

Załącznik nr 2

**AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

dr Łukasz Kuźbicki

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Zakład Biologii Medycznej
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

Toruń 2018

1. Imię i nazwisko

Łukasz Kuźbicki

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2007 Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologia

Zakład Biologii Medycznej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (1951-2012),
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ekspresja COX-2, LAMP-1 i CDK-2 jako potencjalnych markerów przydatnych w immunocytochemicznym wykrywaniu komórek czerniaka oraz ocenie jego zaawansowania u człowieka”

Promotor: prof. dr hab. Barbara W. Chwirut (Zakład Biologii Medycznej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu)

Recenzenci: prof. dr hab. Wiesław Kozak (Zakład Immunologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu), prof. dr hab. Zofia Kiliańska (Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź)

Nagroda Prezesa Rady Ministrów za wyróżnioną rozprawę doktorską
(Warszawa, 05.02.2009)

2003 Dyplom magistra biologii w zakresie biologia molekularna

Zakład Biologii Medycznej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (1951-2012),
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Tytuł pracy magisterskiej: „Opracowanie metody hybrydyzacji *in situ* wykrywania genu *Apaf-1* w komórkach skóry człowieka”

Promotor: prof. dr hab. Barbara W. Chwirut

Recenzent: dr hab. Andrzej Przystalski, prof. UMK

Studia ukończone z wynikiem **bardzo dobrym**, nagradzany czterokrotnie stypendium za wyniki w nauce, w tym **dwukrotnie Stypendium Rektora UMK**

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 01.10.2007 - **adiunkt**, Zakład Biologii Medycznej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

od 01.10.2006 do 30.09.2007 - **asystent** (1/2 etatu), Zakład Biologii Medycznej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (1951-2012), Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

od 01.10.2003 do 25.05.2007 - **doktorant**, Zakład Biologii Medycznej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

od 01.10.2002 do 31.07.2003 - **asystent-stażysta**, Zakład Biologii Medycznej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

4. Ukończone kursy, szkolenia i warsztaty

- a. Certyfikat udziału w seminarium dotyczącym technologii Single-Cell Genomics, Open Exome s.c., Warszawa, 11.06.2014
- b. Certyfikat ukończenia szkolenia z zakresu obsługi systemu mikroskopii wirtualnej Olympus VS120, Olympus Polska Sp. z o.o., Toruń, 03.10.2012
- c. Certyfikat uczestnictwa w VI Spotkaniu Użytkowników Mikroskopów Konfokalnych. Warsztaty zostały przeprowadzone na sprzęcie badawczym firmy Carl Zeiss: superczułym mikroskopie konfokalnym LSM 780, uniwersalnym mikroskopie konfokalnym LSM 700, mikroskopie typu monozoom Axio Zoom.V16 z systemem rejestracji konfokalnych Apotome.2, badawczym mikroskopie odwróconym Axio Observer z LEDowym systemem oświetleniowym Colibri.2 oraz rutynowym mikroskopie odwróconym Axio Vert.A1, Carl Zeiss Sp. z o.o., Wrocław, 29 - 31.05.2012
- d. Certyfikat ukończenia szkolenia z zakresu obsługi mikroskopów Olympus: BX63, IX81 i SZX16 wyposażonych w kamery cyfrowe, odpowiednio: XC50, XM10 i XC50 z oprogramowaniem CellSens oraz obsługi automatycznego systemu obrazowania konfokalnego Olympus FV10i, Olympus Polska Sp. z o.o., Toruń, 19 - 20.04.2011
- e. Certyfikat ukończenia szkolenia z zakresu obsługi systemu mikrodysekcji laserowej CellCutPlus wraz z mikroskopem Olympus IX71 z kamerą cyfrową i oprogramowaniem, Olympus Polska Sp. z o.o., Toruń, 21 - 22.02.2011
- f. Certyfikat uczestnictwa w kursie szkoleniowym dotyczącym prawidłowej obsługi, zasad eksploatacji i konserwacji sprzętu laboratoryjnego, w tym mikrotomu rotacyjnego Leica RM2265, KENDROMED Sp. z o.o., Toruń, 25.01.2011
- g. Certyfikat uczestnictwa w warsztatach z zakresu użytkowania systemu LightCycler, które obejmowały następujące zagadnienia: podstawy techniki real-time PCR, obsługa urządzenia LightCycler 480, obsługa oprogramowania LightCycler Software, oznaczanie profilu ekspresji genów z zastosowaniem sond typu TaqMan (DUAL COLOR), przeprowadzenie oraz analiza reakcji typu High Resolution Melting, Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o., Bydgoszcz, 27.09.2010
- h. Dyplom uczestnictwa w seminarium „Praktyczne zastosowania real-time PCR”, Centrum Edukacji Medycznej CEMED Sp. z o.o., Warszawa, 30.10.2009

- i. Certyfikat uczestnictwa w warsztatach z zakresu użytkowania systemu LightCycler, które obejmowały następujące zagadnienia: podstawy techniki real-time PCR, obsługa urządzenia LightCycler 480, obsługa oprogramowania LightCycler Software, przeprowadzenie oraz analiza reakcji, ekspresja genów panele Real Time Ready, Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o., Bydgoszcz, 22.09.2009
 - j. Certyfikat udziału w warsztatach dotyczących technik elektroforetycznych oraz fluorescencyjnych i zapoznania się z techniką rozdziału białek w systemie NuPage, właściwościami i zastosowaniem nowej generacji znaczników fluorescencyjnych Odots, ALAB Sp. z o.o., Toruń, 11 - 12.06.2008
5. Wskazanie osiągnięcia naukowego 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.)

- a. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Diagnostyczne i prognostyczne markery czerniaka skóry u człowieka”

- b. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Osiągnięcie naukowe będące podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl siedmiu oryginalnych prac badawczych opublikowanych w latach 2009-2018 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR).

- 1) **Kuźbicki Ł.**, Lange D., Stanek-Widera A., Glińska A., Chwirot B.W.* - “Enhanced intratumoral expression of RNF2 is a favorable prognostic factor for patients with cutaneous melanoma?”, *Oncotarget*, Vol. 9 (17656-17663) 2018

IF = 5,168; liczba punktów MNiSW = 35

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań, opracowanie i optymalizację procedury oraz wykonanie dla każdego z przebadanych przypadków melanocytarnych nowotworów skóry człowieka reakcji immunohistochemicznej i szczegółowej analizy mikroskopowej jej wyników (obliczanie udziału procentowego komórek RNF2 - pozytywnych w poszczególnych warstwach skóry w obrębie guza nowotworowego, niezależnie w centrum i w brzegu zmiany oraz w otaczających zdrowych tkankach z uwzględnieniem oceny intensywności immunohistochemicznego wybarwienia poszczególnych komórek), statystyczną analizę wyników i udział w ich

interpretacji, przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu wraz ze wszystkimi rysunkami i tabelami, udział w korekcie publikacji po recenzji. Mój udział szacuję na 60%.

- 2) **Kuźbicki Ł.**, Lange D., Stanek-Widera A., Chwirot B.W.* - "Prognostic significance of RBP2-H1 variant of JARID1B in melanoma", *BMC Cancer*, Vol. 17 (854) <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3836-x> 2017

IF = 3,288; liczba punktów MNiSW = 30

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań, wykonanie dla każdego z przebadanych przypadków nowotworów reakcji immunohistochemicznych równolegle z użyciem dwóch typów przeciwciał anti-JARID1B, szczegółową analizę mikroskopową wyników reakcji (analogicznie jak w opisie mojego udziału w pierwszej pracy), statystyczną analizę wyników badań i udział w ich interpretacji, udział w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu, wykonanie wszystkich rysunków i tabel, udział w korekcie publikacji po recenzji. Mój udział szacuję na 60%.

- 3) **Kuźbicki Ł.**, Lange D., Stanek-Widera A., Chwirot B.W.* - "Intratumoral expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) is a negative prognostic marker for patients with cutaneous melanoma", *Melanoma Research*, Vol. 26 (448-456) 2016

IF = 2,615; liczba punktów MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań, wykonanie dla każdego z przebadanych przypadków nowotworów reakcji immunohistochemicznej wykrywania COX-2, szczegółową analizę mikroskopową wyników reakcji (analogicznie jak w opisie mojego udziału w pierwszej pracy), statystyczną analizę wyników badań i udział w ich interpretacji, przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu wraz ze wszystkimi rysunkami, udział w korekcie publikacji po recenzji. Mój udział szacuję na 60%.

- 4) **Kuźbicki Ł.**, Lange D., Strączyńska-Niemiec A., Chwirot B.W.* - "Altered splicing of JARID1B in development of human cutaneous melanoma?", *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, Vol. 24 (188-192) 2016

IF = 1,634; liczba punktów MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań, kierowanie projektem finansowanym Grantem UMK nr 1529-B, wykonanie dla każdego z przebadanych przypadków zmian skóry reakcji immunohistochemicznych równolegle z użyciem dwóch typów przeciwciał anti-JARID1B, szczegółową analizę mikroskopową wyników reakcji (analogicznie jak

w opisie mojego udziału w pierwszej pracy), statystyczną analizę wyników badań i udział w ich interpretacji, udział w przygotowaniu manuskryptu i jego korekty po recenzji, wykonanie wszystkich rysunków. Mój udział szacuję na 60%.

- 5) **Kuźbicki Ł.**, Lange D., Strączyńska-Niemiec A., Chwirot B.W.* - "JARID1B expression in human melanoma and benign melanocytic skin lesions", *Melanoma Research*, Vol. 23 (8-12) 2013

IF = 2,098; liczba punktów MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań, opracowanie i optymalizację procedury oraz wykonanie dla każdego z przebadanych przypadków znamion, czerniaków skóry i przerzutów reakcji immunohistochemicznej wykrywania JARID1B, szczegółową analizę mikroskopową wyników reakcji (analogicznie jak w opisie mojego udziału w pierwszej pracy), statystyczną analizę wyników badań i udział w ich interpretacji, udział w przygotowaniu manuskryptu i jego korekty po recenzji, wykonanie wszystkich rysunków. Mój udział szacuję na 60%.

- 6) **Kuźbicki Ł.**, Lange D., Strączyńska-Niemiec A., Chwirot B.W.* - "The value of cyclooxygenase-2 expression in differentiating between early melanomas and histopathologically difficult types of benign human skin lesions", *Melanoma Research*, Vol. 22 (70-76) 2012

IF = 2,518; liczba punktów MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań, kierowanie projektem finansowanym Grantem MNiSW nr 0217/P01/2010/70, wykonanie dla każdego z przebadanych przypadków znamion i czerniaków skóry reakcji immunohistochemicznej wykrywania COX-2, szczegółową analizę mikroskopową wyników reakcji (analogicznie jak w opisie mojego udziału w pierwszej pracy), statystyczną analizę wyników badań i udział w ich interpretacji, przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu wraz ze wszystkimi rysunkami, udział w korekcie publikacji po recenzji. Mój udział szacuję na 60%.

- 7) **Kuźbicki Ł.**, Lange D., Chwirot B.W.* - "Cyclooxygenase-2 (COX-2) immunohistochemistry in human melanoma: differences between results obtained with different antibodies", *Melanoma Research*, Vol. 19 (294-300) 2009

IF = 2,061; liczba punktów MNiSW = 24

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań, opracowanie i optymalizację procedur oraz wykonanie reakcji immunohistochemicznych równolegle z użyciem trzech typów przeciwciał anty-

COX-2 w standardowych preparatach histopatologicznych dla każdej z przebadanych łagodnych i złośliwych melanocytarnych zmian skóry człowieka, szczegółową analizę mikroskopową wyników reakcji (analogicznie jak w opisie mojego udziału w pierwszej pracy), statystyczną analizę wyników badań i udział w ich interpretacji, udział w przygotowaniu manuskryptu i jego korekty po recenzji, wykonanie wszystkich rysunków. Mój udział szacuję na 70%.

Wartość IF oraz punktację MNiSW dla poszczególnych prac podano zgodnie z rokiem ich opublikowania. Symbolem (*) zaznaczono nazwisko autora korespondującego.

Sumaryczny IF osiągnięcia naukowego = 19,382

Suma punktów MNiSW osiągnięcia naukowego = 189

- c. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników oraz ich ewentualnego wykorzystania (odniesienia do tych prac podkreślono)

Czerniaki są przyczyną 90% zgonów spowodowanych nowotworami skóry [Garbe i wsp., 2016]. Spośród wszystkich pacjentów z czerniakiem, u jednej trzeciej z nich pojawia się wznova choroby. Biorąc pod uwagę przypadki wznowy czerniaka, dwie trzecie tych objawów progresji choroby występuje już w ciągu 2 lat od wykrycia nowotworu [Tas i Erturk, 2017]. Najważniejszymi czynnikami prognostycznymi dla pacjentów z czerniakiem skóry w stadium zmiany pierwotnej bez przerzutów są: grubość nacieku w skali Breslowa, indeks mitotyczny i owrzodzenie guza. **Jednakże czerniaki są bardzo heterogenne i prognozowanie przebiegu choroby, nawet w tym samym stadium zaawansowania, w niektórych przypadkach jest trudne.** Wykazano, że spośród 681 pacjentów z czerniakiem o małej grubości nacieku ($<0,76$ mm), 18,6% miało przerzuty, z kolei u 5,1% stwierdzono wznowy miejscowe lub guzy satelitarne [Slingluff i wsp., 1988]. Kalady i wsp. (2003) opisali przerzuty do węzłów chłonnych lub odległe u 15,3% z 1158 pacjentów z czerniakiem o grubości nacieku poniżej 1,0 mm. Z kolei inni badacze wykazali przerzuty czerniaka o małej grubości nacieku ($\leq 1,0$ mm) u 4,3% z 882 [Karakousis i wsp., 2006], 4,9% z 492 [Mozzillo i wsp., 2013] i 7,8% z 77 pacjentów [Filho i wsp., 2003]. Hinz i wsp. (2012) w badaniach obejmujących 121 przypadków czerniaka o grubości poniżej 1,0 mm wykazali przerzuty do węzłów chłonnych u 4,1% pacjentów. Ponadto w 5 przypadkach, w których nie wykryto w węzłach chłonnych przerzutów, nastąpiła później progresja choroby. Inni badacze stwierdzili przerzuty do węzłów chłonnych u 9,8% ze 102 pacjentów z czerniakiem o grubości $\leq 1,0$ mm i indeksie mitotycznym ≥ 1 , jednakże ta wartość indeksu mitotycznego miała znaczenie predykcyjne jedynie dla

czerniaków o grubości 1,01 - 2,00 mm [Wat i wsp., 2016]. Donizy i wsp. (2014) wykazali, że obecność owrzodzenia ma wartość prognostyczną dla pacjentów z czerniakiem o grubości $\leq 1,0$ mm, ale nie ma w przypadku bardziej zaawansowanego nowotworu.

Wartości wskaźników pięcioletniego i dziesięcioletniego przeżycia wynoszą odpowiednio od 97% i 93% dla pacjentów z czerniakiem w stadium T1aN0M0 do 53% i 39% dla T4bN0M0. W późniejszym stadium zaawansowania, najważniejszym czynnikiem prognostycznym jest liczba węzłów chłonnych z przerzutami czerniaka, a wskaźnik pięcioletniego przeżycia wynosi od 70% dla przypadków w stadium T1-4N1aM0 do 39% dla T1-4N3M0 [Balch i wsp., 2009]. Średni czas przeżycia pacjentów z czerniakiem będącym w stadium dawania odległych przerzutów wynosi mniej niż 1 rok [Tas, 2012]. Nowotwór w tym stadium jest oporny na stosowane formy immunoterapii (np. opartej na blokowaniu molekuł CTLA-4 i/lub PD-1 na limfocytach), terapii celowanej (np. ukierunkowanej na hamowanie aktywności BRAF V600E w komórkach czerniaka), a także na chemioterapię i radioterapię. Pomimo, że u niektórych pacjentów obserwowano pewne efekty terapeutyczne przedłużenia czasu przeżycia i zmniejszenia objawów choroby, to stosowanie tych terapii najczęściej niestety jest związane z występowaniem szeregu skutków ubocznych i nie pozwala na całkowite wyleczenie pacjenta [np. Grabe i wsp., 2016]. Dlatego jedyny skuteczny sposób leczenia czerniaka stanowi chirurgiczna resekcja, kiedy nowotwór jest jeszcze we wczesnym stadium zaawansowania. **Jednakże histopatologiczna diagnostyka różnicowa czerniaków pierwotnych, zwłaszcza ich wczesnych stadiów, od znamion barwnikowych w oparciu o kryteria cytologiczne i zmiany architektury tkanek bywa bardzo trudna.** Ocena mikroskopowa melanocytarnych zmian skóry dokonywana jest w oparciu o dosyć subiektywne kryteria. Istnieje całe spektrum nasilenia poszczególnych cech między znamionami a czerniakami. Histopatologiczna diagnostyka wykonywana poprzez analizę preparatów standardowo wybarwionych hematoksyliną i eozyną wymaga więc dużego doświadczenia eksperta. **Jako szczególnie problematyczne uważane są znamiona dysplastyczne, czyli atypowe oraz znamiona wrzecionowatokomórkowe i nabłonkowatokomórkowe, czyli znamiona Spitz i Reed.** Znamiona atypowe mogą być błędnie diagnozowane jako czerniaki głównie z powodu możliwości występowania w obrazie histopatologicznym cech wczesnego naciekania pagetoidalnego, a więc typowej dla czerniaków szerzących się powierzchownie migracji pojedynczych melanocytów lub ich małych grup w obrębie naskórka. W znamionach dysplastycznych może dochodzić również do wypełnienia agregatami komórkowymi połączenia skórno-naskórkowego, różnego nasilenia

tworzenia gniazd komórek, które mogą być obecne też w skórze właściwej, atypii komórkowej oraz obfitego nacieku zapalnego. Ponadto atypia melanocytów może mieć różny stopień nasilenia i przejawia się ona przede wszystkim powiększeniem, pleomorfizmem i niejednorodną strukturą chromatyny jąder tych komórek z wyraźnymi jąderkami. Często ich wielkość przekracza rozmiary jąder keratynocytów warstwy kolczystej naskórka, a cytoplazma ulega obkurczeniu i wakuolizacji. Z kolei znamiona Spitz i Reed, podobnie jak czerniaki, wykazują obecność dużych melanocytów kształtu nabłonkowego oraz gniazd melanocytów, a w niektórych przypadkach również atypii komórek. W przerośniętym naskórku rozproszony układ melanocytów może sugerować pagetoidalny wzór nacieku. Ponadto często w tych łagodnych zmianach obserwowane są figury mitotyczne w skórze właściwej [np. Barnhill i wsp., 1995]. Lodha i wsp. (2008) w badaniach 143 zmian melanocytarnych, wybranych jako „trudne przypadki”, wykazali niski stopień zgodności ocen dokonanych przez dwóch specjalistów ($\kappa = 0,30$). Wartość współczynnika kappa (κ) jest miarą zgodności ocen preparatów dokonywanych przez histopatologów (przyjmuje się, że zgodność jest nieprzypadkowa, gdy $\kappa > 0,40$). W innych badaniach, również dwóch histopatologów, dokonywało oceny 392 zmian barwnikowych: znamion oraz czerniaków o małej grubości nacieku. Stopień rozbieżności w odróżnianiu zmian łagodnych od złośliwych wynosił 14,3% [Shoo i wsp., 2010]. Farmer i wsp. (1996) porównali stopień zgodności ocen 37 zmian melanocytarnych skóry dokonanych niezależnie przez 8 histopatologów. Dla przebadanych zmian, opisanych w tej pracy jako „klasyczne przypadki”, wartość współczynnika κ wynosiła tylko 0,50, a w 38% przypadków uzyskano dwa lub więcej rozbieżnych rozpoznań. Cook i wsp. (1996) w badaniach 95 zmian barwnikowych skóry, przeprowadzonych również przez 8 histopatologów, uzyskali wartość współczynnika κ wynoszącą 0,77 dla odróżniania zmian łagodnych od złośliwych, ale tylko 0,63 dla czerniaków o grubości $<0,76$ mm. Co istotne, 2% przypadków znamion ostatecznie sklasyfikowano jako czerniaki, a 17% nowotworów złośliwych jako zmiany łagodne z cechami atypii. Nawet spośród czerniaków o grubości $\geq 0,76$ mm opis jednego z nich zastąpiono rozpoznaniem znamienia Spitz. Z kolei Brochez i wsp. (2002) w badaniach wykonanych przez 20 histopatologów wykazali, że wartość czułości wykrywania czerniaków wynosiła 87%, jednakże była ona niższa dla nowotworów o grubości <1 mm (83%) niż dla zmian o większej grubości nacieku (97%). Specyficzność wynosiła 94% i co istotne, aż 46% wyników fałszywie pozytywnych uzyskano dla znamion dysplastycznych. Szacuje się, że w ogólności około 17% zdiagnozowanych znamion jest w rzeczywistości czerniakami, a około 15% zmian ocenionych jako czerniaki jest znamionami [Martinez-Cardús i wsp., 2015]. Wyniki fałszywie negatywne stwarzają

ryzyko progresji choroby nowotworowej. Z kolei wyniki fałszywie pozytywne pociągają za sobą zbędne okaleczenie i stres pacjenta oraz generują dodatkowe koszty.

Od lat prowadzone są badania, które mają na celu znalezienie molekularnych markerów pomocnych w jednoznacznym odróżnianiu znamion od czerniaków, zwłaszcza we wczesnym stadium zaawansowania oraz w ocenie inwazyjności poszczególnych przypadków czerniaka. Badania te doprowadziły do wskazania pewnych antygenów, wykrywanych m.in. immunohistochemicznie. Jednak żaden z obecnie stosowanych markerów nie zapewnia, ani jednocześnie wysokiej czułości i specyficzności testu diagnostycznego, ani jednoznacznej prognozy dla pacjentów z czerniakiem [np. Gould Rothberg i Rimm, 2010; Karagiannis i wsp., 2015; Mandalà i Massi, 2014; Weinstein i wsp., 2014].

Cykl prac badawczych, stanowiący osiągnięcie naukowe będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, był skoncentrowany na biologii czerniaka skóry u człowieka. Przeprowadzone badania polegały na immunohistochemicznym wykrywaniu molekuł potencjalnie przydatnych jako markery diagnostyczne i prognostyczne tego bardzo inwazyjnego nowotworu. Pomimo, że metody biologii molekularnej pozwalają na dokonanie precyzyjnej analizy ilościowej poziomu wykrywanych molekuł i są coraz powszechniej stosowane, nie stwarzają one jeszcze perspektywy zastąpienia immunohistochemii. Poszczególne subpopulacje komórek nowotworowych są bowiem heterogenne. Ponadto oprócz nich, w materiale występują również inne typy komórek, np. keratynocyty naskórka, komórki nacieku zapalnego. Właśnie badania immunohistochemiczne, możliwe do przeprowadzenia również w materiale archiwalnym z ludzkich nowotworów, wciąż pozwalają na wdrażanie do praktyki klinicznej wyników badań podstawowych dotyczących obecności i przestrzennej lokalizacji w obrębie guza nowotworowego komórek charakteryzujących się ekspresją określonych genów. Biorąc pod uwagę dane literaturowe, do badań wybrano: cyklooksygenazę-2 (COX-2), JARID1B (ang. *Jumonji AT-Rich Interactive Domain 1B*) oraz RNF2/Ring1B.

Cyklooksygenazy (COX) katalizują przemianę kwasu arachidonowego do prostaglandyn. COX-2 charakteryzuje się ekspresją ograniczoną do komórek niektórych ludzkich tkanek, np. jest związana z różnicowaniem keratynocytów naskórka. Ekspresję COX-2 mogą indukować różne bodźce np. czynniki wzrostu, cytokiny, lipopolisacharydy bakteryjne. Wzmożenie wytwarzania prostaglandyn, towarzyszące wzrostowi ekspresji COX-2, może być zaangażowane w powstawanie i/lub progresję nowotworów poprzez różne mechanizmy: hamowanie apoptozy, stymulację proliferacji komórek, angiogenezy, inwazyjności komórek, immunosupresję, produkcję mutagenów. Udział COX-2 w hamowaniu apoptozy może

przejawiać się zwiększaniem poziomu czynników antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2 i Mcl-1. Z kolei wspomaganie angiogenezy przez COX-2 następuje poprzez stymulację produkcji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF), płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) i endoteliny-1. Inwazyjność komórek nowotworowych może być wzmacniana z udziałem COX-2 poprzez zwiększanie wytwarzania i aktywację enzymów degradujących elementy błony podstawnej oraz przebudowę cytoszkieletu zwiększającą mobilność komórek. Podwyższona ekspresja COX-2 może też zaburzać funkcjonowanie komórek dendrytycznych, powodować hamowanie namnażania limfocytów B i T, jak również stymulować różnicowanie makrofagów w kierunku fenotypu M2 i wzmacniać zasiedlanie obszaru guza nowotworowego przez komórki Treg [Liu i wsp., 2015; Misra i Sharma, 2014; Singh i Lucci, 2002].

JARID1B odgrywa istotną rolę w regulacji podziałów komórkowych i różnicowania. Białko to wykazuje aktywność demetylasy lizyny 4 histonu H3 (demetylaza H3K4) i może usuwać jedną, dwie lub trzy grupy metylowe. Może być zaangażowane w utrzymanie niskiego tempa proliferacji komórek czerniaka poprzez stabilizację białka RB w stanie niskiego ufosforylowania. Uważa się, że chociaż krótkotrwały efekt ekspresji JARID1B jest antyproliferacyjny, to w długiej perspektywie ma ona kluczowe znaczenie dla podtrzymania rozwoju nowotworu [Roesch i wsp., 2006, 2010]. Ponadto białko to oddziałuje z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak FOXG1b i PAX9 [Roesch i wsp., 2008]. Ekspresja JARID1B jest wykrywana właśnie w subpopulacji komórek czerniaka, które dzielą się wolno, ale są niezbędne dla podtrzymania rozwoju nowotworu. Komórki czerniaka pozbawione JARID1B początkowo namnażają się szybciej, ale następnie wyczerpują potencjał do dalszego wzrostu. Ponadto ekspresja tego białka jest regulowana dynamicznie. Populacja komórek wywodzących się z tych JARID1B - pozytywnych przekształca się z czasem w populację zawierającą komórki wykazujące ekspresję JARID1B i komórki pozbawione tego białka [Roesch i wsp., 2010]. Wykazano, że traktowanie komórek czerniaka środkami chemoterapeutycznymi prowadzi do powiększenia subpopulacji powolnie dzielących się komórek JARID1B - pozytywnych. W komórkach tych stwierdzono zwiększoną ekspresję enzymów odpowiedzialnych za fosforylację oksydacyjną w mitochondriach. Inhibicja enzymów łańcucha oddechowego w komórkach czerniaka blokuje pojawianie się subpopulacji JARID1B - pozytywnej, co uwrażliwia nowotwór na stosowane leki [Roesch i wsp., 2013]. Po zapoznaniu się z pracami właśnie tego zespołu badawczego, sugerujących szczególną rolę JARID1B w rozwoju czerniaka oraz z szeregiem innych prac wskazujących na znaczenie czynników epigenetycznych w nowotworzeniu,

zmieniłem kierunek badań, które stały się skoncentrowane na ekspresji regulatorów procesów epigenetycznych w komórkach nowotworów.

RNF2 stanowi kluczowy element kompleksu PRC1 (ang. *Polycomb Repressive Complex 1*), ale może też funkcjonować w innych kompleksach białkowych. RNF2 wykazuje aktywność ligazy ubikwitynowej E3 dla lizyny 119 histonu H2A (H2AK119ub). Uważa się, że taka monoubikwitynacja histonu H2A ułatwia kontakt histonu H1 z nukleosomami, jak również reorganizację kompleksów białkowych powodującą zmiany konformacyjne polimerazy RNA II i represję genów [Vidal, 2009]. Ponadto RNF2 może dokonywać ubikwitynacji białka Ambra1, co prowadzi do hamowania procesu autofagii [Xia i wsp., 2014] oraz przyczyniać się do degradacji białka p53 poprzez jego ubikwitynację i/lub stabilizację białka Mdm2 w niektórych typach komórek [Su i wsp., 2013; Wen i wsp., 2014]. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* w komórkach czerniaka wykazano obecność przyłączonego białka RNF2 w pobliżu miejsc początku transkrypcji aż 3465 genów, spośród których 363 charakteryzowało się zmienioną (47% obniżoną i 53% podwyższoną) ekspresją. Wysoki poziom aktywnej ligazy RNF2 wspomagał inwazyjność komórek czerniaka i tworzenie przerzutów poprzez represję genu kodującego czynnik LTBP2 wiążący ligand TGF β . Z kolei stymulacja proliferacji komórek czerniaka z udziałem RNF2, ale niezależnie od jego aktywności ligazy, odbywała się poprzez aktywację genu kodującego cyklinę D2. Charakter regulacji ekspresji genów przez RNF2 wydaje się być uzależniony od istniejących wcześniej stanów chromatyny w promotorach tych genów [Rai i wsp., 2015].

Cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe był ukierunkowany na realizację trzech zasadniczych celów badawczych:

- 1) sprawdzenie, czy istnieje różnica w częstości i poziomie ekspresji COX-2, JARID1B i RNF2 oraz przestrzennej lokalizacji immunohistochemicznie wybarwionych komórek w reakcji wykrywania każdego z tych białek między łagodnymi a złośliwymi zmianami melanocytarnymi ze szczególnym uwzględnieniem tych typów, których diagnostyka różnicowa bywa najbardziej problematyczna,
- 2) zbadanie, czy poziom ekspresji COX-2, JARID1B i RNF2 w komórkach czerniaka może mieć znaczenie prognostyczne, a więc określenie zależności między częstością i poziomem ekspresji tych białek a okresem czasu przeżycia pacjentów z czerniakiem,
- 3) ocenę znaczenia doboru przeciwciał dla zastosowania ekspresji wybranych białek, jako potencjalne markery diagnostyczne i prognostyczne czerniaka skóry u człowieka. Dla oceny efektywności wykrywania COX-2 wykonano równoległe

badania z użyciem różnych typów przeciwciał specyficznych względem odmiennych fragmentów tego białka w różnym stopniu dostępnych w materiale utrwalanym w formalinie i zatapianym w parafinie. Z kolei w przypadku JARID1B użycie różnych typów przeciwciał pozwoliło na wykrywanie w komórkach całkowitej puli tego białka lub jednej z trzech znanych jego form powstających w wyniku alternatywnego składowania transkryptu.

Wykazałem znacząco wyższą ekspresję, zarówno COX-2, JARID1B, jak i RNF2 w komórkach czerniaków pierwotnych niż w komórkach znamion barwnikowych [Kuźbicki i wsp., 2012, 2013, 2016, 2018]. Z kolei najwyższy poziom każdego z tych białek wykryłem w przerzutach czerniaka [Kuźbicki i wsp., 2016a, 2017, 2018].

Ekspresja COX-2, JARID1B i RNF2, jako potencjalne markery użyteczne w diagnostyce różnicowej łagodnych i złośliwych melanocytarnych zmian skóry człowieka

W pracy Kuźbicki i wsp. (2012) przebadalem immunohistochemicznie ekspresję COX-2 w 46 znamionach i 30 czerniakach pierwotnych. Co istotne, 58,7% przypadków łagodnych zmian barwnikowych stanowiło grupę znamion Spitz, Reed i dysplastycznych, a pozostałe 41,3% przypadków znamion innych typów wybraliśmy z uwagi na ich cechy utrudniające postawienie jednoznacznej diagnozy. Z kolei grupa czerniaków obejmowała zmiany o małej grubości nacieku ($\leq 1,0$ mm) i/lub małym stopniu naciekania (Clark I i II). Dokonałem oceny skuteczności testu diagnostycznego odróżniania znamion od czerniaków, opartego na obliczaniu udziału procentowego komórek COX-2 - pozytywnych, w podobny sposób, jak w opublikowanej wcześniejszej pracy [Chwirot i Kuźbicki, 2007]. Określałem czułość (C), specyficzność (S) i wartość predykcyjną wyników dodatnich (PPV) dla kolejnych wartości progowych nasilenia ekspresji COX-2. Dla przedziału 5 - 24% komórek wybarwionych immunohistochemicznie uzyskałem następujące wartości parametrów diagnostycznych: $86,67 \leq C \leq 93,33\%$, $50,00 \leq S \leq 93,48\%$ i $54,90 \leq PPV \leq 89,66\%$ dla centrum oraz $73,33 \leq C \leq 96,67\%$, $63,04 \leq S \leq 95,65\%$ i $63,04 \leq PPV \leq 91,67\%$ dla brzegów zmian skóry. Dokonałem analizy krzywych ROC (ang. *receiver operating characteristics*) obrazujących zmienność czułości i specyficzności testu diagnostycznego dla poszczególnych wartości progowych udziału komórek COX-2 - pozytywnych. Miarą skuteczności testu diagnostycznego jest wartość pola powierzchni pod krzywą ROC (AUC, ang. *area under the ROC curve*). Test diagnostyczny uważany jest jako dobry, jeżeli $0,76 \leq AUC \leq 0,94$, a jako doskonały, jeżeli $0,95 \leq AUC \leq 1,00$ (www.anaesthetist.com/mnm/stats/roc). Wykazałem bardzo wysoką skuteczność testu diagnostycznego odróżniania znamion od czerniaków

będących we wczesnym stadium zaawansowania: dla centrum zmian $AUC = 0,95 \pm 0,03$, a dla brzegów $AUC = 0,94 \pm 0,03$. Podobne, wysokie wartości AUC uzyskałem dla testu diagnostycznego odróżniania czerniaków od grupy znamion Spitz, Reed i dysplastycznych: $0,93 \pm 0,03$ dla centrum i $0,92 \pm 0,04$ dla brzegu zmian. Wprowadzenie dodatkowego algorytmu oceny poziomu ekspresji COX-2, uwzględniającego oprócz udziału procentowego wybarwionych komórek również stopień ich wybarwienia, nie zwiększyło skuteczności testu diagnostycznego [Kuźbicki i wsp., 2012].

Komórki czerniaka zlokalizowane w coraz głębszych warstwach skóry charakteryzowały się coraz wyższą ekspresją COX-2. Wzrastał stopniowo nie tylko udział procentowy wszystkich wybarwionych immunohistochemicznie melanocytów, ale również tych charakteryzujących się intensywnym wybarwieniem. Znacząco silniejszą ekspresję COX-2 stwierdziłem w komórkach warstwy brodawkowej niż w melanocytach obserwowanych w naskórku. Natomiast w znamionach komórki zlokalizowane, zarówno w poszczególnych warstwach naskórka, jak i w warstwie siateczkowej skóry właściwej charakteryzowały się bardzo niską ekspresją COX-2. Wynik ten jest szczególnie istotny, biorąc pod uwagę fakt, że w niektórych znamionach wrzecionowatokomórkowych i nabłonkowatokomórkowych melanocyty obserwowane są w głębokich strefach skóry właściwej. Silniejsze barwienie obserwowałem w warstwie brodawkowej skóry właściwej [Kuźbicki i wsp., 2012]. Z kolei Minami i wsp. (2011) opisali podobny przestrzenny wzorec barwienia immunohistochemicznego COX-2 w czerniakach, natomiast w znamionach wykazali oni obniżającą się ekspresję tego białka w coraz głębszych strefach skóry. Co interesujące, Minami i wsp. (2011) nie stwierdzili różnic w intensywności barwienia COX-2, ani między znamionami Spitz a czerniakami (Clark II - V), ani między czerniakami szerzącymi się powierzchownie a łagodnymi zmianami melanocytarnymi. Natomiast w pracy Kuźbicki i wsp. (2012) wykazaliśmy różnice w ekspresji COX-2 między znamionami Spitz, Reed i dysplastycznymi a czerniakami, z których 66,7% przypadków stanowiły czerniaki szerzące się powierzchownie.

Opisano trzy warianty białka JARID1B powstające w wyniku alternatywnego składania transkryptu: RBBP2H1a, PLU-1 i RBP2-H1. Sekwencja białka PLU-1 zawiera 1544aa, a białko RBBP2H1a charakteryzuje się występowaniem dodatkowego fragmentu o długości 137aa na końcu N odpowiadającego części egzonu 1 genu. Fragment transkryptu, odpowiadający egzonowi 6, jest wycinany podczas splicingu w przypadku PLU-1 i RBBP2H1a, ale zostaje zachowany w formie JARID1B opisanej jako RBP2-H1. Ta ostatnia forma białka zawiera więc dodatkowy fragment długości 36aa zlokalizowany za pozycją 237aa w sekwencji białka [Barrett i

wsp., 2002; Roesch i wsp., 2005]. Istnieje więc możliwość niezależnego wykrywania formy RBP2-H1 oraz całkowitej puli białka JARID1B z użyciem specyficznych przeciwciał. Przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne z użyciem dwóch typów przeciwciał anty-JARID1B: Ab1 - skierowanych przeciwko fragmentowi 231-320aa formy RBP2-H1 oraz Ab2 - wykrywających odcinek 1494-1544aa na końcu C występujący we wszystkich trzech formach białka JARID1B [Kuźbicki i wsp., 2016].

Ekspresja JARID1B była wykrywalna w 24 z 27 znamion z użyciem przeciwciał Ab1, we wszystkich 27 łagodnych zmianach z użyciem Ab2 oraz we wszystkich przebadanych czerniakach pierwotnych i przerzutach z zastosowaniem obu typów przeciwciał. Biorąc pod uwagę udział procentowy immunohistochemicznie wybarwionych komórek oraz intensywność ich wybarwienia, najniższą ekspresję z użyciem Ab1 wykryłem w znamionach i ponad trzykrotnie wyższą w czerniakach pierwotnych [Kuźbicki i wsp., 2016]. Nasiloną ekspresję JARID1B wykrywana z użyciem Ab1 już w czerniakach o małej grubości (≤ 1 mm) i małym stopniu naciekania (Clark I i II) utrzymywała się podczas progresji nowotworu i była porównywalna, wysoka również w przerzutach czerniaka. Co istotne, 36,7% przebadanych w tej pracy zmian łagodnych stanowiła grupa znamion Spitz, Reed i dysplastycznych, a 59,3% czerniaków pierwotnych charakteryzowało się małym stopniem naciekania [Kuźbicki i wsp., 2013]. Ponadto w badaniach przeprowadzonych z użyciem przeciwciał Ab1 stwierdziłem, że test diagnostyczny oparty na obliczaniu udziału procentowego komórek JARID1B - pozytywnych pozwala na odróżnianie z dużą czułością i specyficznością znamion od czerniaków, zarówno w przypadku analizy centrum ($AUC = 0,98 \pm 0,02$), jak i brzegu zmian ($AUC = 0,98 \pm 0,02$), nawet wczesnych czerniaków ($AUC = 0,97 \pm 0,03$ - centrum i $0,97 \pm 0,03$ - brzeg) [Kuźbicki i wsp., 2013a].

Z kolei w badaniach przeprowadzonych z użyciem przeciwciał Ab2, średni udział procentowy melanocytów JARID1B - pozytywnych był tylko o około 10% wyższy niż w przypadku zastosowania Ab1, zarówno w centrum, jak i w brzegu czerniaków pierwotnych i przerzutów czerniaka. Natomiast w znamionach, średni udział wybarwionych komórek przekraczający 80% dla Ab2 był około czterokrotnie wyższy niż dla Ab1. Wyniki te wskazują, że dominującą formą białka JARID1B w komórkach czerniaków i przerzutów czerniaka jest RBP2-H1, a udział pozostałych dwóch form nie przekracza 10%. Z kolei w łagodnych zmianach melanocytarnych, udział RBP2-H1 wynosił około 20%, a znacznie wyższa wykrywalność białka JARID1B z użyciem przeciwciał Ab2 wskazuje na większy udział RBBP2H1a i/lub PLU-1 w melanocytach znamion [Kuźbicki i wsp., 2016].

Przestrzenna lokalizacja komórek wybarwionych immunohistochemicznie z użyciem przeciwciał Ab1 była podobna w znamionach i w czerniakach. Ekspresja JARID1B wzrastała stopniowo od warstwy ziarnistej naskórka do warstwy brodawkowatej skóry właściwej i ulegała nieznacznemu obniżeniu w warstwie siateczkowatej skóry właściwej [Kuźbicki i wsp., 2013]. Komórki czerniaka naciekające kolejne warstwy skóry oddziałują zapewne z nowym mikrośrodowiskiem, co może wpływać na ekspresję JARID1B [Fukunaga-Kalabis i wsp., 2011]. Jednakże w przypadku zmian łagodnych, białko JARID1B w komórkach zlokalizowanych w powierzchniowych warstwach naskórka było prawie niewykrywalne. Natomiast w czerniakach w warstwie ziarnistej stwierdziłem około 40%, a w warstwie kolczystej naskórka około 60% wybarwionych immunohistochemicznie melanocytów. Różnice te sugerują, że wzrost poziomu RBP2-H1 w czerniakach następuje już we wczesnym stadium rozwoju nowotworu i może być związany z zaburzeniem oddziaływania między melanocytami i keratynocytami w naskórku [Kuźbicki i wsp., 2013].

Wcześniej, jedynie Roesch i wsp. (2005) przeprowadzili badania immunohistochemiczne wykrywania JARID1B w melanocytarnych zmianach skóry człowieka z użyciem przeciwciał specyficznych dla formy RBP2-H1 tego białka. Przebadano 52 znamiona, 60 czerniaków pierwotnych i 60 przerzutów czerniaka w trzech mikromacierzach tkankowych (TMA) oraz 5 znamion, 4 czerniaki pierwotne i 5 przerzutów czerniaka w standardowych preparatach histopatologicznych. Wykazano silniejszą ekspresję JARID1B w znamionach niż w czerniakach. Wyniki te, oparte w znacznym stopniu na badaniach przeprowadzonych na TMA, są rozbieżne, zarówno z tymi opisanymi przez nas w pracy Kuźbicki i wsp. (2013), jak również z wynikami uzyskanymi przez Radberger i wsp. (2012), którzy używając przeciwciał podobnych do Ab1 wykryli białko JARID1B w 55% przypadków czerniaka oka.

W pracy Kuźbicki i wsp. (2018) przebadłem ekspresję RNF2 dla 9 znamion, 60 czerniaków pierwotnych i 24 przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych w standardowych preparatach histopatologicznych. We wszystkich przebadanych zmianach wykryłem pewien poziom RNF2. W łagodnych zmianach melanocytarnych średni udział procentowy wybarwionych immunohistochemicznie melanocytów wynosił około 40% i był porównywalny z tym obserwowanym w zdrowej skórze. Wykazałem istotny statystycznie wzrost ekspresji RNF2 do około 70% melanocytów RNF2 - pozytywnych w czerniakach pierwotnych oraz do około 80% w przerzutach czerniaka do węzłów chłonnych. Wśród komórek, w których wykryłem białko RNF2, wzrastał również udział tych o najbardziej intensywnym wybarwieniu. Udział procentowy melanocytów RNF2 - pozytywnych był istotnie statystycznie wyższy w czerniakach pierwotnych, nawet tych o małym stopniu naciekania (Clark I i II), niż w

łagodnych zmianach skóry. Wcześniej jedynie Rai i wsp. (2015) opublikowali pracę dotyczącą ekspresji RNF2 w nowotworach melanocytarnych skóry. W badaniach przeprowadzonych metodą immunohistochemiczną na TMA również stwierdzili najniższą ekspresję RNF2 w znamionach, silniejszą w czerniakach pierwotnych i najsilniejszą w przerzutach.

W licznych badaniach wykrywano również inne molekuly, jako potencjalne markery pomocne w odróżnianiu tych typów zmian skóry, których diagnostyka bywa szczególnie problematyczna. Nie wykazano znaczących różnic w ekspresji Melan-A [Bergman i wsp., 2000], c-kit [Isabel i Fitzpatrick, 2006], ani Akt [Kantrow i wsp., 2007] między czerniakami a znamionami Spitz. Clarke i wsp. (2009) stwierdzili silniejsze barwienie immunohistochemiczne Cdc7 w czerniakach inwazyjnych niż w znamionach dysplastycznych i znamionach Spitz. Jednakże ekspresja tego białka w czerniakach *in situ* była podobna jak w znamionach. W przypadku badań ekspresji WT1, barwienie obserwowano w 83% znamion Spitz, 35% znamion dysplastycznych oraz odpowiednio w 90% i 75% czerniaków w stadium T1 i T2 [Wilsher i Cheerale, 2007]. Rosner i wsp. (2009) zbadali skuteczność testu diagnostycznego opartego na udziale procentowym komórek wykazujących ekspresję białka WT1. Dla wartości progowych w przedziale 25 - 50% wybarwionych komórek uzyskano czułość w zakresie 61 - 71% i specyficzność 64 - 77%. Jednakże w 5 z 11 znamion Spitz obserwowano około 50% komórek WT1 - pozytywnych. Pryor i wsp. (2008) nie wykryli ekspresji IMP-3 w znamionach dysplastycznych. Chociaż stwierdzili silniejsze barwienie tego białka w przebadanych czerniakach niż w znamionach Spitz, to biorąc pod uwagę tylko czerniaki o grubości nacieku ≤ 1 mm, wyniki były porównywalne. Parente i wsp. (2008) obserwowali podobne barwienie immunohistochemiczne receptora Glut-3 w znamionach i czerniakach, a w przypadku receptora Glut-1 silniejszą ekspresję białka w znamionach niż w czerniakach. Co istotne, w przypadku znamion Spitz wzór ekspresji Glut-1 był pośredni między tym dla czerniaków i dla pozostałych znamion. Niemann i Argenyi (1993) obserwowali dosyć zróżnicowane barwienie PCNA w 60% znamion Spitz i wszystkich przebadanych czerniakach. Z kolei Nasr i El-Zammar (2008) wykazali znacznie silniejszą ekspresję pHH3, Ki-67 i surwiwiny w czerniakach (Clark II - IV, Breslow 0,3 - 20 mm) niż w znamionach dysplastycznych i znamionach Spitz. Garrido-Ruiz i wsp. (2010) zbadali immunohistochemicznie ekspresję 22 białek, jako potencjalne markery użyteczne w diagnostyce różnicowej znamion Spitz i czerniaków w fazie wzrostu pionowego. Silniejszą ekspresję w czerniakach niż w zmianach łagodnych wykryto dla HMB45, surwiwiny, Ki-67 i topoizomerazy II α , a niższą dla cykliny D1, p21, kaweoliny,

osteonektyny i PKC α . Natomiast nie wykazano istotnych różnic m.in. dla c-kit, Melan-A i WT1.

Trudności w identyfikacji użytecznego markera mogą wynikać nie tylko z braku różnic w immunohistochemicznie wykrywanej ekspresji danego białka między zmianami łagodnymi a złośliwymi, ale również z konieczności przyjęcia odpowiednich wartości progowych udziału procentowego wybarwionych komórek i/lub intensywności wybarwienia preparatów, które dawałyby jak najwyższe wartości parametrów diagnostycznych. Istotne jest również, aby zmiana poziomu markera w czerniakach, w stosunku do znamion, była wykrywalna już dla wczesnych stadiów nowotworu.

Wnioski:

- 1) Transformacji nowotworowej melanocytów towarzyszy znaczący wzrost ekspresji COX-2, RNF2 oraz poziomu formy RBP2-H1 białka JARID1B.**
- 2) Wysokie wartości parametrów diagnostycznych wskazują, że analiza poziomu immunohistochemicznie wykrywanych COX-2 i RBP2-H1 może być użyteczna w odróżnianiu łagodnych od złośliwych melanocytarnych zmian skóry człowieka.**
- 3) COX-2 i RBP2-H1 mogą być markerami pozwalającymi na odróżnianie z dużą czułością i specyficnością nawet znamion dysplastycznych, Spitz i Reed od czerniaków o małym stopniu naciekania.**

Prognostyczny potencjał ekspresji COX-2, JARID1B i RNF2 w czerniaku skóry u człowieka

Badania opisane w pracy Kuźbicki i wsp. (2016a) były ukierunkowane na analizę związku ekspresji COX-2 w komórkach czerniaka z najważniejszymi czynnikami prognostycznymi oraz z czasem przeżycia pacjentów z nowotworem. Wykazałem znacząco silniejszą ekspresję COX-2 w 41 przebadanych przerzutach czerniaka niż w 85 przypadkach zmian pierwotnych. W 36 przerzutach do węzłów chłonnych i w 5 przerzutach do skóry stwierdziłem porównywalny udział procentowy komórek COX-2 - pozytywnych. Jednakże w tej pierwszej grupie przerzutów większy był udział komórek o intensywnym wybarwieniu immunohistochemicznym. Analizując przestrzenną lokalizację komórek wykazujących ekspresję COX-2 w obrębie guza nowotworowego, udział procentowy wybarwionych komórek był coraz wyższy w coraz głębszych warstwach, w tym również komórek o intensywnym barwieniu. Poziom COX-2 był nieznacznie wyższy w centrum niż w brzegu czerniaków pierwotnych, a w przerzutach porównywalny w tych strefach zmian.

We wszystkich 39 przypadkach, w których czerniak pierwotny i przerzuty do węzłów chłonnych i/lub do skóry pochodziły od tego samego pacjenta, udział procentowy komórek COX-2 - pozytywnych był, albo niższy w zmianie pierwotnej niż w przerzutach, albo porównywalny, wysoki. Przerzuty w przebadanych przypadkach charakteryzowały się bardzo wysoką ekspresją COX-2, niezależnie od czasu przeżycia pacjenta.

Z kolei w czerniakach pierwotnych zbadałem, czy udział procentowy komórek COX-2 - pozytywnych, analizowany niezależnie lub w powiązaniu z intensywnością ich wybarwienia, ma znaczenie prognostyczne. Wykazałem, że pacjenci z czerniakiem o wysokiej ekspresji COX-2, a więc $\geq 70\%$ wybarwionych immunohistochemicznie komórek, charakteryzują się krótszym całkowitym czasem przeżycia ($\chi^2 = 44,64$; $P < 0,0001$ dla analizy centrum i $\chi^2 = 26,53$; $P < 0,0001$ dla brzegu guzów nowotworowych). Podobne wyniki analizy potencjału prognostycznego COX-2 uzyskano przyjmując wartość progową ≥ 100 opisanego w naszej pracy Kuźbicki i wsp. (2012) parametru uwzględniającego, zarówno udział procentowy, jak i intensywność immunohistochemicznego wybarwienia komórek ($\chi^2 = 62,80$; $P < 0,0001$ dla centrum i $\chi^2 = 37,00$; $P < 0,0001$ dla brzegu zmian skóry).

Ekspresja COX-2 była silnie, dodatnio skorelowana, zarówno ze stopniem ($r = 0,46$; $P < 0,0001$ dla centrum i $r = 0,47$; $P < 0,0001$ dla brzegu), jak i z grubością nacieku czerniaka ($r = 0,48$; $P < 0,0001$ dla centrum i $r = 0,50$; $P < 0,0001$ dla brzegu). W kolejnych stopniach naciekania w skali Clarka oraz przedziałach grubości guza w skali Breslowa wzrastał udział procentowy immunohistochemicznie wybarwionych komórek, a wśród nich również tych o najbardziej intensywnym barwieniu. Największe różnice w poziomie COX-2 stwierdziłem między czerniakami w III i IV stopniu naciekania w skali Clarka oraz między zmianami o grubości zawartej w przedziale $>2 - 4$ mm a tymi o grubości powyżej 4 mm, a dla brzegu zmian również między czerniakami o grubości wynoszącej najwyżej 2 mm a zmianami głębiej naciekającymi skórę. Ponadto wykazałem istotnie statystycznie silniejszą ekspresję COX-2 w czerniakach: z owrzodzeniem, o indeksie mitotycznym >1 mitoza/mm², guzowatych i będących w fazie wzrostu pionowego w porównaniu ze zmianami, odpowiednio: bez owrzodzenia, o indeksie mitotycznym ≤ 1 mitoza/mm², szerzącymi się powierzchownie i będącymi w fazie wzrostu poziomego. Podobne wyniki uzyskałem w przypadku analizy wartości udziału procentowego komórek COX-2 - pozytywnych oraz wartości parametru uwzględniającego również intensywność immunohistochemicznego wybarwienia komórek.

Wyniki opublikowane w naszej pracy Kuźbicki i wsp. (2016a) wskazują, że inwazyjności oraz nabywaniu przez komórki czerniaka pierwotnego potencjału do

generowania przerzutów towarzyszy znaczący wzrost ekspresji COX-2. Jest on skorelowany z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi, a zwłaszcza z krótszym czasem przeżycia pacjentów. Uzyskałem porównywalne wyniki analizy barwienia immunohistochemicznego, wykonanej z zastosowaniem dwóch algorytmów: opartego na obliczaniu udziału procentowego komórek COX-2 - pozytywnych niezależnie od stopnia ich wybarwienia oraz opartego na obliczaniu wartości parametru uwzględniającego udział procentowy komórek i intensywność ich wybarwienia. Podobnie, jak wykazaliśmy w pracy Kuźbicki i wsp. (2012), obliczanie samego udziału procentowego immunohistochemicznie wybarwionych komórek wydaje się być optymalnym algorytmem w przypadku zastosowania COX-2, jako markera czerniaka skóry. Drugi algorytm opisany w naszej pracy Kuźbicki i wsp. (2016a) jest inny od sposobu wyznaczania przez Becker i wsp. (2009) wartości SI oraz określania progów dla przypadków COX-2 - pozytywnych przez Minisini i wsp. (2013) na podstawie jednoczesnej analizy udziału procentowego i stopnia wybarwienia komórek. Tym niemniej wyniki opisane przez nas w pracy Kuźbicki i wsp. (2016a) są w ogólności zgodne opisanymi przez tamtych autorów, jak również z wynikami Meyer i wsp. (2009), którzy wykonali badania na TMA i poziom ekspresji COX-2 analizowali na podstawie intensywności barwienia immunohistochemicznego komórek. Ponadto w pracy Kuźbicki i wsp. (2016a) stwierdziliśmy, że w przerzutach czerniaka poziom ekspresji COX-2 analizowany z użyciem obu algorytmów nie jest skorelowany z czasem przeżycia pacjentów. Podobne wyniki uzyskali Meyer i wsp. (2009), a Johansson i wsp. (2009) wykazali prognostyczne znaczenie ekspresji COX-2 w przerzutach czerniaka do węzłów chłonnych, ale w sposób znaczący tylko w przypadku analizy udziału procentowego wybarwionych komórek.

Prognostyczny potencjał ekspresji COX-2 potwierdza w naszej pracy Kuźbicki i wsp. (2016a) również jej zwiększony lub pozostający wysoki poziom w przerzutach czerniaka w porównaniu z nowotworami pierwotnymi pochodzącymi od tych samych 39 pacjentów. Podobnie Becker i wsp. (2009) wykazali korelację między analizowanym z użyciem parametru SI barwieniem COX-2 w 13 czerniakach pierwotnych i ekspresją tego białka w 28 przerzutach wykrywanych u tych samych pacjentów w węzłach chłonnych, skórze i mózgu. W 12 przypadkach wykryto ekspresję COX-2 w czerniakach i przerzutach, a w jednym nie obserwowano barwienia, ani w zmianie pierwotnej, ani w dwóch przerzutach do węzłów chłonnych. Natomiast rozbieżne wyniki uzyskali Lee i wsp. (2008), którzy zbadali ekspresję COX-2 w czerniakach i przerzutach tych nowotworów od 6 pacjentów i stwierdzili intensywne barwienie tylko w 2 zmianach pierwotnych.

Publikacja [Kuźbicki i wsp., 2016a] stanowi istotne rozszerzenie badań zapoczątkowanych przez nas wcześniej [Kuźbicki i wsp., 2006] i również w tej pracy wykazaliśmy, że w czerniakach pierwotnych poziom COX-2 jest dodatnio i silnie skorelowany z najważniejszymi czynnikami prognostycznymi ocenianymi histopatologicznie, takimi jak: stopień i grubość nacieku, obecność owrzodzenia, indeks mitotyczny, a także z typem histologicznym, fazą wzrostu. Podobnie jak Meyer i wsp. (2009) wykazaliśmy, z zastosowaniem drugiego algorytmu uwzględniającego także intensywność barwienia, nieco silniejszą ekspresję COX-2 w przerzutach czerniaka do węzłów chłonnych niż w przerzutach do skóry. W pracy Meyer i wsp. (2009) opisano również korelację intensywności barwienia COX-2 ze stopniem naciekania czerniaka skali Clarka, ale nie z grubością nacieku w skali Breslowa, typem histologicznym, ani z indeksem mitotycznym. Co ciekawe, Becker i wsp. (2009) wykazali, że wartość parametru SI uwzględniającego udział komórek COX-2 - pozytywnych i intensywność barwienia jest skorelowana z grubością nacieku czerniaka. Inaczej niż w naszej pracy Kuźbicki i wsp. (2016a), nie wykazano takiej zależności w przypadku analizy samego udziału procentowego wybarwionych komórek. Ponadto stwierdzono różnice w wartości parametru SI między czerniakami w II i III stopniu naciekania w skali Clarka, ale była ona porównywalna w poszczególnych typach histologicznych czerniaka [Becker i wsp., 2009]. Wykazane przez nas w publikacji Kuźbicki i wsp. (2016a) różnice w ekspresji COX-2 między czerniakami w III i IV stopniu naciekania oraz o grubości większej i mniejszej niż 2 mm są spójne z tym, że czerniaki w fazie wzrostu poziomego charakteryzowały się słabszym barwieniem niż te w fazie wzrostu pionowego. Podobnie, jak w naszej pracy Kuźbicki i wsp. (2016a), również Minisini i wsp. (2013) opisali związek podwyższonej ekspresji COX-2 z grubością nacieku w skali Breslowa oraz z indeksem mitotycznym.

Aby ocenić prognostyczny potencjał ekspresji JARID1B w czerniaku, przeprowadziliśmy badania wykrywania w komórkach całkowitej puli tego białka oraz jednej z jego form RBP2-H1 [Kuźbicki i wsp., 2017]. Dla każdego z 31 przypadków czerniaka pierwotnego i 17 przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych wykonałem reakcje immunohistochemiczne z użyciem takich samych przeciwciał Ab1 i Ab2, jak w opublikowanej wcześniej pracy [Kuźbicki i wsp., 2016]. Wykazałem silniejszą ekspresję JARID1B w przerzutach czerniaka niż w pochodzących od tych samych pacjentów nowotworach pierwotnych, a różnice te były istotne statystycznie, zarówno dla Ab1, jak i dla Ab2. Udział procentowy komórek RBP2-H1 - pozytywnych był tylko nieznacznie niższy w porównaniu z udziałem komórek, w których wykrywano jednocześnie wszystkie warianty białka JARID1B [Kuźbicki i wsp., 2017]. Wskazuje

to, że dominującą formą białka JARID1B w komórkach czerniaka skóry jest RBP2-H1, co jest zgodne z wynikami opublikowanymi wcześniej [Kuźbicki i wsp., 2016]. W komórkach zlokalizowanych w coraz głębszych warstwach skóry wzrastał stopniowo poziom ekspresji JARID1B wykrywanej z użyciem Ab1 oraz Ab2, co jest w dużym stopniu zbieżne z obserwacjami opisanymi w naszej pracy Kuźbicki i wsp. (2013), skoncentrowanej na badaniach RBP2-H1.

Nie stwierdziłem istotnej statystycznie korelacji poziomu całkowitej puli białka JARID1B w komórkach czerniaka z prognozami dla pacjentów. Wykazałem natomiast, że wysoki, wynoszący $\geq 90\%$, udział komórek RBP2-H1 - pozytywnych obserwowanych w centrum czerniaka pierwotnego jest związany z krótszym całkowitym czasem przeżycia pacjentów ($\chi^2 = 4,14$; $P = 0,04$). Pacjenci z czerniakiem o wysokim poziomie białka RBP2-H1 w obrębie guza byli obarczeni większym ryzykiem zgonu (HR = 2,18; 95% CI: 1,04 - 7,36). Mediana czasu przeżycia pacjentów z czerniakiem o niskiej (<90% wybarwionych komórek) ekspresji JARID1B wykrywanej z użyciem przeciwciał Ab1 wynosiła 98 miesięcy, a w przypadku pacjentów z nowotworem charakteryzującym się wysokim poziomem RBP2-H1 ($\geq 90\%$ wybarwionych komórek) mediana czasu przeżycia wynosiła tylko 28 miesięcy. Ekspresja JARID1B wykrywana z użyciem przeciwciał Ab1 lub Ab2 nie była skorelowana z czynnikami prognostycznymi dla czerniaka, takimi jak: grubość nacieku w skali Breslowa, stopień naciekania w skali Clarka, owrzodzenie, indeks mitotyczny, faza wzrostu i liczba węzłów chłonnych z przerzutami nowotworu. Przeprowadzenie analizy wieloczynnikowej wykazało, że ekspresja RBP2-H1 jest markerem prognostycznym niezależnym do wymienionych klinicznych i patologicznych cech nowotworu [Kuźbicki i wsp., 2017]. W pracy tej po raz pierwszy w skali światowej przeprowadziliśmy badania ekspresji JARID1B w komórkach czerniaka skóry w powiązaniu z czasem przeżycia pacjentów z nowotworem. W czerniaku oka Radberger i wsp. (2012) stwierdzili, że wzrost poziomu białka JARID1B, wykrywanego z użyciem przeciwciał podobnych do Ab1, jest związany z krótszym czasem przeżycia pacjentów, ale wyniki te nie były istotne statystycznie.

Kontynuując badania regulatorów procesów epigenetycznych w komórkach czerniaka, dokonałem analizy zmian ekspresji RNF2 podczas progresji tego nowotworu oraz ich związku z czasem przeżycia pacjentów [Kuźbicki i wsp., 2018]. Białko to wykrywałem metodą immunohistochemiczną w standardowych preparatach histopatologicznych wykonanych z 60 czerniaków pierwotnych i 24 przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych. Wykazałem znacząco większy udział procentowy komórek RNF2 - pozytywnych, również tych intensywnie wybarwionych, w przerzutach niż w zmianach pierwotnych.

Co interesujące, zarówno w czerniakach pierwotnych, jak i w przerzutach, niska ekspresja RNF2 była związana z krótszym czasem przeżycia pacjentów, a efekt ten był silniejszy w przypadku zmian pierwotnych. Wyniki te uzyskałem przyjmując wartość progową immunohistochemicznie wybarwionych komórek wynoszącą 70% w czerniakach pierwotnych i 75% w przerzutach. Korzystne znaczenie prognostyczne podwyższonej ekspresji RNF2 w komórkach czerniaka było szczególnie ewidentne biorąc pod uwagę udział procentowy wybarwionych immunohistochemicznie komórek ($\chi^2 = 8,38$; $P = 0,004$ dla czerniaków pierwotnych i $\chi^2 = 4,11$; $P = 0,04$ dla przerzutów), a w przypadku analizy wartości parametru opisanego w naszej pracy [Kuźbicki i wsp., 2012], uwzględniającego również intensywność wybarwienia komórek, wyniki były istotne statystycznie jedynie dla zmian pierwotnych ($\chi^2 = 7,22$; $P = 0,007$ dla wartości progowej parametru wynoszącej 110). Pacjenci z czerniakiem wykazującym obniżony udział procentowy komórek RNF2 - pozytywnych charakteryzowali się większym ryzykiem zgonu (jeżeli <70% w obrębie guza pierwotnego, to HR = 2,50; 95% CI: 1,41 - 5,97; jeżeli <75% w przerzucie nowotworu, to HR = 2,78; 95% CI: 1,06 - 30,74). Mediana czasu przeżycia pacjentów z czerniakiem pierwotnym o wysokiej ekspresji RNF2 wynosiła 143 miesiące, a w przypadku obniżonego poziomu tego białka, tylko 27 miesięcy. Z kolei pacjenci z przerzutami czerniaka charakteryzowali się medianą czasu przeżycia równą 33 lub 15 miesięcy, odpowiednio w przypadku wysokiego lub niskiego udziału komórek nowotworowych RNF2 - pozytywnych obserwowanych w węzłach chłonnych. Ponadto przeprowadziłem wieloczynnikową analizę korelacji ekspresji RNF2 i całkowitego czasu przeżycia pacjentów oraz ich płci, wieku i stosowanej po zabiegu chirurgicznym chemo-, radio- lub immunoterapii. Wykazałem, że obniżona ekspresja RNF2 jest niezależnym, niekorzystnym wskaźnikiem prognostycznym dla pacjentów z czerniakiem skóry [Kuźbicki i wsp., 2018].

Ponadto stwierdziłem coraz niższą ekspresję RNF2 w komórkach czerniaków pierwotnych wraz ze wzrostem liczby węzłów chłonnych z przerzutami występującymi u tych samych pacjentów. Chociaż różnice w udziale procentowym wybarwionych komórek zmiany pierwotnej były niewielkie między kolejnymi stopniami zaawansowania choroby od N0 do N3 według klasyfikacji TNM, uzyskałem istotną statystycznie, ujemną wartość współczynnika korelacji ($r = -0,31$; $P = 0,02$). Jednakże zmiany ekspresji RNF2 w czerniakach pierwotnych były niezależne od czynników prognostycznych, takich jak: owrzodzenie guza, indeks mitotyczny, typ histologiczny i faza wzrostu [Kuźbicki i wsp., 2018].

Natomiast Rai i wsp. (2015) stwierdzili, w oparciu o dane TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*), że podwyższony poziom RNF2 jest związany z mniejszą

przeżywalnością pacjentów z czerniakiem. Teza tych autorów, postawiona na podstawie wyników badań przeprowadzonych metodami biologii molekularnej, wydaje się być dyskusyjna z powodu analizy czerniaków pierwotnych i przerzutów jako jednej grupy oraz nierozróżniania sytuacji amplifikacji genu *RNF2* (12 przypadków) od wykrycia jego wzmożonej ekspresji na poziomie transkryptu (18 przypadków). Te same wyniki wskazują na efekt skrócenia czasu przeżycia pacjentów z czerniakiem odpowiednio w 2 i 4 przypadkach delecji i/lub obniżenia ekspresji *RNF2* w porównaniu z grupą 44 ze 104 przypadków, w których nie stwierdzono zmian liczby kopii i/lub ekspresji genu. Z kolei w badaniach przeprowadzonych metodą immunohistochemiczną na TMA wykazano silniejszą ekspresję *RNF2* w przerzutach czerniaka niż w czerniakach pierwotnych. Wyniki te uzyskano na podstawie przypisanych ocen obserwowanej intensywności wybarwienia skrawków TMA.

Podobnie jak Rai i wsp. (2015), w pracy Kuźbicki i wsp. (2018) stwierdziliśmy wzrost poziomu ekspresji białka *RNF2* w przerzutach w porównaniu ze zmianami pierwotnymi. Jednakże w przeciwieństwie do badań przeprowadzonych *in vitro* w tamtej pracy, w której białko *RNF2* przypisywana jest rola wspomagająca proliferację komórek czerniaka i tworzenie przerzutów, wyniki naszych badań Kuźbicki i wsp. (2018) wskazują, że wzmożona ekspresja *RNF2* zdaje się hamować postęp choroby i poprawia rokowania części pacjentów. Podwyższony poziom *RNF2* może być korzystnym wskaźnikiem prognostycznym dla pacjentów z czerniakiem, zarówno w stadium zmiany pierwotnej, jak i w stadium tworzenia przerzutów nowotworu.

Wnioski:

- 1) Podwyższona ekspresja COX-2 i RBP2-H1 oraz obniżona ekspresja RNF2 w komórkach czerniaka są związane z krótszym czasem przeżycia pacjentów i mogą być użyteczne, jako markery prognostyczne.**
- 2) Ekspresja COX-2 jest dodatnio skorelowana z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi ocenianymi histopatologicznie w czerniaku pierwotnym, zwłaszcza z dużą grubością nacieku, obecnością owrzodzenia i wysokim indeksem mitotycznym.**
- 3) W ocenie ekspresji JARID1B, jako markera prognostycznego, istotna jest analiza poziomu formy RBP2-H1 zamiast całkowitej puli tego białka w komórkach czerniaka skóry.**

Analiza warunków efektywności immunohistochemicznego wykrywania COX-2, jako diagnostycznego i prognostycznego markera czerniaka skóry

Dane literaturowe dotyczące ekspresji COX-2, wykrywanej w melanocytarnych zmianach skóry człowieka, są w pewnym stopniu rozbieżne. Różnice w wykrywalności tego białka przejawiają się odmienną częstością i poziomem barwienia immunohistochemicznego opisywanymi przez poszczególne grupy badawcze. Vogt i wsp. (2001) nie wykryli białka COX-2 w żadnym z 38 czerniaków pierwotnych, 14 przerzutów czerniaka oraz 23 znamion różnych typów. Denkert i wsp. (2001) stwierdzili ekspresję COX-2 w 26 z 28 przebadanych czerniaków, a w 19 przypadkach tych zmian złośliwych obserwowali umiarkowane lub silne barwienie, przy jego braku w 4 znamionach. Goulet i wsp. (2003) nie wykryli obecności białka COX-2 w żadnym z 17 czerniaków pierwotnych ani 10 znamion, natomiast obserwowali bardzo silne barwienie immunohistochemiczne we wszystkich 16 przerzutach czerniaka. Sun i wsp. (2004) w badaniach przeprowadzonych na TMA stwierdzili wyższą ekspresję COX-2 w czerniakach zaliczonych do grupy zmian o dużym stopniu inwazyjności niż w tych mających cechy wskazujące na mniejszą inwazyjność. W badaniach Kuźbicki i wsp. (2006) obejmujących 36 czerniaków pierwotnych, 11 przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych oraz 17 znamion wykryliśmy bardzo niski poziom ekspresji COX-2 w łagodnych zmianach, znacząco wyższy w czerniakach i najwyższy w przerzutach. Bianchini i wsp. (2007) stwierdzili obecność komórek COX-2 - pozytywnych w 11 z 15 czerniaków pierwotnych oraz w 4 z 7 przerzutów czerniaka, natomiast białko to nie było wykrywalne w komórkach żadnego z 5 znamion. Lee i wsp. (2008) obserwowali barwienie COX-2 we wszystkich przebadanych zmianach skóry, ale zostało ono ocenione jako silne w 12 z 32 czerniaków pierwotnych, 20 z 29 przerzutów czerniaka i 1 z 38 łagodnych zmian. Z kolei Johansson i wsp. (2009) wykazali ekspresję COX-2 tylko w 11 z 38 przypadków przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych. Becker i wsp. (2009) obserwowali silne barwienie COX-2 w 96 ze 101 przebadanych czerniaków.

Jedną z przyczyn rozbieżności wyników immunohistochemicznego wykrywania molekuł może stanowić różnica w specyficzności używanych przeciwciał [np. Sawicka i wsp., 2013], zwłaszcza w przypadku badań wykonywanych w preparatach utrwalanych w formalinie i zatapiających w parafinie. W pracy Kuźbicki i wsp. (2009) przeprowadziliśmy badania wykrywalności białka COX-2 w 18 znamionach, 17 czerniakach pierwotnych i 2 przerzutach czerniaka z użyciem trzech typów przeciwciał pierwotnych specyficznych względem różnych epitopów tego białka. Dla każdej z tych zmian równolegle wykonałem reakcje immunohistochemiczne z zastosowaniem następujących przeciwciał anti-COX-2: Ab1 - specyficzne względem

peptydu mapowanego we fragmencie na końcu N białka COX-2, Ab2 - wykrywające odcinek na końcu C (368-604aa), który odpowiada fragmentowi domeny katalitycznej białka oraz Ab3 - skierowane przeciwko fragmentowi zlokalizowanemu w pobliżu końca N białka COX-2 (38-163aa), który odpowiada domenie podobnej do naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), domenie wiążącej białko z błoną (MBD) oraz krótkiemu odcinkowi domeny katalitycznej. Wykrywanie białka COX-2 z użyciem przeciwciał Ab1 opisaliśmy w pracach Kuźbicki i wsp. (2006, 2012, 2016a) oraz Chwirot i Kuźbicki (2007), Ab2 użyli Denkert i wsp. (2001), Vogt i wsp. (2001) oraz Johansson i wsp. (2009), a wyniki uzyskane z zastosowaniem Ab3 opublikowali Becker i wsp. (2009) oraz Minami i wsp. (2011).

W znamionach ekspresja COX-2 badana z użyciem przeciwciał Ab1 i Ab2 w melanocytach zlokalizowanych w obrębie naskórka była niska lub niewykrywalna. Z kolei udział komórek COX-2 - pozytywnych wykrytych z zastosowaniem przeciwciał Ab3 był umiarkowany, ale miał heterogeny charakter. We wszystkich tych przypadkach łagodnych zmian, w których melanocyty zlokalizowane były w skórze właściwej, komórki znamieniowe tam obserwowane charakteryzowały się barwieniem z użyciem Ab3, a w większości z tych przypadków również z użyciem Ab1 i Ab2. Jednakże spośród komórek COX-2 - pozytywnych stwierdzanych w znamionach, większość charakteryzowała się niską intensywnością wybarwienia. Natomiast w czerniakach, w coraz głębszych warstwach skóry wzrastał stopniowo udział procentowy komórek wykazujących ekspresję COX-2 wykrywaną z użyciem każdego z trzech typów przeciwciał. Wśród tych komórek wzrastał również udział intensywnie wybarwionych, zwłaszcza w przypadku użycia Ab1 [Kuźbicki i wsp., 2009].

Średni udział procentowy komórek COX-2 - pozytywnych, wykrytych z użyciem poszczególnych typów przeciwciał, był zróżnicowany w znamionach oraz w czerniakach pierwotnych. Wykazałem niższy poziom tego białka dla przeciwciał Ab2 niż dla Ab1 lub Ab3 w każdej z tych dwóch grup zmian skóry, a różnice te były istotne statystycznie, zarówno w przypadku analizy obszarów centralnych, jak i brzeżnych. Wartości średniego udziału wybarwionych immunohistochemicznie melanocytów z użyciem przeciwciał Ab1 i Ab3 się różniły. Jednakże różnice te były istotne statystycznie dla znamion, ale nieistotne dla czerniaków pierwotnych. Z kolei w przerzutach czerniaka, stwierdziłem porównywalne wyniki ekspresji COX-2 wykrytej z zastosowaniem tych przeciwciał. Biorąc pod uwagę wszystkie przebadane zmiany, najsilniejszą korelację wartości średniego udziału melanocytów COX-2 - pozytywnych wykazałem między wynikami uzyskanymi z użyciem Ab1 i Ab3 ($r = 0,91$ dla centrum i $r = 0,89$ dla brzegu zmian; $P < 0,05$), niższą między Ab1 i Ab2 ($r = 0,83$ - centrum i

$r = 0,81$ - brzeg; $P < 0,05$) oraz Ab2 i Ab3 ($r = 0,80$ - centrum i $r = 0,79$ - brzeg; $P < 0,05$) [Kuźbicki i wsp., 2009].

W zdrowej skórze, przyległej do znamion i czerniaków pierwotnych, obserwowałem barwienie immunohistochemiczne keratynocytów warstwy ziarnistej i powierzchniowej strefy warstwy kolczystej naskórka. Co interesujące, o ile wyniki wykrywania COX-2 uzyskane z użyciem wszystkich trzech przeciwciał pierwotnych różniły się dla melanocytów znamion i czerniaków, dla keratynocytów uzyskałem bardzo zbieżne wyniki wybarwienia około 40% tych nabłonkowych komórek [Kuźbicki i wsp., 2009].

W pracy Kuźbicki i wsp. (2014) przeprowadziliśmy porównawcze badania wykrywalności ekspresji COX-2 w łagodnych i złośliwych melanocytnych zmianach skóry człowieka na TMA oraz na standardowych preparatach histopatologicznych. Trzy TMA zawierały skrawki wykonane łącznie z: 28 znamion, 94 czerniaków pierwotnych, 32 przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych, zdrowej skóry od 8 pacjentów oraz dodatkowo z 2 raków podstawnokomórkowych i 2 raków kolczystokomórkowych skóry. Z kolei w standardowych preparatach przebadłem: 41 znamion, 43 czerniaki pierwotne i 8 przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych. Dla każdego przypadku tych zmian skóry przeprowadziłem reakcje immunohistochemiczne wykrywania COX-2 równolegle z użyciem przeciwciał Ab1 i Ab2 opisanych w opublikowanej wcześniej pracy [Kuźbicki i wsp., 2009].

Uzyskane wartości udziału procentowego komórek COX-2 - pozytywnych wykrytych z użyciem Ab1 i Ab2 różniły się, zarówno w przypadku zmian przebadanych na TMA, jak i tych na standardowych preparatach. Jednakże tylko w przypadku wyników wykazanych na TMA z zastosowaniem obu typów przeciwciał ich analiza mogła doprowadzić do rozbieżnych wniosków dotyczących potencjału diagnostycznego i prognostycznego ekspresji COX-2. W badaniach przeprowadzonych na standardowych preparatach, z użyciem każdego z tych dwóch typów przeciwciał, stwierdziłem większy udział procentowy wybarwionych immunohistochemicznie komórek w czerniakach pierwotnych niż w znamionach, największy w przerzutach czerniaka, a różnice te były istotne statystycznie. Wykryłem silniejszą ekspresję COX-2 w przypadku zastosowania Ab1 na TMA niż na standardowych preparatach. Z kolei poziom tego białka w badaniach przeprowadzonych z użyciem przeciwciał Ab2 na TMA był znacznie niższy niż w przypadku zastosowania Ab1 na TMA lub obu typów przeciwciał na standardowych preparatach. W niektórych skrawkach TMA stwierdziłem ekspresję COX-2 tylko w pojedynczych komórkach lub była ona niewykrywalna dla Ab2. Wykazałem wyższy udział procentowy wybarwionych immunohistochemicznie komórek w czerniakach

pierwotnych niż w znamionach, ale jego wzrost w przerzutach czerniaka nie był już istotny statystycznie. Niską czułość wykrywania białka COX-2 z zastosowaniem Ab2 na TMA potwierdziłem w badaniach przeprowadzonych w zdrowej skórze. Barwienie immunohistochemiczne keratynocytów warstwy ziarnistej i powierzchniowej strefy warstwy kolczystej naskórka, podobnie jak w naszych pracach Kuźbicki i wsp. (2006, 2009, 2012, 2016a) oraz Chwirot i Kuźbicki (2007), wykazałem na standardowych preparatach z użyciem obu typów przeciwciał anty-COX-2, ale na TMA tylko z użyciem Ab1. W skrawkach zdrowej skóry w TMA, ekspresja COX-2 była niewykrywalna z zastosowaniem przeciwciał Ab2. Ponadto udział procentowy melanocytów COX-2 - pozytywnych, w tym komórek o intensywnym wybarwieniu, wzrastał wraz z coraz większą grubością nacieku nowotworu w skali Breslowa, co wykazano w badaniach przeprowadzonych z użyciem przeciwciał Ab1 i Ab2 na standardowych preparatach oraz Ab1 na TMA. Natomiast w przypadku niskiej ekspresji COX-2 wykrywalnej z zastosowaniem Ab2 na TMA nie stwierdziłem takiej korelacji z grubością guza [Kuźbicki i wsp., 2014].

Wyniki opublikowane w naszych pracach Kuźbicki i wsp. (2009, 2014) mogą wskazywać, że różne fragmenty białka COX-2 są w różnym stopniu dostępne dla przeciwciał w materiale utrwalanym w formalinie i zatapianym w parafinie. Biorąc pod uwagę fakt, że reakcje immunohistochemiczne wykonywałem również na TMA, procedura przygotowania materiału może mieć bardzo istotne znaczenie dla zachowania struktury białka COX-2 i/lub jego dostępności szczególnie w przypadku użycia przeciwciał Ab2. Poszczególne epitopy białka mogą wykazywać zróżnicowaną wrażliwość np. na podwyższoną temperaturę stosowaną podczas przetwarzania materiału zatapianego w parafinie lub odzyskiwania antygenowości tkanek po odparafinowaniu skrawków. W przypadku zastosowania ekspresji COX-2, jako immunohistochemicznego markera diagnostycznego i prognostycznego czerniaka, niezbędny jest wybór przeciwciał i procedury wykrywania białka zapewniających wysoką czułość i specyficzność w badaniach wykonywanych w materiale utrwalanym w formalinie i zatapianym w parafinie. Najniższą czułość wykrywania COX-2 stwierdziłem dla przeciwciał Ab2 skierowanych przeciwko sekwencji aminokwasów mapowanej w pobliżu końca C białka, odpowiadającej fragmentowi jego domeny katalitycznej. Z kolei przeciwciała Ab1 i Ab3, wykrywające fragmenty zlokalizowane w pobliżu końca N białka COX-2, charakteryzowały się większą czułością. W badaniach ekspresji COX-2, jako markera czerniaka, najlepszym wyborem wydaje się być zastosowanie przeciwciał Ab1, w drugiej kolejności Ab3, natomiast użycie przeciwciał Ab2 nie zapewnia odpowiedniej czułości wykrywania tego białka.

Uzyskanie wyższych wartości udziału procentowego melanocytów COX-2 - pozytywnych, wykrywanych z zastosowaniem Ab1 na TMA niż na standardowych preparatach opisanych w naszej publikacji Kuźbicki i wsp. (2014), może wynikać z faktu, że większość skrawków TMA zawierała fragmenty skóry właściwej z komórkami badanych zmian i większość z czerniaków charakteryzowała się grubością nacieku powyżej 4 mm. Nasiloną ekspresję COX-2 w komórkach tych nowotworów, zlokalizowanych w głębokich strefach skóry, zwłaszcza w centrum zmian, stwierdziliśmy też wcześniej [Kuźbicki i wsp., 2006, 2009]. W naszej pracy Kuźbicki i wsp. (2014), 100 przebadanych zmian skóry było reprezentowanych przez 1 skrawek o średnicy 1 mm, natomiast 60 przypadków przez 2 skrawki o średnicy 1,5 mm, a tylko 6 przypadków przez 4 skrawki o średnicy 1,5 mm. Pacifico i wsp. (2004) porównali wykrywalność cząsteczki adhezyjnej komórek czerniaka (MCAM) analizowaną w skrawkach TMA o średnicy 0,6 mm oraz w standardowych preparatach wykonanych z 30 czerniaków pierwotnych. Wykazano 56,7% i 70% zgodności oceny samego wykrycia MCAM oraz 43% i 53,3% zgodności oceny intensywności barwienia immunohistochemicznego, odpowiednio dla 1 skrawka i 2 skrawków TMA. Wartości te przekraczały 90% dopiero w przypadku porównania wyników dla 4 skrawków TMA z tymi dla standardowych preparatów. Z kolei Jensen i wsp. (2011) przeprowadzili analizę porównawczą wykrywalności 6 białek na TMA z 4 skrawkami o średnicy 1 mm dla każdego z 34 przypadków czerniaka pierwotnego oraz na standardowych preparatach wykonanych z tych zmian skóry. Dla wyników immunohistochemicznych badań ekspresji CD8 i CD163, wartości współczynnika κ , będącego miarą zgodności ocen w TMA i w standardowych preparatach, wynosiły od 0,42 do 0,65, a dla MITF, kadheryny N, MCAM i CD117 wartości κ były zawarte w zakresie od 0,31 do 0,82. Pojedyncze skrawki TMA mogą nie być więc reprezentatywne dla poszczególnych przypadków nowotworów. Wiadomo bowiem, że w obrębie heterogennego guza poszczególne subpopulacje komórek mają różny charakter.

Wnioski:

- 1) Dla zachowania optymalności parametrów testu diagnostycznego odróżniania łagodnych od złośliwych melanocytarnych zmian skóry oraz oceny inwazyjności czerniaka w oparciu o poziom ekspresji COX-2 istotne znaczenie ma dobór odpowiedniego typu przeciwciał.**
- 2) Największą czułość wykrywania białka COX-2 w standardowych preparatach histopatologicznych utrwalanych w formalinie i zatapianych w parafinie pozwala osiągnąć zastosowanie przeciwciał specyficznych względem fragmentu zlokalizowanego na końcu N tego białka.**

Literatura:

- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-6206.
- Barnhill RL, Busam KJ. *Pathology of Melanocytic Nevi and Malignant Melanoma*. Boston; Butterworth-Heinemann, 1995.
- Barrett A, Madsen B, Copier J, Lu PJ, Cooper L, Scibetta AG, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J. PLU-1 nuclear protein, which is upregulated in breast cancer, shows restricted expression in normal human adult tissues: a new cancer/testis antigen? *Int J Cancer* 2002; 101: 581-588.
- Becker MR, Siegelin MD, Rompel R, Enk AH, Gaiser T. COX-2 expression in malignant melanoma: a novel prognostic marker? *Melanoma Res* 2009; 19: 8-16.
- Bergman R, Azzam H, Sprecher E, Manov L, Munichor M, Friedman-Birnbaum R, Ben-Itzhak O. A comparative immunohistochemical study of MART-1 expression in Spitz nevi, ordinary melanocytic nevi, and malignant melanomas. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 496-500.
- Bianchini F, Massi D, Marconi C, Franchi A, Baroni G, Santucci M, Mannini A, Mugnai G, Calorini L. Expression of cyclo-oxygenase-2 in macrophages associated with cutaneous melanoma at different stages of progression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007; 83: 320-328.
- Brochez L, Verhaeghe E, Grosshans E, Haneke E, Piérard G, Ruiter D, Naeyaert JM. Inter-observer variation in the histopathological diagnosis of clinically suspicious pigmented skin lesions. *J Pathol* 2002; 196: 459-466.
- Chwirot BW, Kuźbicki Ł. Cyclooxygenase-2 (COX-2): first immunohistochemical marker distinguishing early cutaneous melanomas from benign melanocytic skin tumours. *Melanoma Res* 2007; 17: 139-145.
- Clarke LE, Fountaine TJ, Hennessy J, Bruggeman RD, Clarke JT, Mauger DT, Helm KF. *J Cutan Pathol* 2009; 36: 433-438.
- Cook MG, Clarke TJ, Humphreys S, Fletcher A, McLaren KM, Smith NP, Stevens A, Theaker JM, Melia J.. The evaluation of diagnostic and prognostic criteria and the terminology of thin cutaneous malignant melanoma by the CRC Melanoma Pathology Panel. *Histopathology* 1996; 28: 497-512.
- Denkert C, Köbel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 303-308.
- Donizy P, Kaczorowski M, Leskiewicz M, Zietek M, Pieniazek M, Kozyra C, Halon A, Matkowski R. Mitotic rate is a more reliable unfavorable prognosticator than ulceration for early cutaneous melanoma: a 5-year survival analysis. *Oncol Rep* 2014; 32: 2735-2743.
- Farmer ER, Gonin R, Hanna MP. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between expert pathologists. *Hum Pathol* 1996; 27: 528-531.
- Filho RSO, Ferreira LM, Biasi LJ, Enokihara MMSS, Paiva GR, Wagner J. Vertical growth phase and positive sentinel node in thin melanoma. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 347-350.
- Fukunaga-Kalabis M, Roesch A, Herlyn M. From cancer stem cells to tumor maintenance in melanoma. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 1600-1604.
- Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos AJ, Pehamberger H, Eggermont AM; European Dermatology Forum (EDF); European Association of Dermato-Oncology (EADO); European Organisation for Research and Treatment of Cancer

- (EORTC). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer* 2016; 63: 201-217.
- Garrido-Ruiz MC, Requena L, Ortiz P, Pérez-Gómez B, Alonso SR, Peralto JL. The immunohistochemical profile of Spitz nevi and conventional (non-Spitzoid) melanomas: a baseline study. *Mod Pathol* 2010; 23: 1215-1224.
- Gould Rothberg BE, Rimm DL. Biomarkers: the useful and the not so useful - an assessment of molecular prognostic markers for cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1971-1987.
- Goulet AC, Einsphar JG, Alberts DS, Beas A, Burk C, Bhattacharyya A, Bangert J, Harmon JM, Fujiwara H, Koki A, Nelson MA. Analysis of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression during malignant melanoma progression. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 713-718.
- Hinz T, Ahmadzadehfar H, Wierzbicki A, Höller T, Wenzel J, Biersack HJ, Bieber T, Schmid-Wendtner MH. Prognostic value of sentinel lymph node biopsy in 121 low-risk melanomas (tumour thickness <1.00 mm) on the basis of a long-term follow-up. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39: 581-588.
- Isabel Zhu Y, Fitzpatrick JE. Expression of c-kit (CD117) in Spitz nevus and malignant melanoma. *J Cutan Pathol*. 2006; 33: 33-37.
- Jensen TO, Riber-Hansen R, Schmidt H, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T. Tumor and inflammation markers in melanoma using tissue microarrays: a validation study. *Melanoma Res* 2011; 21: 509-515.
- Johansson CC, Egyházi S, Masucci G, Harlin H, Mougiakakos D, Poschke I, Nilsson B, Garberg L, Tuominen R, Linden D, Stolt MF, Hansson J, Kiessling R. Prognostic significance of tumor iNOS and COX-2 in stage III malignant cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 1085-1094.
- Kalady MF, White RR, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Thin melanomas: predictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. *Ann Surg* 2003; 238: 528-535.
- Kantrow SM, Boyd AS, Ellis DL, Nanney LB, Richmond A, Shyr Y, Robbins JB. Expression of activated Akt in benign nevi, Spitz nevi and melanomas. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 593-596.
- Karagiannis P, Fittall M, Karagiannis SN. Evaluating biomarkers in melanoma. *Front Oncol* 2015; 4: 383.
- Karakousis GC, Gimotty PA, Botbyl JD, Kesmodel SB, Elder DE, Elenitsas R, Ming ME, Guerry D, Fraker DL, Czerniecki BJ, Spitz FR. Predictors of regional nodal disease in patients with thin melanomas. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 533-541.
- Kuźbicki Ł, Sarnecka A, Chwirot BW. Expression of cyclooxygenase-2 in benign naevi and during human cutaneous melanoma progression. *Melanoma Res* 2006; 16: 29-36.
- Kuźbicki Ł, Lange D, Chwirot BW. Cyclooxygenase-2 immunohistochemistry in human melanoma: differences between results obtained with different antibodies. *Melanoma Res* 2009; 19: 294-300.
- Kuźbicki Ł, Lange D, Strączyńska-Niemiec A, Chwirot BW. The value of cyclooxygenase-2 expression in differentiating between early melanomas and histopathologically difficult types of benign human skin lesions. *Melanoma Res* 2012; 22: 70-76.
- Kuźbicki Ł, Lange D, Strączyńska-Niemiec A, Chwirot BW. JARID1B expression in human melanoma and benign melanocytic skin lesions. *Melanoma Res* 2013; 23: 8-12.
- Kuźbicki Ł, Lange D, Strączyńska-Niemiec A, Chwirot BW. Diagnostic potential of JARID1B expression in differentiating between early melanomas and benign human skin lesions. *Acta Biochim Pol* 2013a; 60 (Suppl 1): 106.
- Kuźbicki Ł, Urban J, Chwirot BW. Different detectability of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in standard paraffin sections and tissue microarrays of human

- melanomas and naevi - comparative study. *Pathol Res Pract* 2014; 210: 591-595.
- Kuźbicki Ł, Lange D, Strączyńska-Niemiec A, Chwirot BW. Altered Splicing of JARID1B in Development of Human Cutaneous Melanoma? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2016; 24: 188-192.
- Kuźbicki Ł, Lange D, Stanek-Widera A, Chwirot BW. Intratumoral expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) is a negative prognostic marker for patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2016a; 26: 448-456.
- Kuźbicki Ł, Lange D, Stanek-Widera A, Chwirot BW. Prognostic significance of RBP2-H1 variant of JARID1B in melanoma. *BMC Cancer* 2017; 17: 854.
- Kuźbicki Ł, Lange D, Stanek-Widera A, Glińska A, Chwirot BW. Enhanced intratumoral expression of RNF2 is a favorable prognostic factor for patients with cutaneous melanoma? *Oncotarget* 2018; 9: 17656-17663.
- Lee C, Ramirez JA, Guitart J, Diaz LK. Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma during malignant melanoma progression. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 989-994.
- Liu B, Qu L, Yan S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int* 2015; 15: 106.
- Lodha S, Sagggar S, Celebi JT, Silvers DN. Discordance in the histopathologic diagnosis of difficult melanocytic neoplasms in the clinical setting. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 349-352.
- Mandalà M, Massi D. Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Arch* 2014; 464: 265-281.
- Martinez-Cardús A, Vizoso M, Moran S, Manzano JL. Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance. *Ann Transl Med* 2015; 3: 209.
- Meyer S, Vogt T, Landthaler M, Berand A, Reichle A, Bataille F, Marx AH, Menz A, Hartmann A, Kunz-Schughart LA, Wild PJ. Cyclooxygenase 2 (COX2) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG) Are Stage-Dependent Prognostic Markers of Malignant Melanoma. *PPAR Res* 2009; 2009: 848645.
- Minami S, Lum CA, Kitagawa KM, Namiki TS. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in melanocytic skin lesions. *Int J Dermatol* 2011; 50: 24-29.
- Minisini AM, Pascoletti G, Intersimone D, Poletto E, Driol P, Spizzo R, Scott CA, Puglisi F, Fasola G, Di Loreto C. Expression of thymidine phosphorylase and cyclooxygenase-2 in melanoma. *Melanoma Res* 2013; 23: 96-101.
- Misra S, Sharma K. COX-2 signaling and cancer: new players in old arena. *Curr Drug Targets* 2014; 15: 347-359.
- Mozzillo N, Pennacchioli E, Gandini S, Caracò C, Crispo A, Botti G, Lastoria S, Barberis M, Verrecchia F, Testori A. Sentinel node biopsy in thin and thick melanoma. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 2780-2786.
- Nasr MR, El-Zammar O. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2008; 30: 117-122.
- Niemann TH, Argenyi ZB. Immunohistochemical study of Spitz nevi and malignant melanoma with use of antibody to proliferating cell nuclear antigen. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 441-445.
- Pacifico MD, Grover R, Richman P, Daley F, Wilson GD. Validation of tissue microarray for the immunohistochemical profiling of melanoma. *Melanoma Res* 2004; 14: 39-42.
- Parente P, Coli A, Massi G, Mangoni A, Fabrizi MM, Bigotti G. Immunohistochemical expression of the glucose transporters Glut-1 and Glut-3 in human malignant melanomas and benign melanocytic lesions. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 34-39.

- Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2008; 21: 431-437.
- Radberger P, Radberger A, Bykov VJ, Seregard S, Economou MA. JARID1B protein expression and prognostic implications in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 4442-4449.
- Rai K, Akdemir KC, Kwong LN, Fiziev P, Wu CJ, Keung EZ, Sharma S, Samant NS, Williams M, Axelrad JB, Shah A, Yang D, Grimm EA, Barton MC, Milton DR, Heffernan TP, Horner JW, Ekmekcioglu S, Lazar AJ, Ernst J, Chin L. Dual Roles of RNF2 in Melanoma Progression. *Cancer Discov* 2015; 5: 1314-1327.
- Roesch A, Becker B, Meyer S, Wild P, Hafner C, Landthaler M, Vogt T. Retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1: a retinoblastoma-binding protein downregulated in malignant melanomas. *Mod Pathol* 2005; 18: 1249-1257.
- Roesch A, Becker B, Schneider-Brachert W, Hagen I, Landthaler M, Vogt T. Re-expression of the retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1 reveals tumor-suppressive functions in highly metastatic melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1850-1859.
- Roesch A, Mueller AM, Stempffl T, Moehle C, Landthaler M, Vogt T. RBP2-H1/JARID1B is a transcriptional regulator with a tumor suppressive potential in melanoma cells. *Int J Cancer* 2008; 122: 1047-1057.
- Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, Herlyn M. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 2010; 141: 583-594.
- Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, Zimmermann KM, Speicher D, Körbel C, Laschke MW, Gimotty PA, Philipp SE, Krause E, Pätzold S, Villanueva J, Krepler C, Fukunaga-Kalabis M, Hoth M, Bastian BC, Vogt T, Herlyn M. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell* 2013; 23: 811-825.
- Rosner K, Mehregan DR, Moussai D, Abrams J, Tromp G, Mehregan DA. WT1 marker is not sufficient for distinguishing between melanoma and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* 2009; 36: 1077-1082.
- Sawicka M, Pawlikowski J, Wilson S, Ferdinando D, Wu H, Adams PD, Gunn DA, Parish W. The specificity and patterns of staining in human cells and tissues of p16INK4a antibodies demonstrate variant antigen binding. *PLoS One* 2013; 8: e53313.
- Shoo BA, Sagebiel RW, Kashani-Sabet M. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma at a melanoma referral center. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62: 751-756.
- Singh B, Lucci A. Role of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *J Surg Res* 2002; 108: 173-179.
- Slingluff CL, Vollmer RT, Reintgen DS, Seigler HF. Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg* 1988; 208: 150-161.
- Su WJ, Fang JS, Cheng F, Liu C, Zhou F, Zhang J. RNF2/Ring1b negatively regulates p53 expression in selective cancer cell types to promote tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 1720-1725.
- Sun B, Zang S, Zhao X, Liu Y, Ni C, Zhang D, Qi H, Liu Z, Hoa X. Correlation of VEGF and COX-2 expression with VM in malignant melanoma. *Chinese J Clin Oncol* 2004; 1: 322-327.
- Tas F. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *J Oncol* 2012; 2012: 647684.
- Tas F, Erturk K. Recurrence behavior in early-stage cutaneous melanoma: pattern, timing, survival, and influencing factors. *Melanoma Res* 2017; 27: 134-139.
- Vidal M. Role of polycomb proteins Ring1A and Ring1B in the epigenetic regulation of gene expression. *Int J Dev Biol* 2009; 53: 355-370.

- Vogt T, McClelland M, Jung B, Popova S, Bogenrieder T, Becker B, Rumpler G, Landthaler M, Stolz W. Progression and NSAID-induced apoptosis in malignant melanomas are independent of cyclooxygenase II. *Melanoma Res* 2001; 11: 587-599.
- Wat H, Senthilselvan A, Salopek TG. A retrospective, multicenter analysis of the predictive value of mitotic rate for sentinel lymph node (SLN) positivity in thin melanomas. *J Am Acad Dermatol* 2016; 74: 94-101.
- Weinstein D, Leininger J, Hamby C, Safai B. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *J Clin Aesthet Dermatol* 2014; 7: 13-24.
- Wen W, Peng C, Kim MO, Ho Jeong C, Zhu F, Yao K, Zykova T, Ma W, Carper A, Langfald A, Bode AM, Dong Z. Knockdown of RNF2 induces apoptosis by regulating MDM2 and p53 stability. *Oncogene* 2014; 33: 421-428.
- Wilsher M, Cheerale B. WT1 as a complementary marker of malignant melanoma: an immunohistochemical study of whole sections. *Histopathology* 2007; 51: 605-610.
- Xia P, Wang S, Huang G, Du Y, Zhu P, Li M, Fan Z. RNF2 is recruited by WASH to ubiquitinate AMBRA1 leading to downregulation of autophagy. *Cell Res* 2014; 24: 943-958.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Oprócz 7 publikacji, składających się na osiągnięcie naukowe opisane w punkcie 5 Autoreferatu, jestem również współautorem **8 innych oryginalnych prac badawczych** opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR. Sumaryczny IF dodatkowych publikacji stanowi wartość **14,314**, a suma punktów MNiSW tych prac wynosi **188** (wartość IF oraz punktację MNiSW podano zgodnie z rokiem opublikowania). Pełny wykaz opublikowanych prac zawiera Załącznik nr 4 do Wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

a. Rozwój naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych

Badania, które wykonałem w ramach pracy doktorskiej były ukierunkowane na ocenę przydatności wybranych molekuł, jako potencjalnych markerów progresji ludzkiego czerniaka, a więc zbadanie, czy ich poziom jest skorelowany z rozwojem i inwazyjnością nowotworu. Badania markerów czerniaka, z jednej strony mogą rzucić nowe światło na biologię nowotworu i wskazać drogę dla rozwoju nowych strategii chemoprewencji, a z drugiej strony badania te mają też potencjał aplikacyjny. Molekularne markery mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce czerniaka w praktyce histopatologicznej i/lub jako markery prognostyczne oraz pomocne w opracowaniu nowych metod terapii, odpowiednich dla poszczególnych pacjentów, u których wykryto ten nowotwór.

Wiadomo, że rozwój nowotworu jest uwarunkowany pewnymi kluczowymi zmianami w funkcjonowaniu komórki: samowystarczalnością w przekazywaniu sygnałów wzrostu, niewrażliwością na inhibitory wzrostu, opornością na apoptozę,

nieograniczonym potencjałem proliferacyjnym, stymulowaniem angiogenezy, inwazyjnością, a także unikaniem destrukcji przez układ immunologiczny i wywoływaniem stanu zapalnego oraz niestabilnością genomu i zmianą regulacji przemian energetycznych [Hanahan i Weinberg, 2000, 2011]. Biorąc pod uwagę różnorodność procesów leżących u podstaw nowotworzenia i możliwe zaangażowanie w te mechanizmy: cyklooksygenazy-2 (COX-2), białka błony lizosomalnej zawierającego oligosacharydy rozgałęzione w pozycji β 1-6 (LAMP-1) oraz kinazy zależnej od cyklin 2 (CDK-2), do badań wybraliśmy właśnie te molekuły, jako potencjalne markery progresji czerniaka.

Wykonywałem reakcje immunohistochemiczne wykrywania białek COX-2, LAMP-1 i CDK-2 na standardowych preparatach histopatologicznych utrwalanych w formalinie i zatopionych w parafinie z ludzkich znamion barwnikowych, czerniaków pierwotnych o różnym stopniu zaawansowania i różnych typach histologicznych oraz wznów miejscowych czerniaka w bliźnie po resekcji nowotworu pierwotnego i przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych. Dodatkowo przeprowadziłem reakcje hybrydyzacji *in situ* wykrywania mRNA COX-2. Na preparatach ze zdrowej skóry człowieka opracowałem procedury reakcji immunohistochemicznych wykrywania COX-2, LAMP-1 lub CDK-2 z zastosowaniem systemu detekcyjnego ABC ze znacznikiem enzymatycznym oraz procedurę reakcji fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* wykrywania mRNA COX-2. Opracowane procedury zastosowałem do wykrywania tych molekuł, jako potencjalnych markerów w ludzkich nowotworach pochodzenia melanocytarnego, a barwienie immunohistochemiczne lub fluorescencja keratynocytów zdrowej skóry otaczającej nowotwory stanowiły wewnętrzne kontrole pozytywne, odpowiednio dla reakcji wykrywania poszczególnych białek lub transkryptu.

W pracach Kuźbicki i wsp. (2006, 2006a, 2006b) wykazaliśmy, że wzrost ekspresji COX-2, LAMP-1 i CDK-2 w komórkach czerniaka towarzyszy inwazyjności nowotworu. W czerniakach pierwotnych, w kolejnych stopniach naciekania w skali Clarka oraz wraz ze wzrostem grubości nacieku w skali Breslowa, obserwowałem wzrost udziału procentowego melanocytów wybarwionych immunohistochemicznie w reakcjach wykrywania każdego z badanych białek. Ponadto czerniaki pierwotne z owrzodzeniem charakteryzowały się wyższą ekspresją COX-2, LAMP-1 i CDK-2 niż te bez owrzodzenia, a czerniaki guzowate (o dużym potencjale do szybkiej inwazji) wyższym poziomem tych białek w porównaniu z czerniakami szerzącymi się powierzchownie. W znamionach barwnikowych poziom COX-2 i CDK-2 był niższy niż w czerniakach pierwotnych. Natomiast ekspresja LAMP-1 w łagodnych zmianach melanocytarnych była niewykrywalna, ale bardzo niska w czerniakach *in situ*.

Wykazałem znaczące różnice w udziale procentowym komórek COX-2 - pozytywnych między znamionami barwnikowymi a czerniakami, nawet w I stopniu naciekania w skali Clarka [Kuźbicki i wsp., 2006]. Natomiast w przypadku CDK-2, różnice te były istotne dopiero dla czerniaków od II stopnia naciekania w skali Clarka [Kuźbicki i wsp., 2006b]. Wyniki te wskazują, że transformacji nowotworowej melanocytów towarzyszy wzrost ekspresji COX-2 oraz otwierają możliwości jej zastosowania, jako markera pomocnego w diagnostyce różnicowej łagodnych i złośliwych zmian pochodzenia melanocytarnego. Wykazałem bardzo wysoką skuteczność testu diagnostycznego odróżniania znamion od czerniaków będących we wczesnym stadium zaawansowania (Clark I i II): dla centrum zmian $AUC = 0,97 \pm 0,02$, a dla brzegów $AUC = 0,86 \pm 0,04$ [Chwirot i Kuźbicki, 2007]. Jednakże decyzja o wyborze wartości progowej poziomu markera w teście diagnostycznym jest zawsze kompromisem między zwiększaniem jego czułości i jednocześnie obniżaniem specyficzności. Dlatego badania te kontynuowałem, aby ocenić użyteczność opracowanego testu diagnostycznego w odróżnianiu szczególnie problematycznych typów melanocytarnych zmian skóry człowieka.

Najwyższy poziom, zarówno COX-2, LAMP-1, jak i CDK-2 stwierdziłem w komórkach wznów miejscowych czerniaka w bliźnie po resekcji guza pierwotnego oraz w komórkach przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych. Wykazałem ponadto, że melanocyty w obrębie nowotworów różnią się pod względem poziomu wykrywanych białek. Komórki zlokalizowane w centrum zmiany charakteryzowały się wyższym poziomem badanych wskaźników molekularnych niż w brzegu nowotworu, a melanocyty obserwowane w coraz głębszych warstwach skóry wykazywały wyższy poziom tych markerów niż w powierzchniowych warstwach. Świadczy to o nieprzypadkowej heterogenności komórek w obrębie zmiany nowotworowej. W procesie tworzenia przerzutów następuje selekcja komórek, które nabyły cechy pozwalające im na przeżycie i kolonizację odległych narządów. Ekspresja COX-2, LAMP-1 i CDK-2 w komórkach czerniaka może więc nie tylko towarzyszyć inwazyjności nowotworu, ale nadawać i/lub promować zdolność do przerzutowania [Kuźbicki i wsp., 2006, 2006a, 2006b].

W tych przypadkach, w których czerniak pierwotny i przerzut czerniaka pochodziły od tego samego pacjenta, wykazałem wyższy lub porównywalny poziom ekspresji COX-2 w komórkach przerzutu czerniaka w stosunku do nowotworu pierwotnego [Kuźbicki i wsp., 2006]. Ponadto stwierdziłem porównywalny poziom COX-2 w komórkach wznowy i przerzutu czerniaka. Być może niekompletna resekcja nowotworu pierwotnego powoduje zmiany w pozostających komórkach nowotworowych, które zwiększają ich potencjał do inwazji. Porównywałem również

różnice ekspresji COX-2 w komórkach przerzutu lub wznowy w stosunku do komórek czerniaka pierwotnego w zależności od czasu, który upłynął od usunięcia zmiany pierwotnej. Stwierdziłem, że w większości przypadków poziom COX-2 wzrasta w przerzutach, które nie zostały wykryte i usunięte razem ze zmianą pierwotną. Niestety całkowity czas rozwoju przerzutu pozostaje nieznany. Ponadto istotne znaczenie może mieć heterogenność nowotworów. Aby ocenić prognostyczny potencjał ekspresji COX-2 w komórkach czerniaka skóry, kontynuowałem te badania w powiązaniu nie tylko z histopatologiczną, ale również kliniczną charakterystyką poszczególnych przypadków nowotworu oraz z czasem przeżycia pacjentów.

Wykazałem znaczący wzrost poziomu mRNA COX-2 w melanocytach czerniaków pierwotnych będących w fazie wzrostu poziomego w porównaniu z komórkami znamion. Wyniki te, uzyskane w ramach wykonywania pracy doktorskiej wskazują, że zaburzenia regulacji ekspresji COX-2 na poziomie transkrypcji mają miejsce we wczesnym etapie rozwoju czerniaka. Ponadto w nowotworach pochodzenia melanocytarnego stwierdziłem obecność znacznej puli mRNA COX-2 na terenie cytoplazmy melanocytów, a więc transkryptu potencjalnie aktywnego translacyjnie. Nieznaczny odsetek keratynocytów zdrowej skóry wykazujących obecność mRNA COX-2 na terenie cytoplazmy, w porównaniu z liczbą komórek o jądrowej lokalizacji sygnału fluorescencji, prawdopodobnie wynika z szybkiej degradacji tego transkryptu w normalnych komórkach. Z kolei zmiany poziomu mRNA COX-2 w zaawansowanych stadiach czerniaka wskazują, że podczas progresji tego nowotworu kluczowe znaczenie mają zaburzenia regulacji na poziomie transkrypcyjnym i post-transkrypcyjnym. Ogromne znaczenie funkcjonalne w kontroli ekspresji genu COX-2 ma szybka degradacja transkryptu i hamowanie translacji. Jeżeli procesy te są zaburzone, dochodzi do nadmiernej produkcji białka COX-2 [Dixon, 2004]. Wzmóżona ekspresja COX-2 na poziomie białka może wynikać właśnie ze zmienionej regulacji post-transkrypcyjnej. Prawdopodobnie w komórkach czerniaka w fazie wzrostu pionowego następuje obniżenie poziomu transkrypcji i uruchomienie na wzmożonym poziomie mechanizmów kompensujących, polegających na przedłużeniu trwałości mRNA i/lub zwiększeniu tempa translacji i/lub okresu trwania białka COX-2. Efektem tego jest opisany w naszej pracy Kuźbicki i wsp. (2006) wzrost udziału komórek nowotworowych wykazujących ekspresję COX-2 na poziomie białka.

Badania przeprowadzone w ramach wykonywania pracy doktorskiej były finansowane m.in. grantami promotorskimi: Grant UMK nr 347-B oraz Grant MNiSW nr 3215/P01/2006/31 kierowanymi przez prof. dr hab. Barbarę W. Chwirut, w których

pełniłem rolę wykonawcy, ponadto uczestniczyłem w Projekcie nr Z/2.04/II/2.6/7/05 „INNOREG - Stypendia dla Doktorantów - Innowacje dla Regionu”.

b. Rozwój naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych

Oprócz nowotworów pochodzenia melanocytarnego, przedmiotem moich zainteresowań naukowych są również raki, czyli złośliwe nowotwory pochodzenia nabłonkowego różnych narządów. Nieczerniakowe nowotwory skóry są najczęściej występującymi zmianami złośliwymi u człowieka, a wśród nich 34-75% przypadków stanowią raki podstawnokomórkowe (BCC), z kolei 20-38% to raki kolczystokomórkowe (SCC) [np. Neville i wsp., 2007]. Diagnostyka nowotworów skóry, ocena inwazyjności i prognozowanie przebiegu choroby w niektórych przypadkach przysparzają trudności [Carr i wsp., 2007; Cherpelis i wsp., 2002; Cribier i wsp., 1999; Petter i Haustein, 2000; Quaedvlieg i wsp., 2006]. Dlatego istnieje potrzeba znalezienia pomocniczych markerów wykrywanych na poziomie histopatologicznym.

W naszych publikacjach Kuźbicki i wsp. (2010 i 2011) opisaliśmy badania ekspresji kinazy zależnej od cyklin 2 (CDK-2) oraz cyklooksygenazy-2 (COX-2) w komórkach zmian niemelanocytarnych, jako potencjalnych markerów użytecznych w diagnostyce i ocenie inwazyjności ludzkich nowotworów skóry. Zbadaliśmy, czy istnieje różnica w poziomie i przestrzennym rozkładzie ekspresji CDK-2 i/lub COX-2 w preparatach histopatologicznych z: łagodnych zmian pochodzenia nabłonkowego (brodawek łojotokowych i brodawczaków), zmian uważanych za przedrakowe (przypadków rógowacenia słonecznego, rógowiaka kolczystokomórkowego i choroby Bowena) oraz raków (BCC i SCC).

W zdrowej skórze otaczającej badane zmiany obserwowałem wzrastające ku powierzchni barwienie immunohistochemiczne keratynocytów COX-2 - pozytywnych w warstwie kolczystej i nieco silniejsze w warstwie ziarnistej, a keratynocyty CDK-2 - pozytywne stwierdziłem jedynie w warstwie podstawnej naskórka. W łagodnych zmianach nabłonkowych wykazałem porównywalną ze stwierdzoną w zdrowej skórze ekspresję COX-2, a w przypadku CDK-2 w obrębie tych zmian obserwowałem również barwienie keratynocytów warstwy kolczystej naskórka, które było znacznie słabsze niż w warstwie podstawnej. Z kolei w zmianach przedrakowych ekspresja, zarówno COX-2, jak i CDK-2, była znacząco wyższa, niż w zmianach łagodnych. Ponadto stwierdziłem rozszerzanie strefy wybarwionych immunohistochemicznie komórek na wszystkie warstwy naskórka w zmianach przedrakowych. Jednakże, udział procentowy oraz intensywność wybarwienia keratynocytów stopniowo obniżały

się od warstwy ziarnistej do podstawnej w przypadku COX-2, a od komórek podstawnych do powierzchniowych nabłonka w przypadku CDK-2. BCC charakteryzowały się obecnością keratynocytów COX-2 - pozytywnych we wszystkich warstwach skóry, ale ich średni udział procentowy był niższy nawet niż w zmianach łagodnych. Z kolei w przypadku CDK-2, ekspresja w BCC była silniejsza niż w łagodnych zmianach, a najsilniejsze barwienie immunohistochemiczne w tych rakach obserwowałem w warstwach: podstawnej naskórka oraz siateczkowatej skóry właściwej. Natomiast SCC charakteryzowały się wysoką ekspresją, zarówno COX-2, jak i CDK-2 we wszystkich warstwach skóry, co może otwierać możliwości aplikacyjne tych badań w precyzyjnym wykrywaniu komórek raka w preparatach histopatologicznych. Udział procentowy komórek COX-2 - i CDK-2 - pozytywnych w SCC był znacząco większy niż w zmianach łagodnych i BCC, a w przypadku wykrywania CDK-2, wyższy również w porównaniu ze zmianami przedrakowymi. Porównywalna ekspresja COX-2 w zmianach przedrakowych i SCC wskazuje, że enzym ten może odgrywać istotną rolę w powstawaniu tego typu raków skóry. Uważa się, że istnieje silny związek między występowaniem rogowacenia słonecznego i rozwojem SCC: 82,4% raków skóry tego typu wykrywano, albo w obrębie (26,7%), albo w bliskim sąsiedztwie (55,7%) rogowacenia słonecznego [Lebwohl, 2003]. Ponadto nasze wyniki są interesujące w świetle doniesienia Rivers i wsp. (2002), którzy uzyskali efekt terapeutyczny stosowania diklofenaku, inhibitora COX-2, w leczeniu rogowacenia słonecznego. Fakt, że stwierdziliśmy większy udział komórek CDK-2 - pozytywnych w SCC, nawet o wysokim stopniu zróżnicowania, niż w zmianach przedrakowych nie tylko rzuca nowe światło na biologię tych zmian skóry, ale mógłby znaleźć zastosowanie w ich diagnostyce różnicowej.

Inaczej niż w badaniach ekspresji COX-2 i CDK-2 w melanocytnych nowotworach skóry [Kuźbicki i wsp., 2006, 2006b], w zmianach nabłonkowych barwienie immunohistochemiczne tych białek było porównywalne w centrum i brzegu poszczególnych guzów [Kuźbicki i wsp., 2010, 2011]. W skórze człowieka występują komórki o różnym pochodzeniu, a więc nowotwory wywodzące się z poszczególnych typów komórek mają odmienny charakter. Barwienia immunohistochemiczne COX-2 oraz CDK-2 nie są specyficzne dla jednego typu komórek. Jednakże wysokie poziomy ekspresji COX-2 i CDK-2 w czerniakach i w rakach SCC w porównaniu z rakami BCC mogą wskazywać na ich użyteczność jako markerów inwazyjności komórek nowotworowych.

W pracy Urban i wsp. (2014) przeprowadziliśmy badania prognostycznego potencjału ekspresji COX-2 w rakach piersi. Opublikowane wcześniej prace przez inne grupy, skoncentrowane na komórkach nabłonkowych, przynosiły rozbieżne

wyniki. Dlatego dokonaliśmy analizy ekspresji COX-2, zarówno w komórkach nowotworowych tych raków, jak i w komórkach podścieliska w powiązaniu z czasem przeżycia pacjentek. Wiadomo, że interakcje komórek nowotworowych z komórkami podścieliska prowadzą do modyfikacji cech komórek obu tych populacji, co jest związane z podtrzymywaniem i/lub stymulacją rozwoju choroby. W badaniach przeprowadzonych metodą immunohistochemiczną równolegle użyliśmy trzech typów przeciwciał anti-COX-2 oraz trzech algorytmów analizy wyników. We wszystkich 41 przypadkach raka piersi wykryliśmy pewien poziom COX-2 z użyciem każdego z tych przeciwciał w komórkach nabłonkowych oraz w komórkach podścieliska. Jednakże prognostyczne znaczenie ekspresji COX-2 w komórkach nabłonkowych było w dużym stopniu związane z wyborem odpowiedniego powiązania typu zastosowanych przeciwciał oraz sposobu analizy wyników. Co bardzo istotne, wykazaliśmy, że wysoki poziom tego białka w komórkach podścieliska, wykryty z użyciem wszystkich trzech typów przeciwciał anti-COX-2 oraz dwóch algorytmów analizy, jest związany z krótszym czasem przeżycia pacjentek z rakiem piersi. Właśnie te dwa algorytmy analizy były oparte na optymalizacji, w odniesieniu do czułości reakcji immunohistochemicznej, wartości progowej ekspresji COX-2 ocenianej jako niska lub wysoka. Podwyższony poziom COX-2 w komórkach podścieliska raka piersi okazał się być niekorzystnym wskaźnikiem prognostycznym, niezależnym od takich czynników, jak: ekspresja receptorów estrogenowych, progesteronowych, HER-2, a także wielkość guza pierwotnego i liczba węzłów chłonnych z przerzutami nowotworu. Natomiast zastosowanie algorytmu analizy wyników, opartego na arbitralnie wybranej wartości progowej ekspresji COX-2, nie dla każdego z przeciwciał pozwoliło na wykazanie takich korelacji. W pracy Chwirot i wsp. (2011) stwierdziliśmy, że opracowanie odpowiedniego sposobu analizy wyników barwienia immunohistochemicznego może być kluczowe dla interpretacji biologicznego znaczenia ekspresji COX-2 w rakach jelita grubego u człowieka.

Najważniejsze prace, spośród tych, których jestem współautorem, opublikowanych po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora, powstały we współpracy Zakładu Biologii Medycznej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z Zakładem Patologii Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach.

Literatura:

- Carr RA, Taibjee SM, Sanders DSA. Basaloid skin tumours: Basal cell carcinoma. *Curr Diagn Pathol* 2007; 13: 252-272.
- Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg* 2002; 28: 268-273.

- Chwirot BW, **Kuźbicki Ł**. Cyclooxygenase-2 (COX-2): first immunohistochemical marker distinguishing early cutaneous melanomas from benign melanocytic skin tumours. *Melanoma Res* 2007; 17: 139-145.
- Chwirot BW, Urban J, **Kuźbicki Ł**. Cyclooxygenase-2 overexpression as indicator of favorable clinicopathological phenotype and better survival of colorectal cancer patients: Fact or artifact? *Basic Appl Pathol* 2011; 4: 33.
- Cribier B, Asch P, Grosshans E. Differentiating squamous cell carcinoma from keratoacanthoma using histopathological criteria. Is it possible? A study of 296 cases. *Dermatology* 1999; 199: 208-212.
- Dixon DA. Dysregulated post-transcriptional control of COX-2 gene expression in cancer. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 635-646.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
- Kuźbicki Ł**, Sarnecka A, Chwirot BW. Expression of cyclooxygenase-2 in benign naevi and during human cutaneous melanoma progression. *Melanoma Res* 2006; 16: 29-36.
- Kuźbicki Ł**, Gajo B, Chwirot BW. Different expression of lysosome-associated membrane protein-1 in human melanomas and benign melanocytic lesions. *Melanoma Res* 2006a; 16: 235-243.
- Kuźbicki Ł**, Aładowicz E, Chwirot BW. Cyclin-dependent kinase 2 expression in human melanomas and benign melanocytic skin lesions. *Melanoma Res* 2006b; 16: 435-444.
- Kuźbicki Ł**, Lange D, Stanek-Widera A, Chwirot BW. Cyclin-dependent kinase 2 (CDK-2) expression in nonmelanocytic human cutaneous lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18: 357-364.
- Kuźbicki Ł**, Lange D, Stanek-Widera A, Chwirot BW. Different expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in selected nonmelanocytic human cutaneous lesions. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; 49: 381-388.
- Lebwohl M. Actinic keratosis: epidemiology and progression to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003; 149: 31-33.
- Neville JA, Welch E, Leffell DJ. Magement of nonmelanoma skin cancer in 2007. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 462-469.
- Petter G, Haustein UF. Histologic subtyping and malignancy assessment of cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2000; 26: 521-530.
- Rivers JK, Arlette J, Shear N, Guenther L, Carey W, Poulin Y. Topical treatment of actinic keratoses with 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel. *Br J Dermatol* 2002; 146: 94-100.
- Quaadvlieg PJ, Creytens DH, Epping GG, Peutz-Kootstra CJ, Nieman FH, Thissen MR, Krekels GA. Histopathological characteristics of metastasizing squamous cell carcinoma of the skin and lips. *Histopathology* 2006; 49: 256-264.
- Urban J, **Kuźbicki Ł**, Szatkowski G, Stanek-Widera A, Lange D, Chwirot BW. Stromal, rather than epithelial cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with overall survival of breast cancer patients. *BMC Cancer* 2014; 14: 732.

