical Researches, Wrocław 2017; stud. Adrianna Wyderkowska i Jakub Marczuk, *Multifocal liver metastases in patient with recurrent intracranial meningioma – a tricky case or two different neoplasms?*;
- **III nagroda** podczas V International Students' Conference of Young Medical Researches, Wrocław 2015; stud. Maciej Pisarek, *Strong expression of vinculin in fibrous septa and sinusoidal compartment in opposition to enhanced fibronectin immunoreactivity limited to hepatocytes as a potential key events in pathogenesis of focal nodular hyperplasia*;
- **I nagroda** podczas IV International Students' Conference of Young Medical Researches, Wrocław 2014; stud. Maciej Kaczorowski, *Increased mitotic rate strongly correlates with unfavorable prognosis in early cutaneous melanoma – the new insight into AJCC staging in pT2 tumors*.

Zostałem ponadto zaproszony przez wydawnictwo Springer Nature do przygotowania rozdziału dotyczącego roli aparatu Golgiego w karcinogenezie w monografii pt. ***“The Golgi apparatus and centriole - functions, interactions and role in disease”***, której publikacja jest planowana na 2019 rok (redaktor naukowy: Prof. Małgorzata Kloc, Houston Methodist Hospital, Houston, USA).

Opieka naukowa nad studentami i lekarzami w toku specjalizacji

- Jestem opiekunem Indywidualnego Toku Studiów (ITS) studenta VI roku Wydziału Lekarskiego, Jakuba Marczyka z dziedziny histopatologii, który jest realizowany w

Katedrze oraz Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

- Jestem ponadto promotorem pracy magisterskiej studentki V roku Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, kierunek Analityka Medyczna, Jagody Rewus. Planowany termin obrony pracy magisterskiej pt. „Znaczenie prognostyczne ekspresji białka SIRT1 u pacjentów z czerniakiem skóry” to czerwiec 2018.
- Byłem także opiekunem tygodniowych praktyk wakacyjnych (lipiec 2017) trzech studentów z Bogomolets National Medical University (Kijów, Ukraina) w ramach wymiany studentów Wydziałów Lekarskich.

Działalność dydaktyczna

Szkolenie przeddyplomowe

Od początku mojej pracy w Katedrze oraz Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (01.10.2012, początek studiów doktoranckich) prowadzę zajęcia dydaktyczne (wykłady, ćwiczenia, seminaria oraz autopsje) dla studentów III roku Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego (przedmioty: Patomorfologia oraz Patologia Jamy Ustnej) oraz studentów II i III roku kierunku Analityka Medyczna (przedmioty: Patomorfologia, Cytologia Kliniczna oraz Techniki Histologiczne).

Jestem autorem ponad dwustu egzaminacyjnych pytań testowych z dziedziny patomorfologii dla Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego oraz Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej (kierunek: analityka medyczna).

Szkolenie podyplomowe

Jestem jednym z wykładowców na kursie „***Podyplomowa Szkoła Nefropatii***” organizowanym przez Katedrę i Klinikę Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (całoroczny kurs doskonalący z listy CMKP zalecany przez Konsultanta Krajowego dla lekarzy specjalizujących się w dziedzinie nefrologii), gdzie przedstawiam opisy trudnych przypadków diagnostyczno-klinicznych wraz z komentarzem histopatologicznym oraz prezentuje najnowsze trendy badawcze w nefropatologii nerki własnej i przeszczepionej.

Byłem jednym z wykładowców podczas konferencji szkoleniowej dla lekarzy wszystkich specjalności organizowanej przez Dolnośląską Izbę Lekarską we Wrocławiu pt. „***Chory w wieku podeszłym – „Last but not least”. Gospodarka potasowa i równowaga kwasowo-zasadowa oraz zdanie urologa o nefropatii obturacyjnej i patomorfologa o mikroskopowym obrazie nerek w zdrowiu i chorobie***”, gdzie wygłosiłem wykład dotyczący zmian mikroskopowych obserwowanych w nerkach w przebiegu starzenia (19.02.2016).

Byłem jednym z wykładowców na kursie doskonalącym z listy CMKP dla lekarzy specjalizujących się w radiologii pt. „***Kompleksowa diagnostyka chorób sutka, mammografia, zagadnienia wykrywania raka sutka***”, gdzie wygłosiłem wykład dotyczący klasyfikacji patologicznej guzów sutka (03.02.2014).

Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

Odbyłem następujące kursy i szkolenia w międzynarodowych jednostkach naukowych:

- Harvard Medical School, Boston, USA; 2017-10-30 – 2017-11-03; specjalistyczny kurs z zakresu histopatologii klinicznej;
- Targos Molecular Pathology GmbH, Kassel, Niemcy; 2016-11-03 – 2016-11-04; specjalistyczny kurs z zakresu oceny ekspresji PD-L1 w czerniaku skóry i raku płuca;
- Universitätsspital Basel, Institut für Pathologie, Bazylea, Szwajcaria; 2015-06-29 – 2015-07-02; specjalistyczny kurs z zakresu nefropatologii nerki przeszczepionej.

Ponadto odbyłem 14 kursów doskonalących i szkoleń krajowych w zakresie m.in.: histopatologii onkologicznej, patologii urologicznej, patologii głowy i szyi, dermatopatologii, hematopatologii oraz patologii gruczołu piersiowego, m.in.:

- Dermatopathology update in benign, borderline and malignant melanocytic lesions, and adnexal tumors – a 3-day pathology course, Poznań (15.10-17.10.2013)
- Diagnostyka chorób tarczycy, CMKP, Warszawa (16.12-18.12.2013)
- Podstawy histopatologicznej diagnostyki kłębuszkowych chorób nerek, Łódź (20.02-21.02.2014)
- Cytologia ginekologiczna, CMKP, Warszawa (12.05-30.05.2014)
- Histopatologia onkologiczna, CMKP, Warszawa (22.09-31.10.2014)
- Cytologia kliniczna, CMKP, Warszawa (23.02-06.03.2015)
- Breast pathology for the practicing pathologist, Warszawa (11.06-13.06.2015)
- Hematopathology: a practical approach to diagnosis in the current era, Warszawa (15.10-17.10.2015)
- Update in bone and soft tissue pathology, Warszawa (19.05-21.05.2016)
- Updates in head & neck pathology. From diagnosis to proper treatment, Warszawa (09.06-11.06.2016)
- Diagnostyka patomorfologiczna z uwzględnieniem materiału biopsyjnego, CMKP, Warszawa (30.05-24.06.2016)
- Neuropatologia, CMKP, Warszawa (05.09-09.09.2016)
- Review and recent advances in urologic pathology, Warszawa (06.10-08.10.2016)
- Gynecologic pathology: the basics, the controversies and the future, Warszawa (22.06-24.06.2017)
- Current concepts for the practicing pathologist: cytology with histologic correlation, Warszawa (05.10-07.10.2017).

Recenzowanie projektów międzynarodowych

Byłem recenzentem projektu naukowego na wniosek Izrealskiego Ministerstwa Nauki i Technologii w ramach programu "Personalized Medicine" (2017).

Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych

Wielokrotnie recenzowałem artykuły w prestiżowych czasopismach medycznych o zasięgu międzynarodowym (łącznie 38 recenzji):

- Journal of Investigative Dermatology (1 recenzja; IF: 6.287)
- Expert Opinion on Therapeutic Targets (1 recenzja; IF: 4,798)
- Breast Cancer Research and Treatment (1 recenzja; IF: 4,198)
- Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention (1 recenzja; IF: 4,125)
- Annals of Surgical Oncology (1 recenzja; IF: 3,943)
- Journal of Surgical Oncology (1 recenzja; IF: 3,151)
- Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology (1 recenzja; IF: 3.029)
- Journal of Clinical Pathology (1 recenzja; IF: 2,912)
- Drug Design, Development and Therapy (1 recenzja; IF: 2,881)
- Head and Neck (1 recenzja; IF: 2.760)
- Experimental and Molecular Pathology (1 recenzja; IF: 2,638)
- Virchows Archiv (1 recenzja; IF: 2,651)
- Melanoma Research (1 recenzja; IF: 2.615)
- World Journal of Gastroenterology (1 recenzja; IF: 2,369)
- OncoTargets and Therapy (7 recenzji; IF: 2,311).
- World Journal of Surgical Oncology (1 recenzja; IF: 1,408)
- Pathology - Research and Practice (2 recenzje; IF: 1,388)
- Advances in Clinical and Experimental Medicine (6 recenzji; IF: 1,127)
- Journal of Cosmetic Dermatology (1 recenzja; IF: 1,126)
- Folia Histochemica et Cytobiologica (4 recenzje; IF: 1,060)
- Biologics: Targets and Therapy; Submission (1 recenzja)
- Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis (1 recenzja)
- The Indian Journal of Medical Research (1 recenzja)

Działalność organizacyjna

Pełnię funkcję pełnomocnika Katedry Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej w pracach związanych z procesami kategoryzacji i parametryzacji Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego, które odbywają się pod kierownictwem Wydziałowej Komisji ds. Kategoryzacji UMW.

Wrocław, 15.05.2018


.....
podpis