



**Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie**  
**ZAKŁAD DERMATOLOGII ESTETYCZNEJ**  
**KATEDRY CHOROÓB SKÓRNYCH I WENERYCZNYCH PUM**  
*Kierownik: prof. dr hab. n. med. Mariola Marchlewicz*

Szczecin, dnia 07.01.2015

Recenzja pracy doktorskiej

**Lek. med. Jacka Calika pt. „Rokownicze znaczenie ekspresji NOGO-A/B oraz receptora NgBR w czerniaku”**

Czerniak złośliwy (Melanoma malignum, MM) jest jednym z najbardziej złośliwych nowotworów występujących u ludzi. W schorzeniu tym stosunek umieralności do zachorowalności jest bardzo wysoki a przebieg schorzenia jest trudny do przewidzenia. Częstość występowania czerniaka zależy od różnych czynników np. położenia geograficznego, fototypu skóry. Polska jest, według danych statystycznych, krajem o średnio-niskim współczynniku zachorowalności na czerniaka. Jednak podobnie jak w wielu krajach, również w Polsce, zauważa się tendencję do wzrostu liczby zachorowań na czerniaka o ok. 3-7% rocznie. Pomimo wysiłków podejmowanych zarówno przez naukowców, jak i przez lekarzy praktyków zaangażowanych w proces diagnozowania i leczenia pacjentów z MM, odsetek ich 5-letniego przeżycia, jest w Polsce najniższy wśród krajów europejskich. Wynika to głównie ze zbyt późnego rozpoznawania choroby, dlatego bardzo ważnym jest zagadnienie odpowiedniej świadomości pacjentów i ich zgłaszanie się na kontrolne badania dermatoskopowe zmian barwnikowych skóry.

Przedstawiona do recenzji Rozprawa zawarta jest na 107 stronach, zawiera 19 rycin oraz 15 tabel. W spisie treści wyróżniono 11 rozdziałów, w kolejności: *Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Piśmiennictwo, Spis tabel, Spis rycin*. Praca napisana jest poprawnym językiem polskim, poprzedzona *Spisem treści*, zawiera

ZAKŁAD DERMATOLOGII ESTETYCZNEJ

KATEDRY CHOROÓB SKÓRNYCH I WENERYCZNYCH PUM

Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin tel/fax 91 466 14 70 e-mail: dermest@pum.edu.pl

również *Wykaz ważniejszych skrótów używanych w pracy*. Praca została zredagowana zgodnie z wymogami przyjętymi dla prac doktorskich. Układ rozdziałów oraz opracowanie graficzne są przejrzyste i bardzo starannie przygotowane. Cytowane piśmiennictwo jest odpowiednio dobrane.

We *Wstępie* liczącym 52 strony Lek. Jacek Calik w sposób **przystępny, dydaktyczny i przemyślany** wprowadził czytelnika w najważniejsze tematy, które są niezbędne do zrozumienia, prezentowanych w dalszej części pracy wyników badań, ich interpretacji i dyskusowania. W tym rozdziale zawarte zostały szczegółowe informacje dotyczące epidemiologii czerniaka. Ponadto Doktorant wymienił i scharakteryzował postacie czerniaka oraz skale służące do określenia zaawansowania choroby (skala wg Breslawa, Clarka oraz skala TNM wg AJCC - American Joint Committee on Cancer). Szczegółowo przedstawił aktualny stan wiedzy na temat czynników wpływających na powstawanie czerniaka, w tym czynniki środowiskowe, genetyczne oraz czynniki zależne od pacjenta. Wśród czynników środowiskowych szczególnie podkreślił rolę ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe w etiopatogenezie czerniaka. Wśród czynników zależnych od pacjenta omówił rolę czynników takich jak: fenotyp skóry i rasa, wiek i płeć, zaburzenia hormonalne, status ekonomiczno-społeczny, dieta, zmiany barwnikowe w obrębie skóry, choroby współistniejące. Przedstawił dane literaturowe na temat roli genu *MC1R*, mutacji w genie kinazy serynowo-treoninowej *BRAF*, genie *NRAS*, *c-KIT*, genów supresorowych: *TP53*, *ARF*, *p16*. W kolejnym podrozdziale omówił diagnostykę oraz leczenie czerniaków, w tym m.in.: metody chirurgiczne, leczenie systemowe oraz nowoczesne terapie (inhibitory wielokinazowe, inhibitor białka BRAF). Doktorant podkreślił, że w czerniakach skóry i błon śluzowych standardem leczenia ogniska pierwotnego jest całkowita biopsja wycinająca, która jest zabiegiem zarówno diagnostycznym, jak i leczniczym. Zwrócił uwagę na rolę oceny dermatoskopowej, a szczególnie wideodermatoskopowej, zmian barwnikowych skóry we wcześniejszym wykrywaniu czerniaka, w porównaniu do tradycyjnej oceny klinicznej zmian. W podrozdziale czwartym *Wstępu* Doktorant przedstawił informacje dotyczące progresji i rozsiewu przerzutów w przebiegu czerniaka. W kolejnym, piątym podrozdziale Doktorant opisał procesy angiogenezy i limfangiogenezy w czerniaku. Podrozdział szósty to opis antygenu Ki-67 i jego znaczenia rokowniczego, natomiast w podrozdziale siódmym omówił występowanie i znaczenie białek z rodziny retikulonów (białka NOGO) w różnych procesach fizjologicznych i patologicznych.

**Wstęp** napisany jest bardzo szczegółowo, dokładnie ale też przejrzysto, przybliżając czytającemu omawiane zagadnienia i umożliwiając zrozumienie istoty tematyki pracy.

Tak dokładne zapoznanie się Doktoranta z aktualnym stanem wiedzy, z najnowszej literatury światowej, pozwoliło na realizację ambitnych, prawidłowo i jasno sformułowanych celów badań.

***Celem badań Doktoranta było:***

1. Określenie nasilenia ekspresji białka NOGO-A, NOGO-A/B oraz receptora NgBR w komórkach znamion barwnikowych oraz komórkach czerniaka
2. Określenie nasilenia ekspresji antygenu Ki-67 w komórkach czerniaka
3. Ocena korelacji nasilenia ekspresji białek NOGO-A, NOGO-A/B i NgBR z wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi oraz ekspresją antygenu Ki-67 w badanych przypadkach czerniaka
4. Ocena ekspresji antygenów CD31 oraz D2-40 w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych i limfatycznych w badanych przypadkach czerniaka
5. Zbadanie korelacji ekspresji białek NOGO-A, NOGO-A/B i NgBR z gęstością naczyń wykazujących ekspresję antygenów CD31 oraz D2-40
6. Określenie rokowniczego znaczenia ekspresji badanych białek NOGO-A, NOGO-A/B i NgBR oraz markerów naczyń (CD31, D2-40) w badanych przypadkach czerniaka.

***Materiały i metody.*** Do badań wykorzystano materiał archiwalny w postaci bloczków parafinowych wycinków guzów od 41 pacjentów z rozpoznaniem łagodnych znamion barwnikowych oraz od 79 pacjentów z rozpoznaniem czerniaka. Materiał tkankowy pochodził od pacjentów leczonych w Dolnośląskim Centrum Onkologii, w latach 1994–2012. Badania przeprowadzono na materiale tkankowym pochodzącym z ogniska pierwotnego czerniaka od 42 pacjentów oraz na materiale z przerzutów tego nowotworu od 37 pacjentów. Doktorant uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (uchwała KB-381/2012) na przeprowadzenie badań. **Na podkreślenie zasługuje fakt, że praca realizowana była w ramach projektu "Wrovasc – zintegrowane centrum medycyny sercowo-naczyniowej" współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013, realizowanego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, w Ośrodku Badawczo-Rozwojowym.**

Procedury, którym poddano tkanki przeznaczone do badań:

1. Przygotowanie skrawków parafinowych z materiału tkankowego

2. Barwienie hematoksyliną i eozyną skrawków parafinowych
3. Przeprowadzenie reakcji immunohistochemicznych z przeciwciałami: anti-NOGO A/B, anti-NOGO A, anti-Ki-67, anti-Podoplanin klon D2-40, anti-CD-31
4. Ocena histopatologiczna oraz ocena głębokości nacieku badanych czerniaków wg skali Breslow'a
5. Ocena nasilenia reakcji immunohistochemicznych.

Uzyskane wyniki poddano bardzo dokładnej i odpowiedniej analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Prism 5.0 firmy GraphPad. Do badań zastosowano test Shapiro-Wilk'a, nieparametryczny test U-Manna-Whitney'a a także test Kruskal-Wallis'a, stosując analizę *post hoc* testem Dunn'a. Ponadto wykorzystano test dokładny Fisher'a do oceny zależności pomiędzy zmiennymi nominalnymi. Zależności pomiędzy nasileniem ekspresji analizowanych markerów sprawdzono testem korelacji rang Spearman'a. Natomiast do analizy krzywych przeżyć Kaplan-Meier'a w analizie jednoczynnikowej wykorzystano test Mantel-Cox'a.

**Wyniki badań.** W trakcie przeprowadzonych badań Doktorant określił ekspresję białek: NOGO-A, NOGO-A/B i NgBR w korelacji z markerami immunohistochemicznymi naczyń krwionośnych, limfatycznych i proliferacji komórek oraz danymi kliniczno-patologicznymi przypadków badanych czerniaków:

1. **Ekspresja NOGO-A/B/, NOGO-A oraz NgBR w badanych zmianach barwnikowych.** Zaobserwowano cytoplazmatyczną reakcję NOGO-A/B we wszystkich badanych przypadkach zmian barwnikowych i czerniakach oraz przerzutach tego nowotworu. Ponadto zanotowano istotne statystycznie różnice w ekspresji NOGO-A/B w poszczególnych typach zmian. Analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice w ekspresji NOGO-A pomiędzy wszystkimi badanymi zmianami. Cytoplazmatyczną ekspresję receptora NgBR obserwowano we wszystkich badanych zmianach barwnikowych oraz guzach pierwotnych czerniaka, natomiast w zmianach przerzutowych czerniaka ekspresję receptora NgBR obserwowano w 33 przypadkach.
2. **Korelacja ekspresji NOGO-A/B w guzach pierwotnych czerniaka z danymi kliniczno-patologicznymi.** Zaobserwowano istotną statystycznie ujemną korelację nasilenia ekspresji NOGO-A/B z głębokością nacieku czerniaka mierzoną w mm. Nie zanotowano natomiast istotnej korelacji z głębokością nacieku mierzoną w skali Clark'a. Ponadto nie wykazano

istotnych statystycznie różnic nasilenia ekspresji NOGO-A/B w zależności od występowania owrzodzenia guza pierwotnego, płci, jak również nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji nasilenia badanego markera z wiekiem pacjentów. Nie wykazano również istotnej korelacji nasilenia ekspresji NOGO-A/B z ekspresją antygenu Ki-67 w komórkach czerniaka zarówno w guzie pierwotnym jak i w zmianach przerzutowych.

3. **Korelacja ekspresji NOGO-A w guzach pierwotnych czerniaka z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów.** Nie zaobserwowano istotnie statystycznych zależności nasilenia ekspresji tego białka z głębokością naciekania mierzoną w  $\mu\text{m}$  jak również wg skali Clark'a. Ponadto nie wykazano istotnych statystycznie różnic nasilenia ekspresji NOGO-A w zależności od występowania owrzodzenia guza pierwotnego, płci, jak również nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji nasilenia badanego markera z wiekiem pacjentów. Nie wykazano korelacji nasilenia ekspresji NOGO-A z ekspresją antygenu Ki-67 w komórkach czerniaka.
4. **Korelacja ekspresji NgBR w guzach pierwotnych czerniaka z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów.** Zaobserwowano istotną statystycznie ujemną korelację nasilenia ekspresji NgBR z głębokością nacieku czerniaka mierzoną w  $\mu\text{m}$ . Nie zanotowano natomiast korelacji z głębokością nacieku mierzoną wg skali Clark'a. Ponadto nie wykazano istotnych statystycznie różnic nasilenia ekspresji NgBR w zależności od występowania owrzodzenia guza pierwotnego, płci, jak również nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji nasilenia badanego markera z wiekiem pacjentów. Nie wykazano korelacji nasilenia ekspresji NgBR z ekspresją antygenu Ki-67 w komórkach czerniaka.
5. **Ekspresja antygenu CD31 w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych.** Ekspresję antygenu CD31 zaobserwowano w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych w przypadku obszaru wewnątrz guza, jak również w obszarze z otoczenia guza zmian pierwotnych i przerzutowych. Istotnie mniejszą gęstość naczyń (CD31+) zaobserwowano wewnątrz guza pierwotnego w porównaniu do obszaru otaczającego.
6. **Ekspresja antygenu D2-40 w komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych.** Ekspresję antygenu D2-40 zaobserwowano w komórkach śródbłonna naczyń **limfatycznych** w przypadku obszaru wewnątrz guza, jak również w obszarze z otoczenia guza zmian pierwotnych i przerzutowych. Zaobserwowano istotnie niższą gęstość naczyń (D2-40+) wewnątrz guza pierwotnego w porównaniu do obszaru otaczającego. Podobną zależność stwierdzono w zmianach przerzutowych.

7. **Korelacja ekspresji NOGO-A/B, NOGO-A i NgBR z antygenem CD31 oraz D2-40 w zmianach pierwotnych i przerzutowych czerniaka.** Wykazano ujemną korelację ekspresji NgBR z gęstością naczyń limfatycznych w obszarze otaczającym guz w zmianach pierwotnych.
8. **Analiza czasu przeżyć pacjentów w zależności od ekspresji poszczególnych markerów IHC w zmianach pierwotnych czerniaka oraz w zależności od danych kliniczno-patologicznych.**

Istotnie dłuższy czas przeżycia zanotowano u pacjentów z wysoką ekspresją NOGO-A/B (>6pkt w skali IRS) oraz małą głębokością nacieku w skali Breslowa lub Clarka.

*Wyniki* badań przedstawiono na 17 stronach w postaci opisowej oraz w formie czytelnych rycin.

*Dyskusja.* Następnie w *Dyskusji*, Doktorant porównał i przedyskutował otrzymane wyniki z uzyskanymi przez innych autorów, posługując się **biegle** wiedzą dostępną przede wszystkim w anglojęzycznych publikacjach, **wyczerpująco i z dojrzałością naukową** przeanalizował wszystkie uzyskane wyniki, zaprezentował swoje opinie i sugestie na tle wyników badań innych autorów. Rozdział ten napisany został w sposób interesujący i świadczący o **dużej wiedzy** Autora.

*Wnioski.* Na podstawie **dobrze zaprojektowanych i starannie przeprowadzonych badań** Doktorant sformułował następujące wnioski:

1. Niskie nasilenie ekspresji NOGO-A oraz wysokie ekspresji NOGO-A/B w komórkach czerniaka może wskazywać, iż NOGO-B jest dominującą formą białek z grupy retikulonów występującą w tym nowotworze.
2. Uzyskane rezultaty mogą potwierdzać proapoptyczną rolę białka NOGO-B w komórkach czerniaka.
3. Nasilenie ekspresji białka NOGO-B w komórkach czerniaka może być użytecznym markerem prognostycznym w tego typu nowotworach człowieka.

Z obowiązku recenzenta chciałabym wskazać na nieliczne błędy literowe, stylistyczne, edytorskie, które jednak nie mają żadnego wpływu na wysoką ocenę merytorycznego aspektu pracy.

W pracy zacytowano ok. 200 dobrze dobranych, związanych z tematyką pracy pozycji literaturowych przede wszystkim anglojęzycznych, z których większość pochodzi z ostatnich pięciu lat.

**Wysoko oceniana** przeze mnie Rozprawa przyczynić się może do lepszego poznania mechanizmów regulujących proliferację komórek jednego z najbardziej złośliwych i nieprzewidywalnych nowotworów, jakim jest czerniak złośliwy. **Poszerza naszą wiedzę**, co do obecności i skutków występowania w komórkach czerniaka białek NOGO i ich receptora. Dostępne dane literaturowe wskazują bowiem, na potencjalną rolę supresorową białka NOGO-B w patogenezie niektórych nowotworów oraz na znaczącą rolę białek NOGO w procesach regeneracyjnych narządów i tkanek, szczególnie neuronów, zatem pamiętając o neuroektodermalnym pochodzeniu melanocytów, ciekawe jest badanie wpływu tych białek na powstawanie i progresję czerniaka. Dodatkowo należy podkreślić, że dotychczasowe badania na temat roli białek NOGO w procesach nowotworowych, były nieliczne i prowadzone na liniach komórkowych oraz koncentrowały się na roli tych białek w procesach proliferacji, angiogenezy, apoptozy, migracji, inwazyjności. **Dopiero badania prezentowane w niniejszej Rozprawie, przeprowadzone na materiale klinicznym, wskazują na potencjalny udział białka NOGO-B w patogenezie oraz progresji czerniaka.**

Według mojej oceny niniejsza rozprawa wnosi **istotne** informacje mające nie tylko aspekt **poznawczy, ale mogące mieć aplikację kliniczną**. Temat pracy wydaje mi się bardzo aktualny ze względu na rosnącą częstość zachorowań na czerniaka, dużą złośliwość tego nowotworu i trudny do przewidzenia przebieg. Dlatego istotne jest podejmowanie badań poszukujących nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych oraz nowych metod terapeutycznych w tym typie nowotworu.

Według mnie Doktorant wykazał się nie tylko dojrzałością naukową w planowaniu badań i interpretacji uzyskanych wyników, ale też **dużą** wiedzą z zakresu cytofizjologii i patomorfologii.

**Reasumując jest to bardzo dobrze wykonana praca badawcza wnosząca nowe, ważne obserwacje dla naukowców zajmujących się problematyką czerniaka.** Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 ust.1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595, z późn. zm.) W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Lek. Jacka Calika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

KIEROWNIK  
Zakładu Dermatologii Estetycznej  
*Manola Marchlewska*  
dr hab. n. med. Mariola Marchlewska