



**UNIwersYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

**Znaczenie prognostyczne ekspresji polimerazy  
poli(ADP-rybozy)1 (PARP1) u pacjentów z  
czerniakiem skóry**

**Jakub Andrzej Marczuk**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**PROMOTOR**

**dr hab. n. med. Piotr Donizy**

Katedra oraz Zakład Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej  
Wydział Lekarsko-Stomatologiczny  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Praca wykonana w Katedrze oraz Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej  
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

**Wrocław 2020**

***Pulchra sunt, quae videntur,  
pulchriora quae sciuntur,  
longe pulcherrima quae ignorantur.***

*(Piękne są rzeczy, które widzimy;  
jeszcze piękniejsze te, które rozumiemy;  
ale najpiękniejsze są te, których pojąć nie potrafimy)*

*- bł. Niels Steensen, duński anatom, geolog i biskup, 1673*

Szczególne podziękowania składam na ręce dr hab. n. med. Piotra Donizego, adiunkta w Katedrze oraz Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, za wydatną pomoc, inspirację, życzliwość, cierpliwość i poświęcony czas, bez których niemożliwe byłoby powstanie tej pracy.

Dziękuję również mojej Mamie Elżbiecie, Cioci Bożenie i Dziadkom, Janinie i Władysławowi, za nieustanne wsparcie na każdym etapie powstawania pracy, a także na całej mojej życiowej drodze.

Wreszcie chciałbym podziękować Przyjaciołom – Armandowi, Bartoszowi, Helenie i Bjørnowi za ich obecność, również w trudnych chwilach, a także innym, bliższym i dalszym znajomym, lekarzom, pacjentom i innym napotkanym osobom, które wniosły swój wkład w to, kim obecnie jestem.

# SPIS TREŚCI

<b>1. WSTĘP .....</b>	<b>5</b>
1.1. Wprowadzenie .....	5
1.2. Epidemiologia czerniaka w Polsce i na świecie .....	6
1.3. Podtypy czerniaka.....	8
1.4. Współczesny stan wiedzy o melanomogenezie.....	11
1.5. Nowe zdobycze na polu farmakoterapii czerniaka.....	16
1.5.1 Leczenie modulujące układ odpornościowy .....	17
1.5.2 Leczenie celowane .....	19
1.6. Polimeraza poli(ADP-rybozy) 1 (PARP1) .....	20
1.6.1 PARP1 a naprawa uszkodzonego DNA.....	23
1.6.2 PARP1 a parthanatos .....	26
1.6.3 PARP1 a sztucznie indukowana letalność ( <i>synthetic lethality</i> , SL).....	27
1.6.4 Rola i udział PARP1 w innych, wybranych procesach cytofizjologicznych .....	29
1.6.5 Rola PARP1 w karcinogenezie .....	30
1.6.6 Aktualny stan wiedzy na temat prowadzonych badań nad zastosowaniem inhibitorów PARP1 w praktyce klinicznej .....	34
<b>2. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY .....</b>	<b>38</b>
2.1. Cele pracy.....	38
2.2. Założenie pracy: ocena ekspresji PARP1 jako potencjalnie użyteczne narzędzie prognostyczne? .....	38
<b>3. MATERIAŁ I METODY.....</b>	<b>38</b>
3.1. Charakterystyka kliniczna badanej grupy .....	40
3.2. Charakterystyka histopatologiczna guzów.....	42
3.3. Badania immunohistochemiczne.....	44
3.4. Histopatologiczna ocena immunoekspresji PARP1 w komórkach czerniaka .....	44
3.5. Analiza statystyczna .....	48
3.6. Zgoda Komisji Bioetycznej .....	48

<b>4. WYNIKI</b> .....	<b>51</b>
4.1. Ekspresja PARP1 w komórkach guza pierwotnego .....	51
4.2 Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami klinicznymi pacjentów .....	51
4.3 Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami histopatologicznymi .....	53
4.4 Analiza wpływu ekspresji PARP1 na przeżycia odległe – estymatory Kaplana-Meiera dla CSOS ( <i>cancer-specific overall survival</i> ) i DFS ( <i>disease-free survival</i> ) .....	55
4.5 Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami klinicznymi u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych .....	56
4.6 Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami histopatologicznymi u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych .....	58
4.7 Analiza wpływu ekspresji PARP1 na przeżycia odległe – estymatory Kaplana-Meiera dla CSOS ( <i>cancer-specific overall survival</i> ) i DFS ( <i>disease-free survival</i> ) u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych .....	60
4.8 Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami klinicznymi pacjentów u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych .....	61
4.9 Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami histopatologicznymi u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych .....	63
4.10 Analiza wpływu ekspresji PARP1 na przeżycia odległe – estymatory Kaplana-Meiera dla CSOS ( <i>cancer-specific overall survival</i> ) i DFS ( <i>disease-free survival</i> ) u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych .....	65
<b>5. DYSKUSJA</b> .....	<b>67</b>
<b>6. WNIOSKI</b> .....	<b>72</b>
<b>7. PIŚMIENNICTWO</b> .....	<b>73</b>
<b>8. STRESZCZENIE</b> .....	<b>85</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>87</b>
<b>10. SPIS TABEL</b> .....	<b>89</b>
<b>11. SPIS MIKROFOTOGRAFII, SKANÓW I WYKRESÓW</b> .....	<b>90</b>
<b>12. WYKAZ SKRÓTÓW</b> .....	<b>91</b>

# 1. WSTĘP

## 1.1 Wprowadzenie

Pierwsze opisy czerniaka pochodzą z czasów starożytnych i pojawiają się w pismach Hipokratesa (V wiek p.n.e.) oraz Rufusa z Efezu (przełom I i II wieku n.e.) [1]. Najstarsze namacalne dowody na występowanie tego nowotworu (w formie przerzutów do kości) można znaleźć w mumiach z okresu prekolumbijskiego ze stanowisk archeologicznych w Chancay i Chingas w Peru, których wiek datuje się na 2400 lat [1]. Pierwszą udaną próbę leczenia czerniaka, tj. jego wycięcie, przypisuje się szkockiemu chirurgowi, Johnowi Hunterowi, który w 1787 roku usunął nawrotowego czerniaka z okolicy żuchwy u 35-latka [2].

Przez wiele lat czerniak był opisywany jako „śmiertelny guz z przerzutami i czarnym płynem w ciele” (*fatal black tumors with metastases and black fluid in the body*) [2]. Uznanie czerniaka za odrębną jednostkę chorobową i nadanie mu nazwy *melanose* następuje dopiero na początku XIX wieku, dokonuje tego wynalazca stetoskopu, René Laënnec [2]. Autorem do dzisiaj obowiązującego terminu *melanoma* (z greckiego *melas*, czyli „czarny” oraz *oma*, oznaczającego „guz”) jest patolog, Sir Robert Carswell [2]. Carswell jest też autorem szczegółowych rycin przedstawiających przerzuty czerniaka, m.in. do mózgu [2]. I choć Carswell po raz pierwszy posłużył się nazwą *melanoma* już w 1838 roku [2], to aż to aż do lat 50. ubiegłego wieku operowano równolegle innymi nazwami, jak na przykład *melanosarcoma*, *melanocarcinoma* czy *nevocarcinoma* [3]. Jednolite nazewnictwo tego nowotworu następuje pewnych trudności nawet w czasach współczesnych, gdzie używa się zamiennie określeń *melanoma* oraz *melanoma malignum* (czerniak złośliwy) [3]. Choć oba terminy w zasadzie są akceptowalne, to nazwa *melanoma malignum* jest pleonazmem, jako że każdy czerniak z natury swej jest złośliwy (czerniak jako taki jest jednym z nowotworów o najwyższym potencjale inwazyjności) [3, 4].

Ponadto należy dodać, że skóra nie jest jedynym narządem, w którym pierwotny czerniak się lokalizuje (nawet w 5-10% przypadków może on rozwinąć się w innych tkankach) [5]. Najczęstszym pozaskórnym miejscem lokalizacji *melanoma* (w ok. 70-80%) jest gałka oczna, a dokładniej błona naczyniowa [3]. Czerniak lokalizuje się także w obrębie błon śluzowych (jama ustna, zatoki oboczne nosa,

nosogardło, srom, dystalny odcinek jelita grubego) [3]. Nowotwór może pierwotnie rozwinąć się nawet w takich miejscach, jak opony mózgowo-rdzeniowe, przelyk, ślinianki, pęcherzyk żółciowy, nadnercza, gruczoł krokowy, płuca czy też rozciągną [3].

## 1.2. Epidemiologia czerniaka w Polsce i na świecie

Zapadalność na nowotwory skóry na świecie, w tym czerniaka, stale rośnie [6]. W roku 2015 zarejestrowano około 350.000 nowych zachorowań. [7]. Prym w zapadalności na czerniaka wiodą Nowa Zelandia, Australia, Stany Zjednoczone oraz kraje europejskie (odpowiednio około 50, 48, 22 i 13 nowych przypadków na 100.000 mieszkańców) [6]. W obrębie Europy najwyższą zapadalnością cechują się kraje skandynawskie, Szwajcaria i Wielka Brytania, a najniższą kraje Półwyspu Bałkańskiego, przy czym rozbieżność prawodawstwa europejskiego odnośnie obowiązku zgłaszania zachorowania na czerniaka w poszczególnych krajach może mieć wpływ na statystyki [6]. Cechy predysponujące do zachorowania to jasna karnacja skóry (rasa kaukaska), wiek (zapadalność wzrasta z wiekiem, średni wiek zachorowania to 60 lat) oraz do pewnego stopnia płeć (u mężczyzn 1,5 raza częściej, zaś w grupie wiekowej powyżej 75 lat nowotwór ten pojawia się u mężczyzn 3 razy częściej) [6]. Zwiększone ryzyko wystąpienia czerniaka przypisywane jest również osobom posiadającym włosy w jasnym kolorze (blond, rude, jasnobrązowe) bądź oczy barwy niebieskiej, zielonej lub piwnej [8].

Chociaż czerniak nie jest najczęstszym nowotworem skóry – zdecydowanie wyprzedzają go rak podstawnokomórkowy (BCC, *basal cell carcinoma*) i płaskonabłonkowy (SCC, *squamous cell carcinoma*), najczęstsze nowotwory złośliwe skóry niebędące czerniakiem – to umieralność z jego powodu jest zdecydowanie wyższa niż w przebiegu rozrostów niemelanocytarnych [6]. Wynosi ona bowiem, w przypadku czerniaka, ok. 1 zgon na 100.000 mieszkańców [7] wobec 0.12 i 0.3 zgonu na 100.000 mieszkańców dla, odpowiednio, BCC i SCC [6].

W Polsce również obserwuje się tendencję wzrostową w zapadalności na czerniaka, przy czym rozpoznaje się coraz więcej nowotworów we wczesnym stadium zaawansowania (79% rozpoznań w roku 2016 względem 69% w roku 2006), podczas gdy udział czerniaka uogólnionego w rozpoznaniach spada (spadek z 12% do 9%) [9]. Niemniej jednak czerniak skóry jest nieczęstą (dziesiątą) przyczyną

zachorowalności na nowotwór złośliwy zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet, stanowiąc odpowiednio 2,1% i 2,4% nowych zachorowań (w liczbach bezwzględnych – 1695 i 1971 zachorowań) [9]. Dość podobnie sytuacja kształtuje się na poziomie regionalnym – w województwie dolnośląskim u obu płci *melanoma* stanowi 2,1% nowych rozpoznań nowotworów złośliwych (133 zachorowania u mężczyzn i 143 u kobiet), zaś w województwie opolskim – u obu płci po 2,3% (46 zachorowań u mężczyzn i 47 u kobiet) [9-11].

Czerniak jest również rzadką przyczyną zgonów z powodu nowotworu złośliwego – plasuje się na 15. miejscu u mężczyzn (stanowiąc 1,3% zgonów spowodowanych chorobami rozrostowymi – w liczbach bezwzględnych 742 zgony) i na 18. miejscu u kobiet (1,4% zgonów – w liczbach bezwzględnych 644 zgony). Rokowanie jest gorsze u płci męskiej; 5-letnie przeżycie wynosi 57,2%, podczas gdy u płci żeńskiej jest ono znacznie wyższe i wynosi 71,6% [9].

W świetle najnowszych dostępnych badań należy również zauważyć, że w Polsce wyniki leczenia czerniaka są zdecydowanie gorsze w porównaniu z innymi krajami europejskimi. Wprawdzie na przestrzeni lat 1990-1999 (badania EUROCORE-3 i EUROCORE-4) doszło do poprawy średnich pięcioletnich przeżyć dla tego nowotworu (z 55,7% do 63,0%), jednakże w następnym okresie, 1999-2007 (badanie EUROCORE-5) można mówić co najwyżej o stabilizacji tego wskaźnika (61,5%) [12,13]. Jest to wynik zdecydowanie odbiegający od średniej europejskiej (83,2%) i drugi od końca spośród 29 analizowanych krajów – niżej plasuje się jedynie Bułgaria z 5-letnimi przeżyciami na poziomie 49,6% [13]. Jednocześnie do krajów z najwyższym wskaźnikiem zalicza się, należąca do Zjednoczonego Królestwa, Irlandia Północna (90,7%) oraz Szwajcaria (90,4%) [13]. Ponieważ są to dane względnie stare (sięgające maksymalnie do 2007 roku) a jednocześnie, jak wspomniano wcześniej, na przestrzeni lat 2006-2016 uwidoczniła się tendencja do diagnozowania czerniaka w coraz wcześniejszym stadium zaawansowania, pozostaje mieć nadzieję, że jeszcze nieopublikowane wyniki szóstej edycji badania EUROCORE wypadną dla Polski korzystnie. Z drugiej strony jednak wydaje się, że najslabszym ogniwem w zdecydowany sposób zaniżającym wskaźniki przeżyć jest świadomość społeczeństwa dotycząca samej natury czerniaka, jego objawów oraz czynników ryzyka jego wystąpienia [14]. W związku z tym powinno się podjąć działania w celu poprawy edukacji zdrowotnej w tym zakresie.

Konieczność wykrywania czerniaka w jak najwcześniejszym stadium uwidacznia również analiza 5- i 10-letnich przeżyć ok. 46.000 pacjentów z czerniakiem skóry, pochodzących z 10 ośrodków na świecie [15]. Pacjentów tych sklasyfikowano według najnowszej, ósmej edycji klasyfikacji stopnia zaawansowania nowotworów autorstwa AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) [15]. W stadiach IA oraz IB przeżycia 5- i 10-letnie tych pacjentów wynoszą odpowiednio 99%, 98% oraz 97%, 94%, z kolei w stadiach IIA, IIB oraz IIC – 94%, 88%; 87%, 82% oraz 82%, 75% [15]. Dla podtypów w stadium III można już zauważyć znaczne pogorszenie prognozy – o ile w stadium IIIA odsetek przeżyć 5- i 10-letnich sięga odpowiednio 93% i 88%, o tyle w stadiach IIIB, IIIC oraz IIID odsetki te wynoszą już 83%, 77%; 69%, 60% oraz jedynie 32%, 24% [15]. Dla stadium IV według ósmej edycji AJCC nie udało znaleźć się wiarygodnych danych; bazując na badaniach posługujących się siódmą edycją, można stwierdzić, że w zależności od lokalizacji przerzutów 5- i 10-letnie przeżycia wynoszą odpowiednio ok. 10-30% i 5-25% [16]. Mimo pewnych zmian wprowadzonych w ósmej edycji klasyfikacji nowotworów, wydaje się, że odsetek 5- i 10-letnich przeżyć dla stadium IV będzie kształtować się podobnie.

### 1.3. Podtypy czerniaka

Za najbardziej popularną klasyfikację czerniaka można uznać tę powstałą na podstawie prac Clarka i wsp. oraz McGoverna [17,18]. Bazuje ona na cechach klinicznych i histopatologicznych czerniaka, i obejmuje pięć podtypów:

1. czerniaka rozwijającego się z plamy soczewicowatej (*lentigo maligna melanoma*, LMM),
2. czerniaka szerzącego się powierzchownie (*superficial spreading melanoma*, SSM),
3. czerniaka guzkowego (*nodular melanoma*, NM),
4. czerniaka akralnego bądź odsiebnych części kończyn (*acral lentiginous melanoma*, ALM),
5. czerniaka błon śluzowych (*mucosal melanoma*, MCM).

W przypadkach, w których cechy kliniczno-patologiczne nowotworu nie umożliwiają zaklasyfikowania go do jednej z powyższych kategorii, mówi się o postaci niesklasyfikowanej (*unclassifiable*).



Powyższa klasyfikacja pomija jednak czerniaka błony naczyniowej oka. Stąd też niektórzy proponują inny podział, który uwzględnia również ten typ czerniaka. W tym przypadku wyróżnia się czerniaka skóry nieakralnego (obejmującego LMM, SSM, NM), ALM, MCM oraz czerniaka błony naczyniowej oka [19]. Klasyfikacja taka, poza objęciem praktycznie całego spektrum czerniaków, odzwierciedla też odmienną biologię i rokowanie poszczególnych typów; mianowicie czerniak nieakralny cechuje się lepszą prognozą niż pozostałe typy, a ponadto występujące w nim mutacje są inne niż w ALM, MCM czy czerniaku błony naczyniowej oka [19]. ALM oraz MCM posiadają wiele wspólnych cech – wykazują podobne mutacje i występują w miejscach, które nie są mocno eksponowane na promieniowanie ultrafioletowe [20]. Szczegóły dotyczące biologii molekularnej czerniaka zostaną opisane w dalszych rozdziałach.

LMM występuje u ok. 10% osób rasy białej [3]. Nie jest to najczęstszy podtyp czerniaka, jednakże niektóre badania wskazują, że wykazuje się on największą dynamiką wzrostu zapadalności [21]. Typowo pojawia się u osób starszych, z nieznaczną przewagą kobiet, w miejscach narażonych na działanie promieniowania słonecznego (skóra głowy, szyi, twarzy) [3]. W tychże miejscach początkowo pojawiają się zmiany barwnikowe, tzw. piegi Hutchinsona (*freckle of Hutchinson*) czy plamy soczewicowate (*lentigo maligna*, LM) będące małymi, brązowymi bądź czarnymi plamkami leżącymi w poziomie skóry [3]. Okres transformacji LM w LMM jest długi, może wynosić kilkanaście lat [3].

SMM jest najczęstszym podtypem u osób rasy białej (ok. 70%) i choć, podobnie jak LMM, nieco częściej występuje u kobiet, to typowo pojawia się w młodszym wieku (mediana to ok. 44 lata) [3]. Może się pojawiać w miejscach narażonych na promieniowanie słoneczne, jak i w tych nieeksponowanych na promieniowanie UV; typowo u kobiet pojawia się na podudziach, a u mężczyzn w górnej części grzbietu [3]. Często przyjmuje postać zmiany z niewyraźnym odgraniczeniem od skóry niezmienionej chorobowo i z rogowaciejącą powierzchnią (*hyperkeratotic surface*); może być wielobarwny i składać się z barw czarnej, brązowej, niebieskiej, czerwonej czy białej [3]. W porównaniu do LMM okres przejścia w postać inwazyjną jest krótszy, zwykle wynosi 4-5 lat [3].

NM stanowi ok. 10% przypadków czerniaka u osób rasy białej i częściej występuje u mężczyzn [3]. Spośród trzech dotychczas omawianych podtypów ten cechuje się najbardziej agresywnym przebiegiem [3]. Zazwyczaj pojawia się na skórze *de novo*, typowo na szyi, tułowiu czy głowie [3]. Zmiana rośnie szybko, ma gładką bądź wrzodziejącą powierzchnię, o jednolitym zabarwieniu – zazwyczaj ciemnym, czarnym, czy też niebieskim, czerwonym, szarym; zdarzają się również postaci bez barwnika (amelanotyczne) [3].

ALM u osób rasy białej występuje rzadko, w około 5 procentach, zdecydowanie częściej zaś u osób rasy czarnej (ok. 35%) czy pochodzących z krajów Dalekiego Wschodu (49-75%) [3,22]. Zaobserwować można niewielką przewagę kobiet [3]. Podtyp ten przypomina LMM, z tą różnicą, że typowo pojawia się u młodszych osób, lokalizuje się na dłoniach i podeszwach, nie ma związku z przewlekłym narażeniem na promieniowanie słoneczne i zazwyczaj w momencie diagnozy głębiej penetruje skórę [3].

W obrębie ALM mieści się także czerniak pod paznokciowy, będący rzadką postacią *melanoma* (ok. 1-3% osób rasy białej) [3].

MCM jest podtypem rzadkim, stanowiącym ok. 2% wszystkich przypadków czerniaka [3]. Jak wspomniano wcześniej, najczęściej występuje na śluzówkach jamy ustnej, sromu i dystalnego odcinka jelita grubego, choć możliwe są inne lokalizacje [3]. Jest to podtyp rokujący źle [23].

Prawie wszystkie podtypy (LMM, SSM, ALM, MCM) cechują się dwufazowym modelem wzrostu, składającym się z wolniejszej fazy radialnej (poziomej, horyzontalnej) oraz szybszej wertykalnej (pionowej) [3,24]. Faza radialna polega na stopniowym, względnie wolnym, odśrodkowym rozroście zmiany na poziomie połączenia skórno-naskórkowego [3]. Zmiana w tym okresie jest płaska, a jej zarysy, nawet jeśli są nieregularne, przypominają okrąg bądź elipsę [3]. Potencjał do przerzutowania takiej zmiany jest zerowy bądź niewielki [3]. Następną fazą, wertykalną, wiąże się ze zmianą kierunku rozrostu zmiany z poziomego na pionowy, do głębszych warstw skóry [3]. Zmiana przybiera postać szybko powiększającego się, macalnego guzka bądź guza [3]. Wraz z progresją zmiany dochodzi do naciekania naczyń krwionośnych i chłonnych, a następnie przerzutowania [3].

Jak wspomniano wcześniej, podtyp guzkowy czerniaka (NM) nie wykazuje dwufazowego wzrostu; w jego przypadku faza radialna nie występuje (bądź jest bardzo krótka); praktycznie od samego początku nowotwór proliferuje w kierunku wertykalnym [3].

#### **1.4. Współczesny stan wiedzy o melanomogenezie**

Melanocyty, z których czerniak się wywodzi, są komórkami o rozgałęzionym, dendrytycznym kształcie, wytwarzającymi barwnik, melanicę, dostarczany do sąsiadujących z nimi keratynocytów [25,26]. Jest to cząsteczka zdolna do rozpraszania i absorpcji promieniowania ultrafioletowego i jej zadaniem jest ochrona keratynocytów przed szkodliwym działaniem tego promieniowania na DNA [26]. Do jej syntezy dochodzi w wyspecjalizowanych organellach zwanych melanosomami [27]. Proces ten jest aktywowany przez pobudzenie receptora dla melanokortyny 1 (MC1R, *melanocortin 1 receptor*) przez melanotropinę  $\alpha$  ( $\alpha$ MSH,  *$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone*), która z kolei wydzielana jest wskutek uszkodzeń DNA zadanych keratynocytom przez promieniowanie ultrafioletowe [26]. Melanocyty skóry typowo lokalizują się w obrębie warstwy podstawnej naskórka (stanowiąc ok. 10% komórek tej warstwy), połączenia skórno-naskórkowego oraz mieszków włosowych [27,28]. Wywodzą się one ze struktur grzebienia nerwowego, skąd migrują one na wczesnym etapie rozwoju prenatalnego do skóry, a także błon śluzowych, naczyńówki oraz opony miękkiej i pajęczej [3]. Mogą one również wędrować do innych tkanek miękkich w organizmie; to wszystko tłumaczy, dlaczego pierwotny czerniak może się rozwijać w tak wielu różnych lokalizacjach [3]. Z drugiej strony jednak pojawiają się hipotezy, że melanocyty występujące w skórze mogą mieć inne pochodzenie od tych występujących poza nią; na poparcie tego twierdzenia podaje się fakt, że garnitur mutacji charakteryzujący czerniaka skóry jest zdecydowanie inny niż ten występujący w pozaskórnych czerniakach [26].

Kluczową rolę w powstawaniu czerniaka odgrywa narażenie na promieniowanie ultrafioletowe skutkujące uszkodzeniami w obrębie DNA i w konsekwencji powstaniem mutacji, które z czasem ulegają kumulacji [29]. Najbardziej szkodliwa jest nasilona, przerywana ekspozycja na światło słoneczne w młodym wieku [29]. Czerniaki powstałe na jej skutek pojawiają się zwykle u ludzi w młodszym wieku i często rozwijają się w obrębie wcześniej istniejących znamion

[28]. W partiach skóry narażonych na przewlekłe działanie promieni słonecznych również może rozwinąć się czerniak; w tych przypadkach nowotworzeniem dotknięci są ludzie względnie starsi i nowotwór rzadko poprzedzony jest wystąpieniem znamienia [28].

*Melanoma* jest nowotworem mogącym występować zarówno sporadycznie (ok. 90% przypadków, jak i rodzinie (ok. 10% przypadków) [4,29]. W przypadku czerniaka nabytego kluczową rolę odgrywają zmiany w dwóch ścieżkach sygnalizacyjnych, zaś czerniak powodowany mutacjami germinalnymi ma odmienne podłoże molekularne.

Pierwszą z dróg sygnalizacyjnych odgrywającą rolę w melanomogenezie jest ścieżka kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK), zwana też ścieżką RAS/RAF/MEK/ERK [30]. Pełni ona rozliczne funkcje, m.in. reguluje proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek, bierze także udział w embriogenezie [31]. Kaskada ta rozpoczyna się od związania cząsteczki sygnałowej (np. czynnika wzrostu) przez błonowy receptor o aktywności kinazy tyrozynowej (*receptor tyrosine kinase*, RTK) [32]. Receptor ten ulega dimeryzacji, a następnie dokonuje się skomplikowany proces skutkujący fosforylacją białek z rodziny RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*): ARAF, BRAF, CRAF [32]. W procesie tym biorą udział trzy grupy białek [32]. Pierwsza grupa obejmuje białka adaptorowe (wiążące aktywowane RTK oraz GEF, omówione dalej) [32]. W drugiej grupie znajdują się białka GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*, czynnik wymiany nukleotydu guaniny), które po aktywacji RTK wędrują w pobliże błony komórkowej i przeprowadzają wymianę guanozynodifosforanu (GDP, *guanine nucleotide diphosphate*) na guanozotryfosforan (GTP, *guanine nucleotide triphosphate*) w enzymach zwanych małymi GTP-azami (SGTPs, *small guanine triphosphatases*), do których zalicza się rodzinę białek RAS (*rat sarcoma*): HRAS, KRAS, NRAS [32]. Wreszcie trzecią grupę tworzą wspomniane GTP-azy, które fosforylują białka RAF resztą fosforanową pochodzącą od przyłączonego do enzymu GTP, wskutek czego SGTPs z powrotem zawierają przyłączony GDP i, by móc przeprowadzać następne reakcje, musi nastąpić kolejna wymiana GDP-GTP katalizowana przez GEF [32]. Białka RAF mają aktywność kinaz i po aktywacji mogą fosforylować (i tym samym aktywować) dalsze molekuly, MEK-1 i MEK-2 (kinazę 1 MAPK/ERK i kinazę 2 MAPK/ERK, *MAPK/ERK kinase-1 and -2*) [32]. Również te

białka są kinazami; aktywowane dokonują fosforylacji następnych białek, ERK1 i ERK2 (kinazy 1 i 2 regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym; *extracellular signal-regulated kinase-1 and -2*) [32]. Te białka fosforylują dalsze, wpływając na procesy komórkowe związane z proliferacją, migracją i różnicowaniem [32].

Warto wspomnieć, że szlak MAPK jest regulowany; do kluczowych regulatorów można zaliczyć produkt genu NF1 (*neurofibromin 1*), który działa supresorowo na aktywność białek z grupy RAS, katalizując reakcję odwrotną do tej przeprowadzanej przez GEF [31,33].

Niekontrolowana aktywacja ścieżki MAPK prowadzi do progresji nowotworu [32]. Kluczowe mutacje tego szlaku dotyczą przede wszystkim białek RAF, najczęściej zaś BRAF (ok. 40-60% przypadków czerniaka skóry), z czego najczęstsza mutacja to V600E (zamiana waliny na kwas glutaminowy), stanowiąca około 90% mutacji tego genu [34]. Ponieważ mutacje w obrębie BRAF występują też w znacznym odsetku w znamionach łagodnych, które później nie ulegają złośliwieniu, wysunięto hipotezę, że stanowią one pierwszy etap nowotworzenia, ale izolowane, bez dodatkowych mutacji, nie prowadzą jeszcze do niekontrolowanej melanomogenezy [31,34]. Inną grupą białek ze szlaku MAPK o dużym znaczeniu w nowotworzeniu są białka RAS, a zwłaszcza NRAS; w ich przypadku również najczęściej dochodzi do powstania mutacji punktowych, zazwyczaj w kodonach Q60/61 i G12/13 [34]. Podobnie jak w przypadku BRAF, mutacje NRAS często wykrywane są w łagodnych znamionach i również nie są wystarczające do rozwoju czerniaka [28,31,34].

Drugą ścieżką sygnalizacyjną mającą znaczenie w progresji nowotworu jest szlak PTEN/PI3K/AKT/mTOR [35]. Bierze on udział we wzroście komórek, regulacji cyklu komórkowego i proliferacji, metabolizmie wewnątrzkomórkowym i reorganizacji cytoszkieletu [35]. Głównym białkiem w tym szlaku jest kinaza 3 fosfatydylinozytolowa (PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*), która w warunkach fizjologicznych aktywowana jest przez RTK oraz receptory związane z białkiem G (GPCR, *G-protein coupled receptor*), w tym również NRAS, wskutek czego enzym może dokonywać fosforylacji 4,5-difosforanu fosfatydylinozytolu (PIP<sub>2</sub>, *phosphatidylinositol 4,5-diphosphate*) do 3,4,5-trifosforanu fosfatydylinozytolu (PIP<sub>3</sub>, *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) [35,36]. Z kolei PIP<sub>3</sub> wzmacnia siłę

sygnalizacyjną ścieżki PTEN/PI3K/AKT/mTOR, rekrutując różne białka zawierające domeny wiążące lipidy, m.in. kinazę serynowo-treoninową AKT oraz kinazę 1 zależną od fosfoinozytydu (PDK1, *phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) [35]. Następnie, w pobliżu błony komórkowej, PDK1 fosforyluje i aktywuje AKT, która z kolei dokonuje aktywacji ponad 100 różnych białek [35].

Do docelowych protein dla AKT można zaliczyć m.in. kompleks 1 mTOR (mTORC1, *mammalian target of rapamycin complex 1*), aktywowany pośrednio poprzez fosforylację jego inhibitorów, TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) oraz PRAS40 [37]. mTOR jest celem sygnałów powstałych wskutek działania różnych czynników wzrostu, hormonów (np. insuliny) czy substancji odżywczych (aminokwasów, glukozy) [37]. Innym docelowym białkiem, o którym warto wspomnieć, jest czynnik transkrypcyjny  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B, *nuclear factor- $\kappa$ B*), aktywowany również pośrednio poprzez fosforylację i następczą degradację jego regulatora, tj. inhibitora  $\kappa$ B (I $\kappa$ B, *inhibitor of  $\kappa$ B*) [38]. Rolą samego NF $\kappa$ B jest wspieranie procesów pomagających w przeżyciu komórek – czynnik ten bowiem indukuje transkrypcję genów kodujących białka, które przeciwdziałają apoptozie [39].

Wspomnieć należy także o białku PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*), który w szlaku PTEN/PI3K/AKT/mTOR pełni funkcję regulatorową (hamującą) [40]. Regulowanie tej ścieżki odbywa się w ten sposób, że PTEN, będąc fosfatazą, katalizuje defosforylację PIP3, co doprowadza to przerwania sygnalizacji w obrębie szlaku – docelowe, znajdujące się na końcu ścieżki białka nie zostają aktywowane [40].

Przetrwiała aktywacja szlaku PTEN/PI3K/AKT/mTOR prowadzi do zahamowania apoptozy i niekontrolowanego wzrostu nowotworu [34]. Do takiej aktywacji może dojść w różnych mechanizmach – czy to wskutek mutacji punktowych w genach dla PI3K bądź ATK, czy to wskutek zwielokrotnienia liczby tych genów, bądź też zmianach w genach położonych „wyżej w hierarchii”, tj. PTEN (gdy dojdzie do utraty właściwości hamujących), NRAS (gdy dojdzie do jego przetrwiałej aktywacji) bądź KIT (gdy ulegnie przewlekłej aktywacji) [34,35]. W przypadku tych dwóch ostatnich dochodzi do jednoczesnej aktywacji dwóch ścieżek – poza PTEN/PI3K/AKT/mTOR aktywowany jest szlak MAPK [34,35].

Według najnowszych danych genami najczęściej ulegającymi mutacji w czerniaku skóry (nieakralnym) są BRAF (60%), NRAS (28%) i NF-1 (14%) [41]. Czerniak nieakralny niewykazujący tych mutacji nazywa się potrójnie dzikim bądź potrójnie negatywnym [41]. Niekiedy jednak tym mianem określa się czerniaka skóry nieposiadającego mutacji w genach BRAF, NRAS oraz KIT (prawdopodobnie w tych przypadkach uwzględnia się czerniaka akralnego, dla którego KIT jest najczęstszą mutacją) [42].

Należy wspomnieć, że czerniaki występujące poza skórą oraz postać akralna czerniaka skóry wykazują odmienną dystrybucję mutacji. W przypadku MCM i ACM mutacje BRAF zdarzają się rzadko, za to względnie często wykrywa się mutacje bądź zwielokrotnienie kopii genu KIT – odpowiednio w 39% i 36% przypadków (jest to najczęściej zmutowany gen w tych postaciach czerniaka) [41,43]. Z kolei czerniak błony naczyniowej oka w zdecydowanej większości przypadków (ok. 80%, a według niektórych nawet 99%) wykazuje mutacje aktywujące w co najmniej jednym z dwóch genów GNAQ lub GNA11 [41,43]. Geny GNAQ oraz GNA11 aktywują między innymi omawiany wyżej szlak MAPK [44]. Inna, dość częsta mutacja, obejmuje gen BAP1 (w ok. 45% przypadków); może on występować jako mutacja germinalna i wywoływać zespół predyspozycji do określonych nowotworów, który zostanie opisany dalej [41].

Wyżej wymienione zmiany molekularne występują przede wszystkim jako mutacje nabyte. Czerniak może jednak rozwinąć się na podłożu mutacji wrodzonych (germinalnych), które wywołują określone choroby czy zespoły. Jednym ze szlendarowych syndromów to zespół rodzinnego występowania znamion atypowych i czerniaka (FAMMM, *familial atypical multiple mole melanoma syndrome*), dziedziczony autosomalnie dominująco. Charakteryzuje się on występowaniem czerniaka u przynajmniej jednego krewnego I lub II stopnia, dużą (powyżej 50) liczbą znamion skórnych oraz licznymi znamionami atypowymi, a także występowaniem określonych cech znamion w badaniu histopatologicznym [45]. Najczęstszym podłożem genetycznym zespołu jest mutacja nonsensowna bądź zmiany sensu w genie CDKN2A; rzadziej zdarza się mutacja genu CDK4, powodująca oporność na regulatorowe (hamujące) działanie białka p16 [45]. FAMMM, poza czerniakiem, może wywoływać nowotwory w narządach wewnętrznych, najczęściej raka trzustki [45].

Interesującym przykładem predyspozycji do rodzinnego występowania czerniaka jest zespół predyspozycji do nowotworów BAP1 [46]. Wykazuje się on autosomalnie dominującym wzorem dziedziczenia [47]. W jego przebiegu pojawiać się mogą rozmaite nowotwory, najczęściej czerniak błony naczyniowej oka, czerniak skóry, międzybłoniak czy rak piersi [46]. Podłożem genetycznym zespołu jest mutacja genu BAP1 (białka 1 związanego z BRCA1, *BRCA1-associated protein-1*) [46]. Produkt tego genu, katalizujący reakcję deubikwitynacji, w normalnych warunkach pełni funkcję supresora; mutacja genu prowadzi do utraty właściwości supresorowych tego enzymu [46].

Kolejnym przykładem wrodzonej predyspozycji do występowania czerniaka jest skóra pergaminowata barwnikowa (XP, *xeroderma pigmentosum*) [48]. Cechuje się nadwrażliwością skóry i oczu na promieniowanie ultrafioletowe i zwiększonym występowaniem nowotworów skórnych (poza czerniakiem często występują także BCC czy SCC) [48]. W części (ok. 20-30%) przypadków pojawiają się także objawy neurologiczne zależne od lokalizacji uszkodzenia układu nerwowego [48]. Chorobę, dziedziczną autosomalnie recesywnie, wywołuje mutacja jednego z ośmiu różnych genów (XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG oraz XPV-wariant) kodujących białka biorące udział w naprawie uszkodzonego DNA [48].

Opisano również inne zespoły silniej lub słabiej związane z występowaniem czerniaka; zaliczyć można do nich zespół Cowden [45], Recklinghausena [49], Li-Fraumeni [50] czy kompleks Carneya [51].

### **1.5. Nowe zdobycze na polu farmakoterapii czerniaka**

Podstawową metodą miejscowego leczenia czerniaka stosowaną od wielu lat jest jego całkowite chirurgiczne usunięcie; jest to możliwe przede wszystkim przy nowotworze o stopniach zaawansowania I-III B [52]. W przypadkach przerzutów odległych jest to metoda niewystarczająca (możliwa jest ewentualna resekcja pojedynczych ognisk przerzutowych) [52], w związku z czym aż do początków ubiegłego wieku nie dysponowano innymi metodami umożliwiającymi choć częściową poprawę stanu chorych na ten nowotwór [53]. W minionym stuleciu (zwłaszcza od lat 70.) pojawiły się pierwsze alternatywy dla pacjentów, dla których interwencja chirurgiczna nie była wystarczająca – radioterapia (stosowana również przed latami 70., choć z użyciem mniej zaawansowanych technik) [53] oraz



chemioterapia [52]. Ta ostatnia obejmowała głównie stosowanie dakarbazyny, zatwierdzonej przez FDA w roku 1974 [52]. Mimo niewielkiego odsetka całkowitej odpowiedzi na leczenie (poniżej 5%) i pięcioletnich przeżyć (2-6%) stanowiła ona przez długi czas standard leczniczy, gdyż inne leki bądź ich kombinacje nie osiągały lepszych wyników [52]. Obecnie dakarbazyna jest często stosowana w badaniach kliniczno-kontrolnych u osób znajdujących się w grupie kontrolnej [52].

Czołowa pozycja dakarbazyny w farmakoterapii została podważona dopiero w roku 1995 wraz z zatwierdzeniem przez FDA interferonu  $\alpha$ -2b (IFN  $\alpha$ -2b) w czerniaku usuniętym chirurgicznie (dla stopni IIB-III) oraz, w roku 1998, interleukiny 2 (IL-2) w czerniaku rozsianym [52]. Były to pierwsze leki oddziałujące na układ odpornościowy, a stosowane w miejscowo zaawansowanym bądź rozsianym czerniaku. Choć obecnie dostępne są skuteczniejsze środki farmakologiczne, leki te wciąż są stosowane w badaniach klinicznych w połączeniu z innymi substancjami czynnymi [52].

Ostatnie dziesięciolecie przyniosło znaczny postęp w leczeniu farmakologicznym zaawansowanego czerniaka; opracowano i wprowadzono do leczenia wiele leków, które można podzielić na dwie główne grupy – leki oddziałujące na układ odpornościowy (immunoterapeutyki) oraz ukierunkowane na konkretne cząsteczki czy nawet cząsteczki posiadające określoną mutację (leki celowane, terapeutyki molekularne, leki spersonalizowane). Z uwagi na rozległość zagadnienia przedstawione zostaną jedynie te leki, które są zatwierdzone przez FDA.

### **1.5.1. Leczenie modulujące układ odpornościowy**

Jedną z pierwszych innowacji na polu immunoterapii czerniaka w ostatniej dekadzie było wprowadzenie do leczenia pegylowanej formy IFN  $\alpha$ -2b interferonu (zatwierdzone przez FDA w 2011 roku) w przypadkach czerniaka usuniętego chirurgicznie, a znajdującego się na III stopniu zaawansowania [52]. Pegylacja cząsteczki sprawia, że lek utrzymuje się dłużej w krwioobiegu, a przez to działa skuteczniej [52].

Pierwszym rzeczywiście innowacyjnym immunoterapeutykiem o całkowicie odmiennym mechanizmie działania był jednak ipilimumab, zatwierdzony przez FDA w tym samym roku do leczenia zaawansowanych postaci czerniaka [52]. Jest to

przeciwciało skierowane przeciwko antygenowi 4 cytotoksycznych limfocytów T (CTLA-4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*), który w normalnych warunkach (przed zahamowaniem przeciwciałem) blokuje aktywację limfocytów T, wywołując tolerancję immunologiczną [52].

Kolejny lek oddziałujący na układ immunologiczny, niwolumab, jest monoklonalnym przeciwciałem wiążącym receptor PD-1 (*programmed cell death protein 1*, białko programowanej śmierci komórki 1), a przez to hamującym wiązanie się z jego ligandami, PD-L1 i PD-L2 [52]. W normalnych warunkach wiązanie to uczestniczy w supresji aktywacji limfocytów T; niwolumab tą supresję blokuje [52]. Lek ten został zatwierdzony przez FDA w 2014 roku do leczenia zaawansowanego czerniaka – zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu z ipilimumabem [52].

W tym samym roku FDA zatwierdziło inną cząsteczkę, pembrolizumab, o tym samym mechanizmie działania, co niwolumab [52]. Wskazania do stosowania są takie same, przy czym lek stosuje się jedynie w monoterapii [54].

Interesującym przykładem immunoterapeutyku jest talimogen laherparepwek (T-VEC), zatwierdzony przez FDA w 2015 roku [52]. Jest to pierwszy wirus onkolityczny stosowany w terapii czerniaka, będący zmodyfikowanym genetycznie i osłabionym wirusem opryszczki pospolitej typu 1 [52]. Lek ten, w odróżnieniu od poprzednio omawianych przeciwciał, podawanych dożylnie, jest wstrzykiwany bezpośrednio do przerzutów czerniaka [52]. Część kopii wirusa dostaje się do komórek czerniaka, a część do komórek zdrowych, jednak tylko w komórkach nowotworowych dochodzi do replikacji z następczą ich lizą i uwolnieniem do krwiobiegu antygenów specyficznych dla nowotworu [52]. Antygeny te później rozpoznawane są przez komórki prezentujące antygen, po czym następuje aktywacja odpowiedzi immunologicznej specyficznie skierowanej przeciwko komórkom czerniaka, a zawiadywanej przez komórki T [52].

W chwili obecnej w Polsce dostępne i objęte refundacją w ramach programu lekowego B.59 – „Leczenie czerniaka skóry lub błon śluzowych” – po spełnieniu określonych kryteriów, są trzy leki z tej grupy – ipilimumab, niwolumab oraz pembrolizumab [55]. Możliwe jest również zastosowanie ipilimumabu w skojarzeniu z niwolumabem jako leczenia I linii [55].

### 1.5.2. Leczenie celowane

Obecne leki ukierunkowane molekularnie stosowane w leczeniu czerniaka podzielić można na dwie grupy – inhibitory BRAF oraz inhibitory MEK [52]. Zasadniczo z tej grupy stosuje się samodzielnie inhibitory BRAF bądź w połączeniu z inhibitorami MEK [52]. Te ostatnie dodaje się głównie wtedy, gdy stwierdza się oporność na leczenie celowane przeciwko BRAF – MEK znajduje się bowiem niżej, bliżej ostatecznych efektorów w kaskadzie sygnałowej, o czym była mowa w poprzednich akapitach [52]. W związku z tym możliwe jest przełamanie oporności komórek nowotworowych na inhibitory BRAF [52].

Wemurafenib jest pierwszą substancją czynną zatwierdzoną przez FDA (2011) w leczeniu rozlanego czerniaka, a reprezentującą nowy kierunek w jego leczeniu – terapię spersonalizowaną [52]. Był to swoisty przełom – wykazano, że nawet 90% pacjentów wykazywało regresję nowotworu [52]. Wskazaniem do zastosowania wemurafenibu jest czerniak nieresekcyjny lub z przerzutami wykazujący jednocześnie mutację aktywującą V600E w obrębie genu dla BRAF. Podawany jest doustnie [52]. Można go łączyć z doustnym inhibitorem MEK, kobimetynibem (połączenie to zostało zatwierdzone przez FDA w 2015 roku) [52].

Kolejnym selektywnym inhibitorem, stosowanym doustnie, jest dabrafenib (2013). Ma identyczne wskazania do stosowania jak wemurafenib, z tym że dodatkowo obejmują one mutację V600K [52,56]. Może być stosowany w monoterapii bądź w połączeniu z doustnym inhibitorem MEK, trametynibem (schemat zatwierdzony przez FDA w 2014 roku), o którym będzie mowa w następnym akapicie [52].

Trametynib jest inhibitorem MEK 1/2 (2013) podawanym doustnie i dotychczas jedynym lekiem celowanym, niebędącym inhibitorem BRAF, stosowanym w monoterapii czerniaka [52]. Wskazania do jego stosowania w monoterapii (bądź w połączeniu z dabrafenibem) są takie same jak dla wyżej wymienionych inhibitorów BRAF, przy czym można go stosować zarówno w mutacjach V600E, jak i V600K [52,57]. Ponadto, od roku 2018, łączne stosowanie trametynibu z dabrafenibem możliwe jest również w przypadku pacjentów po całkowitej resekcji czerniaka z mutacją BRAF V600E bądź V600K, wraz z zajęciem węzłów chłonnych [57].

Najnowsze leki zaakceptowane przez FDA (w roku 2018) to kombinacja enkorafenibu (inhibitora BRAF) oraz binimetynibu (inhibitora MEK) stosowanych u pacjentów z nieresekcyjnym lub przerzutowym czerniakiem posiadającym mutację BRAF V600E bądź V600K [58]. Rekomendacja ta bazuje na badaniu COLUMBUS, w którym wykazano zdecydowaną wyższość tej kombinacji nad wemurafenibem zarówno pod względem mediany czasu wolnego od progresji (14,9 względem 7,3 miesiąca), jak i pod kątem tolerancji leczenia [59].

Obecnie w Polsce dostępne i objęte refundacją są wemurafenib i kobimetynib, dabrafenib z trametynibem oraz binimetynib z enkorafenibem w ramach programu lekowego B.59 – „Leczenie czerniaka skóry lub błon śluzowych” [55].

### 1.6. Polimeraza poli(ADP-rybozy) 1 (PARP1)

PARP1 (polimeraza poli(ADP-rybozy) 1, *poly (ADP-ribose) polymerase 1*) jest białkiem należącym do rodziny enzymów PARP, obejmującej obecnie 17 bądź 18 (w zależności od klasyfikacji) członków [60-62]. Rodzina ta należy to większej grupy, nadrodziny ADP-rybozylotransferaz (ART, *ADP-ribosyltransferase*), katalizujących reakcję ADP-rybozylacji, czyli przeniesienia cząsteczki ADP-rybozy z NAD<sup>+</sup> (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, *nicotinamide adenine dinucleotide*) na inną docelową molekułę [63]. Wyróżnikiem rodziny PARP jest obecność domeny katalitycznej, która pod względem ułożenia przestrzennego, a także zbliżonego bądź identycznego składu aminokwasowego w miejscach kluczowych dla wiązania NAD<sup>+</sup> oraz samej aktywności katalitycznej białka, jest homologiczna z centrum katalitycznym w toksynie błoniczej wytwarzanej przez *Corynebacterium diphtheriae* [63]. Z tego też powodu rodzinę PARP nazywa się też ARTD (ADP-rybozylotransferazy podobne do toksyny błoniczej, *ADP-ribosyltransferase diphtheria-toxin like*) [63], zaś alternatywna nazwa dla PARP1, będącego przedmiotem niniejszej rozprawy, brzmi ARTD1 [62,64].

Rodzina PARP nie jest grupą jednorodną. W chwili obecnej wykazano aktywność enzymatyczną piętnastu z siedemnastu (bądź osiemnastu) odkrytych członków – PARP1, PARP2, PARP3, PARP4, PARP5a (tankyryza 1), PARP5b (tankyryza 2), PARP6, PARP7, PARP8, PARP10, PARP11, PARP12, PARP14, PARP15, PARP16 [60,62,64]. Z pozostałych dwóch (lub trzech) członków PARP9 i PARP13 nie wykazuje jakiegokolwiek aktywności enzymatycznej, zaś TPT1 (niekiedy

niewliczone do PARP) katalizuje odmienną reakcję, o czym będzie mowa dalej [64]. Ponadto z tych powyższych – PARP1, PARP2, PARP5a i PARPb katalizują reakcję parylacji, czyli przeniesienia spolimeryzowanej ADP-rybozy (PAR, *poly (ADP-ribose)*) na docelową molekułę (są więc PARP-ami *sensu stricto*), zaś pozostałe – reakcję marylacji, czyli przyłączenia monomeru ADP-rybozy (MAR, *mono (ADP-ribose)*) do cząsteczki docelowej, [63,64]. Z kolei spośród białek parylujących można wyróżnić dalsze dwie podgrupy: enzymów PARP1 i PARP2 zdolnych do tworzenia długich (obejmujących nawet do 200 merów ADP-rybozy) i heterogennych, rozgałęzionych łańcuchów PAR, oraz enzymów PARP5a i PARP5b, których produktami są łańcuchy PAR znacznie krótsze (mające średnio około 20 merów ADP-rybozy) i niezawierające rozgałęzień [62]. W przypadku tych ostatnich mówi się niekiedy o procesie oarylacji (oligo(ADP-rybozyl)acji) czy o przyłączaniu oligomerycznej ADP-rybozy (OAR, *oligo (ADP-ribose)*) [64,65].

Przy pojmowaniu grupy PARP w szerszym sensie i wliczeniu do niej osiemnastu białek wewnętrzna różnorodność jeszcze się zwiększa, ponieważ osiemnaste białko, TPT1 (*translationally-controlled tumor protein 1*), zwane też ARTD18, nie katalizuje ADP-rybozylacji, lecz pełni funkcję fosforylotransferazy RNA, wytwarzającej ADP-1-fosforan poprzez cykliczny produkt pośredni [62]. Ponadto, jak wspomniano wyżej, różny (choć bardzo zbliżony) jest skład aminokwasów położonych w miejscach kluczowych dla aktywności enzymatycznej białek – najczęściej w domenie znajduje się triada histydyna-tyrozyna-izoleucyna (6 enzymów), następnie histydyna-tyrozyna-glutamina (5 enzymów, w tym PARP1) oraz histydyna-tyrozyna-leucyna (2 enzymy); pozostałe białka posiadają inne, indywidualne triady aminokwasowe w centrum katalitycznym [62]. Różna jest także lokalizacja tych cząsteczek w komórce (podczas interfazy) – jedne znajdują się w cytoplazmie, drugie zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym (w różnych proporcjach); jedno białko (PARP1) znajduje się wyłącznie w jądrze komórkowym [64].

PARP1 (ARTD1), pierwsze odkryte białko z rodziny, które zidentyfikował w 1963 zespół prof. Pierre'a Chambona [66], jest najlepiej poznanym enzymem z tej grupy. W jego strukturze można wyróżnić trzy główne części (domeny).

Pierwsza domena, N-końcowa, nazywana domeną wiążącą DNA (DBD, *DNA-binding domain*), zawiera trzy palce cynkowe (Zn I, Zn II, Zn III – licząc od N-końca); pierwsze dwa zdolne są do wiązania się z DNA, co zmienia konformację PARP1 i zwiększa jego aktywność enzymatyczną, przy czym Zn I aktywuje enzym zarówno przez wiązanie się z miejscami jednoniciowego (ssDB, SSB, *single-strand break*), jak i dwuniciowego pęknięcia (dsDB, DSB, *double-strand break*), zaś Zn II – jedynie przez wiązanie się z SSBs [62,67,68]. Zn II oraz Zn III przedzielone są fragmentem, zwanym sygnałem lokalizacji jądrowej (NLS) warunkujący transport nowo powstałej cząsteczki PARP1 do jądra [68,69]. W NLS znajduje się sekwencja DEVD, którą rozpoznają kaspazy 3 i 7; enzymy te mogą w tym miejscu przeciąć białko na dwa mniejsze fragmenty, które można wykorzystać jako markery apoptozy [68]. Niektóre doniesienia jednak lokalizują miejsce cięcia przez kaspazy dopiero za Zn III [70]. Trzeci palec cynkowy, Zn III, uczestniczy w oddziaływaniach białko-białko i odgrywa ważną rolę w aktywacji PARP1 po związaniu się z DNA [68,69].

Domena centralna, zwana automodyfikacyjną (AD, *automodification domain*), jest bogata w reszty kwasu glutaminowego i lizyny, które są miejscem przyłączenia cząsteczek PAR [69]. AD zawiera ponadto położony bliżej N-końca motyw zamka leucynowego, odpowiadający za homo- lub heterodimeryzację cząsteczek PARP oraz leżącą bliżej C-końca domenę dla BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*), zwaną BRCT (*C-terminal domain of breast cancer protein BRCA1*), która oddziałuje z białkami uczestniczącymi w naprawie DNA [68]. Niektórzy do AD wliczają również, położoną jeszcze bliżej C-końca niż BRCT, domenę bogatą w tryptofan, glicynę i argininę (oznaczane literami WGR) [68]. Domena ta odpowiada oddziaływanie z kwasami nukleinowymi, Zn I, Zn III oraz domeną katalityczną PARP1 i ma kluczowe znaczenie w funkcjonowaniu tej ostatniej [68,69].

Na drugim skraju PARP1, w części C-końcowej białka znajduje się opisywana już wcześniej homologiczna dla całej rodziny PARP domena katalityczna (CD, *catalytic domain*) zawierająca konserwatywny rdzeń katalityczny z centrum katalitycznym odpowiedzialnym za poli(ADP-rybozyl)ację – to tutaj przyłącza się pierwsza cząsteczka ADP-rybozy, co jest punktem wyjścia do przyłączania kolejnych cząstek z wytworzeniem rozgałęzionych bądź łańcuchowych PAR [62,68]. Pamiętać należy, że produkty reakcji katalizowanych przez PARP1 mają krótki okres półtrwania i dość szybko dochodzi do degradacji przyłączonego PAR, w czym biorą udział m.in.

glikohydrolaza poli(ADP-rybozy) (PARG, *Poly (ADP-ribose) glycohydrolase*) bądź hydrolazy ADP-rybozy (ARHs, *ADP-ribosyl-acceptor hydrolases*) [67,69]. Parylacja, w tym autoparylacja, pełni ważną rolę w różnych funkcjach PARP1 – cząsteczki PAR są ujemnie naładowane; ich przyłączenie do PARP1 doprowadza do oddysocjowania białka od DNA i jego ekspozycję na inne aktywne biologicznie cząsteczki, w tym enzymy naprawcze [71,72]. Podobnie przyłączenie PAR do histonów powoduje rozluźnienie struktury chromatyny, co również ułatwia oddziaływanie DNA z różnymi molekułami [71]. Więcej na temat roli PARP1 w metabolizmie DNA będzie mowa dalej.

PARP1 może ulegać wielu modyfikacjom posttranslacyjnym. Poza wspomnianą już wyżej parylacją, skutkującą aktywacją białka, może ulegać fosforylacji, również aktywującej PARP1, które później może brać udział w procesach prowadzących do śmierci komórki [73]. Możliwa jest również acetylacja tego białka przy udziale acetylotransferaz p300/CBP i PCAF, przez co może ono wspomagać rozwój zapalenia za pośrednictwem NF- $\kappa$ B (o czym będzie jeszcze mowa dalej) [73]. Inne białko, SIRT1 (o którym również będzie mowa później), dokonuje deacetylacji PARP1, co osłabia proces zapalny [73]. Białko PARP1 może ulegać również sumoilacji i ubikwitynacji, przy czym te procesy pozostają wciąż słabo zbadane [73,74].

PARP1 pełni rozliczne funkcje w komórce – bierze udział w naprawie uszkodzeń DNA, specjalnym rodzaju śmierci komórki, współpracuje w utrzymaniu stabilności DNA z innymi białkami. Ponadto białko to uczestniczy w regulacji struktury chromatyny, metylacji DNA, regulacji transkrypcji (a przez to np. w rozwoju procesu zapalnego czy różnicowaniu komórek), wreszcie odgrywa również rolę w nowotworzeniu – również w znacznym stopniu poprzez regulację transkrypcji genów dla różnych białek. Funkcje te zostaną omówione w poniższych akapitach.

### **1.6.1. PARP1 a naprawa uszkodzonego DNA**

Można wyróżnić dwa podstawowe rodzaje uszkodzeń w obrębie DNA, o których wspomniano już wcześniej – pęknięcia jednoniciowe (SSBs, ssDBs, *single-strand breaks*) i dwuniciowe (DSBs, dsDBs, *double-strand breaks*) [75]. Te pierwsze mogą być usunięte na jeden z trzech następujących sposobów: 1) naprawę przez wycięcie (uszkodzonej) zasady (BER, *base excision repair*), 2) naprawę błędnie

sparowanych nukleotydów (MMR, *mismatch repair*), 3) naprawę przez wycięcie nukleotydów (NER, *nucleotide excision repair*) [75,76]. Te drugie z kolei mogą zostać naprawione bądź na drodze rekombinacji homologicznej (HR, *homologous recombination*; HDR, *homology-directed repair*) bądź też niehomologicznego łączenia końców DNA (NHEJ, *non-homologous end joining*) [75,76]. NHEJ podzielić można jeszcze na dwa podtypy – klasyczny NHEJ, zwany też kanonicznym NHEJ (c-NHEJ) bądź NHEJ zależnym od kinazy zależnej od DNA (D-NHEJ) oraz alternatywny NHEJ (a-NHEJ, *alternative NHEJ*), zwany też łączeniem końców w oparciu o mikrohomologię (MMEJ, *microhomology-mediated end-joining*) bądź zapasowym NHEJ (B-NHEJ, *backup NHEJ*) [72,77,78]. PARP1 pełni ważną rolę w niektórych z wyżej wymienionych, mianowicie w BER, NER, a także B-NHEJ i w pewnym stopniu również w D-NHEJ oraz HR [62,72].

Naprawa SSBs na drodze BER zaczyna się od wykrycia ich przez PARP1 z następczym związaniem się z nimi, po czym dochodzi do przyłączenia PAR (autoparylacji) do PARP1 z następczą aktywacją białka i przyłączeniem PAR do innych, docelowych białek [72]. Dochodzi do rekrutacji białka XRCC1, będącego swoistym rusztowaniem dla białek biorących udział w naprawie SSB, a mianowicie dla ligazy DNA 3 (LIG3, *DNA ligase 3*), aprataksyny oraz dwufunkcyjnego białka, kinazy/fosfatazy polinukleotydowej (PNKP, *bifunctional polynucleotide kinase 3'-phosphatase*) [72]. Należy tutaj zauważyć, że do rekrutacji XRCC1 do SSB jest zdolne zarówno PARP1, jak i PARP2 [72]. Następnie dochodzi do wypełnienia ubytku w DNA przez polimerazy  $\delta$ ,  $\epsilon$  oraz  $\beta$ , a także aktywowania stymulowanej przez PARP1 flap endonukleazy 1 (FEN1, *flap endonuclease 1*) [72]. Endonukleaza ta usuwa powstające w toku naprawy tzw. odsłonięte nici kwasu nukleinowego (*flaps*) [79]. W końcu dochodzi do procesu ligacji katalizowanego przez ligazę DNA 1 (LIG1) [72]. Podkreślenia wymaga fakt, że istnieją doniesienia podważające rolę PARP1 w BER – niekiedy delecja czy inhibicja PARP1 nie wiązały się ze zwiększoną wrażliwością na substancje upośledzające BER, w innych przypadkach obecność nieaktywnego katalitycznie PARP1 spowalniała proces BER [72]. Z drugiej jednak strony nie ulega wątpliwości, że PARP1 jest niezbędne w naprawie SSBs; stawia się więc hipotezę, że PARP1 nie bierze udziału w początkowych stadiach BER, niemniej jest kluczowe dla kolejnych kroków, polegających na naprawie SSBs [72]. Wreszcie twierdzi się, że PARP1 bierze udział w procesie BER w przypadkach uszkodzenia



zasad purynowych, natomiast naprawa uszkodzonych zasad pirymidynowych jest niezależna od tego białka [72].

PARP1 bierze udział również w naprawie SSBs na drodze innego mechanizmu, NER, a konkretniej jego głównego podtypu, globalnej NER genomu [72]. Wykorzystana zostaje tutaj głównie zdolność białka do remodelingu chromatyny [72]. PARP1 rekrutuje początkowo kompleks białek DDB1-DDB2 (*damage-binding protein 1, damage-binding protein 2*), a następnie helikazę zwaną ALC1 bądź CHD1L [72]. Następuje później rekrutacja białka XPC (*xeroderma pigmentosum group C-complementing protein*) oraz RAD23B wraz z ubikwitynylacją histonów przez powstały kompleks XPC-RAD23B-DDB1-DDB2, co skutkuje rozluźnieniem chromatyny [72]. Warto tu podkreślić, że w wiązaniu się białka XPC do miejsc uszkodzenia DNA ważną rolę odgrywa interakcja XPC z PARP1 [72]. Dekondensacja chromatyny może także dokonać się bez procesu ubikwitynylacji – alternatywna ścieżka jest zawiadywana przez PARP1; białko to bowiem, aktywowane poprzez interakcję z DDB2 dokonuje parylacji histonów oraz rekrutuje wspomnianą wcześniej helikazę ALC1 (CHD1L) [72]. Po rozluźnieniu chromatyny PARP1, poprzez wiązanie XPA, rekrutuje kolejne białka, XPB i XPD; dalsze etapy naprawy DNA są niezależne od PARP1.

W przypadku DSBs, niezależnie od mechanizmu, w jakim zostaną one naprawione, musi najpierw dojść do ich wykrycia, czego dokonuje PARP1, które jednocześnie oddziałuje z białkami MRE (*meiotic recombination 11*) oraz kinazą ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) [72]. To umożliwia zainicjowanie dalszych procesów naprawczych – NHEJ (klasyczne bądź alternatywne) lub HR [72]. Na tej inicjacji rola PARP1 jednak się nie kończy.

W przypadku HR białko to rekrutuje wyżej wspomniane MRE11 do DSBs, po czym następuje wiązanie się białka RPA (replication protein A) do pojedynczych nici DNA, do którego wymagana jest obecność białka BRCA1; białko to może być rekrutowane przez PARP1 za pomocą domeny BARD1 (inaczej BRCT), omówionej wcześniej [72]. Białko PARP1 dokonuje parylacji BRCA1, a to z kolei wiąże się z białkiem RAP80 (*receptor-associated protein 80*); dzięki tym interakcjom dochodzi do supresji HR, przez co proces naprawy ograniczony jest tylko do tych miejsc w DNA, gdzie jest rzeczywiście potrzebny [72].

W przypadku D-NHEJ rola PARP1 opiera się na interakcji z podjednostką katalityczną kinazy zależnej od DNA [72]. Tradycyjnie uważa się, że podjednostka ta ulega aktywacji przez dimery białek KU70-KU80 wiążące się z DSBs; niemniej wydaje się, że PARP1 jest zdolne do aktywacji podjednostki bez udziału KU70-KU80 [72]. Inną rolą PARP1 w D-NHEJ jest udział w remodelingu chromatyny poprzez rekrutację helikazy CHD2, która następnie rekrutuje inne cząsteczki uczestniczące w dalszych fazach D-NHEJ [72].

Wreszcie PARP1 bierze udział w B-NHEJ, będącej procesem podrzędnym w stosunku do D-NHEJ i aktywnym wtedy, gdy D-NHEJ z jakiegoś powodu nie zachodzi [72]. Rola tego białka polega na rekrutacji MRE11 do DSBs, jak to ma miejsce w RH; być może PARP1 uczestniczy także w rekrutacji polimerazy  $\theta$  na dalszych etapach B-NHEJ [72].

### 1.6.2. PARP1 a parthanatos

PARP1 zaangażowane jest w szczególnie rodzaj programowanej śmierci komórki, zwany *parthanatos* [80]. Jest to o tyle zaskakujące, że białko to uczestniczy, jak wspomniano wyżej, w naprawie DNA, a więc powinno śmierci komórki zapobiegać. Jednakże gdy dochodzi do znacznego nagromadzenia uszkodzeń w obrębie DNA i wtórnego znacznego nasilenia procesu parylacji, następuje *parthanatos* [81]. Czynnikiem wywołującym uszkodzenia DNA prowadzące do śmierci komórki mediowanej przez PARP1 może być różny – od alkilacji DNA poprzez stres oksydacyjny, hipoksję, hipoglikemię, a na procesie zapalnym kończąc [80]. Wyróżnikami tego procesu są 1) niezależność od kaspaz, 2) depolaryzacja błony mitochondrialnej z wtórnym uwalnianiem reaktywnych form tlenu, 3) zależność od jonów wapnia, 4) niezależność od działającego cytoprotekcyjnie Bcl-2, 5) synergizm pomiędzy PARG a PARP1 w regulacji śmierci komórki [81].

Przebieg *parthanatos* jest następujący: początkowo dochodzi do znacznych uszkodzeń (pęknięć) DNA wywołanych przez czynnik uszkodzający; do tych uszkodzeń przyłącza się PARP1, które ulega aktywacji [81]. Zużywając  $\text{NAD}^+$ , wytwarza PAR, będące znacznikami miejsc pęknięć w DNA [81]. Jednocześnie na te znaczniki oddziałują enzymy PARG oraz ARH3, odcinając od nich mniejsze polimery PAR [81]. Polimery opuszczają jądro komórkowe i ulegają translokacji do mitochondriów, powodując uwolnienie AIF (*apoptosis inducing factor*, czynnik

indukujący apoptozę) do cytozolu i wędrówkę w kierunku jądra komórkowego [81]. W jaki sposób AIF ulega uwolnieniu z mitochondrium, wciąż nie jest wyjaśnione; postuluje się, że następuje to wskutek depolaryzacji błony mitochondrialnej (poprzez bezpośrednie zużywanie NAD<sup>+</sup> przez PARP1 bądź pośrednio poprzez wiązanie i hamowanie heksokinazy, biorącej udział w glikolizie) lub też bezpośredniej interakcji z C-końcem AIF zakotwiczonego w błonie [81]. AIF uwolnione do cytozolu wiąże się z MIF (*macrophage migration inhibitory factor*, czynnik hamujący migrację makrofagów) i wspólnie z nim migruje do jądra i powoduje fragmentację DNA; równolegle dochodzi również do kondensacji chromatyny [80,81].

Sądzi się, że zjawisko *parthanatos* jest elementem patogenezы wielu chorób, m.in. patologii układu sercowo-naczyniowego, nerek, cukrzycy, udaru mózgu czy chorób neurodegeneracyjnych [80]. Najnowsze doniesienia wskazują także na udział tego procesu w rozwoju chorób zapalnych układu oddechowego, np. przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP, COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*) [82].

Warto tutaj również zaznaczyć, że choć *parthanatos* jest sztandarowym rodzajem śmierci komórkowej, w której uczestniczy PARP1, to białko to też odgrywa pewną rolę w apoptozie. Mianowicie, jak wspomniano wyżej, enzym cięty jest ściśle określonym miejscu DBD przez kaspazy. To przecięcie sprawia, że N-końcowa część (wiążąca DNA i zawierająca fragment NLS) ulega odseparowaniu katalitycznej, C-końcowej części – naprawa DNA przez PARP1 staje się mniej skuteczna, co dodatkowo napędza już rozpoczęty proces apoptozy [70].

W ostatnich latach, wraz z rozwojem wiedzy na temat różnych mechanizmów śmierci i adaptacji komórkowej, zauważono, że PARP1 bierze udział również w innych procesach, jak nekroptoza czy autofagia [83].

### **1.6.3. PARP1 a sztucznie indukowana letalność (*synthetic lethality*, SL)**

Ważnym aspektem związanym z PARP1 jest koncepcja sztucznie indukowanej letalności (SL), która to pojawiła się w toku badań nad *Drosophila* [84]. Dotyczy ona współzależności co najmniej dwóch genów, przy czym produkt jednego z tych genów ma kluczowe znaczenie dla przeżycia komórki – gdy ten gen przestaje pełnić swoją funkcję, inny ze współzależnych genów kompensuje utratę tej funkcji

[84,85]. W przypadku jednak, gdy dochodzi do utraty funkcji obu bądź wszystkich współzależnych genów (czy to na skutek delecji czy hamowania działania produktów tych genów), następuje na tyle mocne zakłócenie funkcjonowania komórki, że dochodzi do jej śmierci [84,85]. Leland Hartwell był jedną z pierwszych osób, które podjęły próbę przeniesienia tej koncepcji na przedpole praktyki klinicznej, mianowicie założył, że mutacje w pojedynczych kluczowych genach dla komórki (związanych z naprawą DNA czy regulacją cyklu komórkowego) mogą uwrażliwiać komórkę na działanie określonych leków [86]. I tak, badając wyselekcjonowane komórki drożdży z pojedynczą mutacją, stwierdził, że te, które posiadały uszkodzenie w obrębie genu naprawy postreplikacyjnej, były bardziej wrażliwe na działanie cisplatyny, zaś te, w których uszkodzony był gen związany z naprawą DSBs, były bardziej wrażliwe na mitoksantron [86]. Biorąc pod uwagę wyniki swoich badań i koncepcję SL, Hartwell zasugerował poszukiwanie u pacjentów chorych na nowotwory par kluczowych, współzależnych genów w komórkach nowotworowych, tak aby w danej parze jeden gen był już uszkodzony, a drugi mógł być celem terapeutycznym dla określonego leku; po aplikacji leku dochodziłoby do wyłączenia drugiego genu, a przez to wyindukowania śmierci komórek nowotworowych u danego chorego [86].

Taką potencjalną parę stanowią PARP1 oraz BRCA1/2. Białka BRCA1 oraz BRCA2 biorą udział w naprawie uszkodzonego DNA na drodze HR [87]. Jest to, jak już wspomniano wyżej, jedna z dwóch głównych dróg (obok NHEJ) naprawy DSBs [87]. Zaburzenie funkcjonowania białek BRCA1 bądź BRCA2 powoduje upośledzenie naprawy DSBs (samo NHEJ nie działa w tym wypadku dostatecznie wydajnie), a w konsekwencji zwiększoną podatność na powstawanie mutacji i ogólną niestabilność genomu [85,87]. Dodatkowa inhibicja PARP1, który z kolei bierze udział w naprawie SSBs poprzez wycinanie zasad azotowych zwiększa jeszcze bardziej niestabilność genomu – nienaprawione SSBs kumulują się i powstają DSBs, których naprawa już była upośledzona; gromadzące się DSBs ostatecznie doprowadzają do zahamowania cyklu komórkowego i w rezultacie do śmierci komórki [85]. Fenomen ten jest już wykorzystywany w praktyce klinicznej w wybranych nowotworach posiadających mutację w obrębie BRCA1/2 (w takich przypadkach dochodzi do uwrażliwienia na działanie inhibitorów PARP1, a więc wskazane jest ich zastosowanie), o czym będzie mowa w dalszych podrozdziałach.

Warto również wspomnieć o terminie *BRCA-ness*, który oznacza, że dana komórka nie posiada mutacji w obrębie genu BRCA1/2, lecz w innych genie, którego mutacja wywołuje efekty takie, jak klasyczna mutacja BRCA1/2 – z upośledzeniem rekombinacji homologicznej i wrażliwością na działanie PARP1 (a więc możliwością sztucznej indukcji letalności) włącznie [88]. Przykłady genów, którym można przypisać tą właściwość, to m.in. ATM, ATR, BAP1, CDK12, CHEK2, PALB2, RAD51B, RAD51C, RAD51D czy BRIP1 [89]. Biorąc pod uwagę, że fenotyp *BRCA-ness* może dotyczyć nawet ok. 30% przypadków czerniaka skóry [90] i w pewnych przypadkach też czerniaka błony naczyniowej oka (np. mutacja genu BAP1 występuje w ok. 40% przypadków tego nowotworu [46]), wydaje się uzasadnione stosowanie inhibitorów PARP1 w tych przypadkach, gdzie wykazano fenotyp *BRCA-ness*. Z tego też powodu są prowadzone bądź planowane są badania kliniczne podejmujące to zagadnienie, o czym będzie mowa później.

#### **1.6.4. Rola i udział PARP1 w innych, wybranych procesach cytofizjologicznych**

PARP1, o czym nadmieniano już wcześniej, bierze udział w regulacji struktury chromatyny. Jest to proces ułatwiający naprawę uszkodzonego DNA [72]. Aktywowane i autoparylowane białko PARP1 dokonuje m.in. parylacji histonów H1 i H2B, co skutkuje rozluźnieniem chromatyny i rozpadem nukleosomów [72,73]. PAR wytwarzane przez PARP1 umożliwiają rekrutację dalszych białek, z których część dodatkowo wspomaga rozluźnianie chromatyny, a część hamuje procesy transkrypcji w okolicach uszkodzonego DNA, aby ułatwić jego naprawę [72].

Inną funkcją białka bezpośrednio związaną z DNA (obok jego naprawy i regulacji struktury chromatyny) jest wpływ na jego metylację. Wyraża się on poprzez hamowanie ekspresji i aktywności metylotransferazy DNA 1 (DNMT1), wskutek czego procesy metylacji DNA ulegają osłabieniu [73].

Poza wyżej wymienionymi funkcjami, należy wymienić jeszcze udział PARP1 w rozwoju procesu zapalnego. Zauważono, że białko to (jak również PARP2) poprzez pobudzający wpływ na NF-κB sprzyja rozwojowi zapalenia [91]. Dodatni wpływ na NF-κB opiera się na wzmaganiu jego transkrypcji [92]. Prozapalne działanie PARP1 jest ograniczane przez przeciwwstawnie działające białko, sirtuinę 1 (SIRT1) [91]. Oba te białka regulują wzajemnie swoje działanie na kilku poziomach – przez konkurencję o NAD<sup>+</sup> (będący substratem dla obu związków), wzajemną

modyfikację (PARP1 paryluje i aktywuje SIRT1, zaś SIRT1 deacetyluje i hamuje PARP1), regulację transkrypcji (białka wzajemnie hamują swoją transkrypcję) oraz przeciwwstawny wpływ na określone białka, np. czynniki transkrypcyjne FOXO i PGC-1 $\alpha$  (w przypadku PARP1 hamujący, zaś w przypadku SIRT1 – aktywujący) [91]. Ponadto, interakcja PARP1-SIRT1 wydaje się odgrywać rolę w chorobach metabolicznych i tych związanych ze starzeniem się organizmu [91].

PARP1 uczestniczy także w procesach różnicowania komórek macierzystych. Mianowicie, w odpowiedzi na określone bodźce, białko to paryluje czynnik transkrypcyjny SOX2, co skutkuje zwiększoną ekspresją genu kodującego czynnik wzrostu fibroblastów 4 (FGF4) [73].

#### **1.6.5. Rola PARP1 w karcinogenezie**

Wiele z wyżej wspomnianych funkcji PARP1 (udział w naprawie DNA, promowanie procesów zapalnych) klasycznie łączy się z karcinogenezą [93]. Wyżej wymienione nie wyczerpują jednak w pełni obecnego stanu wiedzy na temat roli PARP1, w związku z czym omówione zostanie jeszcze kilka zagadnień z tym związanych. Zostaną tu podkreślone zagadnienia związane z karcinogenezą jako taką z wyłączeniem melanomogenezy, która zostanie dokładniej opisana w części poświęconej dyskusji.

PARP1 wpływa na transkrypcję różnych onkogenów i białek supresorowych. Można tu wymienić sztandarowy supresor, p53, w kompleksie z którym blokuje ekspresję białka MTA1 zaangażowanego w progresję nowotworu i przerzutowanie [94]. PARP1 odgrywa również rolę w prawidłowym funkcjonowaniu p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA przez, na przykład, promieniowanie rentgenowskie – w przypadku inhibicji PARP1 odpowiedź ta (zatrzymanie cyklu komórkowego bądź wywołanie apoptozy) jest upośledzona [94].

Z drugiej jednak strony w badaniach nad rakiem jelita grubego wykazano, że PARP1 ulega zwiększonej ekspresji i ma podwyższoną aktywność, co wiąże się ze zwiększoną aktywnością czynników transkrypcyjnych z rodziny TCF/LEF, które pełnią ważną rolę w rozwoju tego nowotworu [94]. W innym badaniu analizującym komórki raka prostaty wykazano, że PARP1 nasila transkrypcję różnych

proonkogenów, m.in. E2F1, który aktywuje czynniki uczestniczące w naprawie DNA na drodze HR [95].

Rolę proonkogenną PARP1 wykazuje także przy interakcji z niektórymi onkogennymi genami fuzyjnymi obecnymi w różnych nowotworach, np. TMPRSS2-ERG w raku prostaty czy EWS-FLI1 oraz EWS-ERG w mięsaku Ewinga. We wszystkich tych przypadkach interakcje wiążą się z progresją nowotworu, zaś hamowanie PARP1 ograniczało inwazyjność i zdolność do przerzutowania rozrostu nowotworowego [94].

Jak więc widać, wpływ PARP1 na transkrypcję bądź działanie onkogenów i supresorów, a przez to na progresję nowotworu, jest wciąż niejasny. To, który wpływ PARP1 przeważy – pro- czy też antyonkogenny, zależy od konkretnej sytuacji i wymaga dalszych badań [94].

PARP1 bierze udział w wieloczynnikowej regulacji przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT), uznawanego za kluczowy proces umożliwiający przerzutowanie nowotworu [94]. Wiadome jest, że PARP1 reguluje ekspresję kadheryny E, wimentyny i fibronektyny [94]. Pośrednio wzmacnia ekspresję tej pierwszej, a hamuje ekspresję tej drugiej, co hamuje EMT, zaś poprzez hamowanie ekspresji tej ostatniej sprzyja EMT [94]. Ponadto PARP1 hamuje aktywność transkrypcyjną HOXB7 (hamując EMT) oraz hamując ekspresję jednego z receptorów dla TGF- $\beta$  (również utrudniając EMT) [94]. Jak więc widać, PARP1 uczestniczy w przeciwwstawnych procesach i obecnie nie wiadomo, jaki jest efekt netto tego oddziaływania, tj. czy EMT jest pobudzane czy też hamowane przez PARP1; wymaga to dalszych badań [94].

PARP1 reguluje również odpowiedź komórek na niedotlenienie, a także angiogenezę. Wykazano, że białko to dodatnio oddziałuje na ekspresję i działanie czynników HIF1 $\alpha$  oraz HIF2 $\alpha$ , sprzyjając m.in. lepszemu ukrwieniu komórek (w tym nowotworowych) [94]. Inny mechanizm, w którym PARP1 oddziałuje dodatnio na angiogenezę, wykryto w przypadku raka jajnika, gdzie białko to zwiększało ekspresję czynnika VEGF-A [96].

Istnieją dowody na to, że PARP1 wpływa na metabolizm komórkowy. Wykazano bowiem interakcję tego białka z jądrowym czynnikiem oddechowym 1

(NRF1, *nuclear respiratory factor*) uczestniczącym w wielu procesach metabolicznych w komórce. NRF1 reguluje bowiem ekspresję genów dla elementów składowych mitochondrialnego łańcucha oddechowego (tych genów, które są zlokalizowane w jądrze), ponadto bierze udział w translacji i metabolizmie białek, syntezie i naprawie DNA oraz proliferacji komórkowej [97,98]. Interakcja pomiędzy PARP1 a NRF1 przebiega w ten sposób, że z jednej strony NRF1 zdolne jest do wiązania się jednocześnie z DNA i PARP1, a z drugiej strony PARP1 paryluje NRF1, co hamuje wzajemne oddziaływanie tych dwóch białek [94]. Ponadto wykazano, że PARP1 zapewnia optymalną transkrypcję genów, które są celem działania NRF1 [94].

PARP1 odgrywa również rolę w patogenezie nowotworów hormonozależnych – raka piersi i prostaty [94]. W tym pierwszym jest pozytywnym regulatorem zarówno dla receptora estrogenowego  $\alpha$ , jak i  $\beta$ , przy udziale topoizomerazy II $\beta$  [94]. Ponadto PARP1, łącząc się z kinazą 2 zależną od cyklin (CDK2), tworzy kompleks regulujący procesy inicjowane na poziomie receptora progesteronowego [94]. W przypadku raka prostaty PARP1 działa aktywująco na receptor dla androgenów, a także reguluje aktywność czynników transkrypcyjnych z rodziny ETS [94].

Pojawiają się również badania nad wpływem PARP1 na działanie układu odpornościowego w środowisku komórek nowotworowych. Wykazano, że PARP1 dokonuje parylacji czynnika transkrypcyjnego STAT3, przez co w komórkach nowotworowych zmniejsza się ekspresja PD-L1 [99]. Wspominano już wcześniej, że PD-L1 zmniejsza aktywację limfocytów T; tak więc spadek jego ekspresji wiązałby się ze skuteczniejszym zwalczaniem nowotworu przez układ immunologiczny.

Dość liczne są doniesienia na temat roli PARP1 w generowaniu oporności nowotworu na leczenie, w tym na radioterapię. Jednym z mechanizmów jest omawiany wcześniej wpływ PARP1 na NF- $\kappa$ B. Czynniki te, w sytuacji uszkodzenia DNA, oddziałuje na geny hamujące apoptozę, zapobiegając śmierci komórki [94]. PARP1 wspiera tutaj ów czynnik, przyczyniając się do rozwoju oporności komórek nowotworowych na radioterapię; zdolność PARP1 do wspierania naprawy DNA nie odgrywa w tym procesie żadnej roli [100].

Inny mechanizm rozwoju radiooporności, dotyczy symportera sodowo-jodowego (NIS) w raku tarczycy. Nie jest on do końca wyjaśniony, niemniej



stwierdzono, że PARP1 blokuje promotor genu dla NIS, co skutkuje obniżoną ekspresją i aktywnością tego symportera [94]. Skutkiem tego może być oporność komórek raka tarczycy na terapię radiojodem; zastosowanie w tym przypadku inhibitora PARP1 mogłoby poprawić wrażliwość nowotworu na ten rodzaj leczenia [94].

W innym badaniu wykazano, że spadek aktywności PARP1 (poprzez zastosowanie jego inhibitora) wiązał się z obniżoną ekspresją białek BRCA1 i RAD51 [94]. W procesie tym zasadniczą rolę odgrywa kompleks E2F4/p130, który wpływa hamująco na ekspresję białek BRCA1 i RAD51; w normalnych warunkach to działanie jest hamowane przez PARP1, natomiast przy zastosowaniu inhibitora PARP1 kompleks E2F4/p130 przyłącza się do określonych miejsc regulatorowych w DNA, hamując transkrypcję BRCA1 i RAD51 [94]. Ponieważ białka BRCA1 i RAD51 biorą udział w naprawie DNA (stanowią elementy składowe wcześniej wspomnianego *BRCA-ness*), które może również być uszkodzone przez promieniowanie rentgenowskie, ich wspieranie przez PARP1 jest kolejnym mechanizmem prowadzącym do radioodporności.

Jeszcze inne badanie, przeprowadzone nad komórkami raka nosogardła wykazało, że PARP1 na drodze szlaku AMPK/mTOR aktywuje procesy autofagii, co zmniejsza wrażliwość nowotworu na radioterapię [101]. Zastosowanie inhibitora PARP1 wiązało się z uwrażliwieniem komórek raka na promieniowanie [101].

Podwyższone stężenia PARP1 bądź jego przetrwała aktywacja powodują oporność nowotworu także na chemioterapię. Wykazano na przykład, że w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc zwiększona ekspresja PARP1 wiązała się z opornością na związki platyny, zaś w komórkach glejaka wielopostaciowego konstytucyjna nadmierna aktywność białka związana była zarówno z opornością na temozolomid, jak i progresją nowotworu [102]. Ten mechanizm oporności wiąże się przede wszystkim ze zdolnościami PARP1 do naprawy DNA [102].

PARP1 może przyczyniać się do rozwoju oporności również na hormonoterapię. Na przykładzie raka piersi wykazano bowiem, że leczenie tamoksyfenem wiązało się z wyindukowaniem parylacji receptora estrogenowego  $\alpha$ , zawiadywanej przez PARP1, a w konsekwencji rozwojem oporności na działanie

tamoksyfenu [103]. Zastosowanie w takiej sytuacji inhibitora PARP1 powodowało przełamanie tej oporności [103].

Ostatni wymieniony aspekt, tj. rolę w rozwoju oporności na różne formy terapii, zainspirował wiele badań nad rolą inhibitorów PARP1 w ich potencjacji. Więcej mowy o tym będzie w następnym podrozdziale.

#### **1.6.6. Aktualny stan wiedzy na temat prowadzonych badań nad zastosowaniem inhibitorów PARP1 w praktyce klinicznej**

Ostatnie lata badań zaowocowały opracowaniem pewnej liczby związków chemicznych, które docelowo wpływają na PARP1 i w pewnych przypadkach również na inne białka z tej rodziny. Grupę tych związków nazywa się inhibitorami PARP (PARP-i). Kilka z nich osiągnęło na tyle zadowalające wyniki w badaniach klinicznych (olaparyb, rukaparyb, niraparyb, talazoparyb), że FDA wydało zezwolenie na ich stosowanie w onkologii klinicznej. Leki te znajdują zastosowanie przede wszystkim w niektórych typach raka jajnika, jajowodu czy pierwotnego raka otrzewnej (na tą grupę rozpoznań będę dalej stosował skrót OFTPPC – *ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer*), a niekiedy także w raku piersi. Często ich aplikacja jest uwarunkowana stwierdzeniem mutacji w obrębie genów BRCA1 czy BRCA2, co ma swoje uzasadnienie w wyżej umówionej współzależności BRCA i PARP1 oraz związanym z tym zjawiskiem SL. Dalsze kilka leków (pamiparyb, weliparyb) wciąż znajduje się w fazie badań klinicznych, które mogą w przyszłości poszerzyć arsenał leków w wyżej wymienionych nowotworach, bądź też poszerzyć wskazania już stosowanych inhibitorów PARP o kolejne typy nowotworów narządowych.

Opisuje się głównie dwa mechanizmy, na drodze których PARP-i interferują z docelowym białkiem. Pierwszym z nich jest zakłócanie cyklu katalitycznego (parylacji), w jakim uczestniczą PARP [62]. PARP-i mianowicie konkurują z substratem enzymu (NAD<sup>+</sup>) o miejsce w centrum katalitycznym, prowadząc do inhibicji kompetencyjnej białka [104]. Drugim mechanizmem jest tzw. *trapping*, czyli blokowanie, uwięzienie białka, które przyłączyło się do DNA w miejscu jego uszkodzenia [62]. Blokowanie to uniemożliwia autoparylację PARP, a tym samym następcze odłączenie się białka, by zapewnić miejsce dla działania białek naprawiających uszkodzone DNA [62]. Pod względem siły *trappingu* PARP-i nie są równocenne; przykładowo olaparyb i rukaparyb blokują PARP najslabiej, niraparyb

w mocniejszym stopniu, zaś talazoparyb wiąże białko docelowe ok. 100 razy mocniej niż niraparyb [62]. Weliparyb z kolei, zdolny do blokowania parylacji, w bardzo niewielkim stopniu zdolny jest do *trappingu*. Wydaje się, że to właśnie drugi mechanizm, *trapping*, przede wszystkim odpowiada za efekt cytotoksyczny wywołany przez PARP-i; przemawia za tym m.in. fakt, że talazoparyb, najsilniej blokujący PARP w jego połączeniu z DNA, wykazuje jednocześnie najsilniejszą cytotoksyczność [104].

Pierwszym PARP-i wprowadzonym do szerszego użytku jest olaparyb, będący inhibitorem PARP1, PARP2 i PARP3 [75]. Zatwierdzony został przez FDA pod koniec 2014 roku, którego wskazania rozszerzano w kolejnych latach [105]. Obecnie stosowany jest w wybranych przypadkach OFTPPC oraz raka piersi [105,106]. W Polsce dostępny jest głównie dla pacjentek z OFTPPC w ramach programu lekowego numer B.80, będąc jednocześnie jedynym refundowanym PARP-i [55].

Drugim PARP-i jest rukaparyb, inhibitor PARP1 i PARP2, zatwierdzony w roku 2016 przez FDA do stosowania w wybranych przypadkach OFTPPC [75,105,107].

Kolejnym PARP-i dopuszczonym do obrotu jest niraparyb, będący również inhibitorem PARP1 i PARP2 [75]. Zgodę na jego stosowanie FDA wyraziło w roku 2017 [105]. Podobnie jak w poprzednim przypadku, stosowany jest u wyselekcjonowanych pacjentek z OFTPPC [105,108].

Najnowszym przedstawicielem PARP-i dopuszczonym do praktyki klinicznej jest talazoparyb, działającym hamująco wyłącznie na PARP1 [75]. Lek ten, zatwierdzony w 2018 roku przez FDA, jest wskazany jako monoterapia u wybranych osób ze diagnozą raka piersi [109].

Pamiparyb jest inhibitorem PARP1 i PARP2, wciąż niedostępnym w szerszej praktyce klinicznej [110]. Prowadzony jest nad nim szereg badań w stosowaniu go w monoterapii raku prostaty, jajnika, *carcinosarcoma*, raku piersi (w tym potrójnie negatywnym), zaawansowanym bądź nieoperacyjnym raku żołądka czy zaawansowanych nowotworach litych w ogóle [111-117]. Trwają także badania kliniczne nad terapią łączoną z tislelizumabem (przeciwciałem skierowanym przeciwko PD-1 [110]) w zaawansowanych nowotworach litych [118], temozolomidem w glejakach (w każdym stopniu wg klasyfikacji WHO, ze

szczególnym naciskiem na stopnie II, III oraz IV) czy innych nowotworach litych [119-121] a także z radioterapią i/lub temozolomidem w *glioblastoma* [122].

Weliparyb jest inhibitorem zarówno PARP1, jak i PARP2 [75]. Nad związkiem tym prowadzono i prowadzonych wciąż jest wiele badań i nie sposób wymieni ich wszystkich. Ograniczę się do wspomnienia części z tych, które są w toku; skupiają się one zasadniczo na stosowaniu weliparybu w połączeniu z innymi terapiami (chemioterapią, radioterapią, leczeniem celowanym bądź w kombinacjach, w zależności od standardowych protokołów) w bardzo szerokim spektrum nowotworów, np. raku piersi [123-131], OFTPPC [132-135], nowotworach zarodkowych jądra [136], raku trzustki [137-140], nowotworach ośrodkowego układu nerwowego [141,142], różnymi postaciami ostrej białaczki czy zespołów mieloproliferacyjnych [143-145], drobnokomórkowym bądź niedrobnokomórkowym raku płuca [146-148] czy wreszcie rakiem gruczołu krokowego [149].

Podjęmowanych jest wiele badań nad PARP-i zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z innymi formami terapii (w tym także różnego rodzaju przeciwciałami czy lekami celowanymi). Omówienie ich wszystkich przekracza zakres niniejszej rozprawy, w związku z czym ograniczę się do odesłania do kilku źródeł [104,150,151], a jedynie więcej miejsca poświęcę badaniom nad PARP-i w kontekście czerniaka.

Zakończonych badań dotyczących wyłącznie bądź głównie czerniaka jest niewiele; zalicza się do nich opublikowane w 2015 roku badanie pacjentów z nieresekcyjnym lub przerzutowym czerniakiem, których poddawano leczeniu weliparybem z temozolomidem lub samym temozolomidem [152]. Po kilkuletniej obserwacji nie stwierdzono statystycznie znaczącego wydłużenia PFS ani OS, ponadto w grupie z łączoną terapią częściej stwierdzano działania niepożądane w porównaniu do grupy leczonej jedynie temozolomidem [152].

W przeszłości przeprowadzono ponadto badanie kliniczne I fazy nad terapią łączoną olaparybu z dakarbazyną nad różnymi nowotworami, w tym czerniakiem w którym zaobserwowano jedynie częściową odpowiedź na leczenie u dwóch pacjentów – obie osoby miały zdiagnozowanego czerniaka [153]. Należy jednak zaznaczyć, że w badaniu uczestniczyły aż 33 osoby z rozpoznaniem *melanoma*, w związku z czym uzyskane rezultaty nie są satysfakcjonujące [153].

Choć dotychczasowe wyniki badań nie są zadowalające, to jednak podejmowane są dalsze próby leczenia czerniaka za pomocą PARP-i. Obecnie toczy się kilka badań na tym obszarze (część w fazie planowania, część w fazie rekrutacji, część w dalszych fazach).

Wymienić tu należy badanie nad olaparybem u pacjentów z przerzutowym czerniakiem, niewykazujących mutacji w genach BRAF i NRAS, a wykazujących aberracje genetyczne w genach dla BRCA1, BRCA2 lub ATM oraz jednocześnie nietolerujących standardowej immunoterapii bądź nieodpowiadających na nią, po tym jak leczenie standardową immunoterapią okaże się nieskuteczne bądź źle tolerowane [154].

Inne badanie skupia się na zastosowaniu niraparybu u pacjentów z przerzutowym czerniakiem, u których wykazano mutacje w genach białek uczestniczących naprawie DNA na drodze rekombinacji homologicznej (np. BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2) [155].

W jeszcze innym badaniu stosowana jest łączona terapia talazoparybem z niwolumabem u pacjentów z nieresekcyjnym lub przerzutowym czerniakiem ze stwierdzoną mutacją w obrębie BRCA1, BRCA2 lub innego genu związanego z fenotypem *BRCA-ness* [156].

Kolejne badanie dotyczy leczenia za pomocą niraparybu nowotworów wykazujących mutację w obrębie BAP1, a także innych genów biorących udział w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie DNA, wpisujących się w zjawisko *BRCA-ness* – w grupie badanej, co warto podkreślić, znaleźli się między innymi chorzy z czerniakiem błony naczyniowej oka [157].

Wreszcie ostatnie badanie dotyczy terapii łączonej (paklitaksel, karboplatyna oraz weliparyb) w różnych nowotworach litych, również w czerniaku [158].

## 2. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY

### 2.1. Cele pracy

**Celami niniejszej rozprawy doktorskiej opierającej się na analizie grupy 128 pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem skóry są:**

- Ocena ekspresji białka PARP1 w komórkach nowotworowych guzów pierwotnych u powyższych pacjentów za pomocą metody immunohistochemicznej (IHC);
- Analiza korelacji ekspresji białka PARP1 ze szczegółowymi parametrami klinicznymi (wiek i płeć pacjentów, lokalizacja guza pierwotnego, status węzłów wartowniczych i regionalnych węzłów chłonnych oraz obecność lub brak przerzutów odległych, stopień klinicznego zaawansowania wg AJCC (edycja 8), nawrót choroby nowotworowej) oraz histopatologicznymi (grubość nacieku nowotworowego wg skali Breslowa i Clarka, obecność owrzodzenia, wskaźnik mitotyczny, obecność limfangioinwazji, obecność i gradacja limfocytarnego nacieku zapalnego (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs), obecność mikrosatelitozy oraz wykładników morfologicznych regresji);
- Analiza wpływu ekspresji białka PARP1 na przeżycia pacjentów z czerniakiem skóry w kontekście czasu przeżycia specyficznego dla choroby nowotworowej (*cancer-specific overall survival*, CSOS) oraz czasu wolnego od nawrotu choroby nowotworowej (*disease-free survival*, DFS).

### 2.2. Założenie pracy: ocena ekspresji PARP1 jako potencjalnie użyteczne narzędzie prognostyczne?

Czerniak, choć nie jest najczęstszym nowotworem skóry, cechuje się umieralnością zdecydowanie wyższą niż w przebiegu nowotworów niemelanocytarnych (BCC, SCC). Wyniki leczenia *melanoma* ulegają poprawie, jednak wciąż znaczna liczba pacjentów, zwłaszcza w Polsce, jest diagnozowana z nowotworem w zaawansowanym stadium, w którym chirurgiczne wycięcie jest niewystarczające, a leczenie adiuwantowe nie prowadzi do wyleczenia.

W ostatnich latach przeżywamy gwałtowny rozwój medycyny personalizowanej, który również obejmuje pacjentów z diagnozą czerniaka. Główne

klasy nowych leków wprowadzone do leczenia tego nowotworu obejmują immunoterapeutyki oraz leki ukierunkowane molekularnie. Nie zawsze jednak są one skuteczne, m.in. wskutek rozwijającej się oporności na nie podczas terapii lub/i zróżnicowania mutacji w komórkach nowotworowych – zarówno pomiędzy poszczególnymi pacjentami, jak i w obrębie guza u pojedynczego pacjenta. Stąd wypływa konieczność poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych.

Nową opcją leczniczą mogłoby być użycie, już stosowanych w terapii raka piersi i raka jajnika, inhibitorów PARP1. Białko to bowiem, jak opisywano wyżej, jest ważnym enzymem uczestniczącym w różnych procesach komórkowych, włączając naprawę DNA i regulację śmierci komórki – procesach niezwykle kluczowych w nowotworzeniu. Dotychczas, o czym będzie wspomniane jeszcze w dyskusji, nie przeprowadzono zbyt wielu badań nad rolą PARP1 w melanomogenezie (w literaturze polskojęzycznej brak na ten temat jakiegokolwiek pozycji). Jej podstawowym założeniem jest immunohistochemiczna ocena ekspresji białka PARP1 oraz analiza korelacji jego ekspresji ze szczegółowymi parametrami klinicznymi, histopatologicznymi i rokowaniem u pacjentów z czerniakiem skóry. Uzyskane wyniki mogą stanowić wkład w dotychczasowy stan wiedzy na temat melanomogenezy, a także stać się punktem wyjścia do bardziej złożonych badań nad inhibicją białka PARP1 i potencjalnym rozszerzeniem wachlarza wskazań do zastosowania jego inhibitorów w postępowaniu onkologicznym.

### **3. MATERIAŁ I METODY**

#### **3.1. Charakterystyka kliniczna badanej grupy**

Materiałem badawczym była grupa 128 pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem skóry w latach 2005-2010, którzy byli leczeni w Opolskim Centrum Onkologii (OCO) w Opolu. Analizowana grupa badana została wyodrębniona na podstawie dostępności materiału tkankowego (błoczków parafinowych i preparatów histopatologicznych), które stanowiły podstawę do rozpoznania czerniaka oraz dostępności dokumentacji medycznej.

Pełne dane kliniczne ustalono na podstawie archiwalnej dokumentacji medycznej zakwalifikowanych do badania pacjentów. Przebieg postępowania diagnostyczno-terapeutycznego został ustalony w oparciu o analizę historii chorób z Poradni Onkologicznej OCO.

Szczegółowa charakterystyka kliniczna obejmowała następujące parametry: wiek i płeć pacjentów, lokalizacja guza pierwotnego, status węzłów wartowniczych i regionalnych węzłów chłonnych oraz obecność lub brak przerzutów odległych, stopień klinicznego zaawansowania wg AJCC (edycja 8) oraz dane o ewentualnym nawrocie choroby nowotworowej (Tabela 1).

Pacjenci zakwalifikowani do niniejszego badania leczenia byli według obowiązujących ówczesnie standardów. Przeprowadzano biopsję wycinającą zmiany pierwotnej. Po histopatologicznym potwierdzeniu rozpoznania czerniaka skóry poszerzano zabieg pierwotny poprzez wycięcie blizny z marginesem 5, 10 lub 20 mm niezmiętej skóry w zależności od głębokości naciekania wg Breslowa i ewentualnie lokalizacji guza pierwotnego. W przypadkach cN0 i gdy grubość nacieku wg Breslowa wynosiła powyżej 1 mm (>pT1a) wykonywano biopsję węzła wartowniczego. W przypadku przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (stwierdzonych pierwotnie lub w wyniku SLNB) wykonywano limfadenektomię.



**Tabela 1.** Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy badawczej.

<b>CHARAKTERYSTYKA KLINICZNO-PATOLOGICZNA PACJENTÓW</b>	<b>No (%)</b>
<b>Wszyscy pacjenci</b>	128 (100.0)
<b>Wiek - zakres: 18-86 lat; średnia: 62±15; mediana: 65</b>	
<b>Płeć</b>	
Kobiety	65 (50.8)
Mężczyźni	63 (49.2)
<b>Lokalizacja guza pierwotnego</b>	
Głowa/szyja	11 (8.6)
Kończyny	54 (42.2)
Tułów	59 (46.1)
Dłoń/stopa	4 (3.1)
<b>Guz pierwotny (pT)</b>	
pT1	30 (23.4)
pT2	20 (15.6)
pT3	35 (27.4)
pT4	43 (33.6)
<b>Status biopsji węzła wartowniczego (SNLB)</b>	
Bez przerzutów (SNLB-)	56 (100.0)
Obecne przerzuty (SNLB+)	34 (60.7)
	22 (39.3)
<b>Status regionalnych węzłów chłonnych (pN)</b>	
Bez przerzutów (pN-)	96 (75.0)
Obecne przerzuty (pN+)	32 (25.0)
<b>Przerzuty odległe</b>	
Brak	115 (89.8)
Obecne	13 (10.2)
<b>Nawrót choroby nowotworowej</b>	
Bez nawrotu	82 (64.1)
Nawrót obecny	46 (35.9)

### 3.2. Charakterystyka histopatologiczna guzów

Do badań wykorzystano archiwalny materiał tkankowy pochodzący z zabiegów operacyjnych utrwalony w 10% roztworze buforowanej formaliny i zatopiony w bloczkach parafinowych.

Przeprowadzono weryfikację pierwotnych rozpoznań histopatologicznych (dr hab. n. med. Piotr Donizy) oraz uzupełniono dane histopatologiczne o szczegółowe parametry, które nie były ocenione. Pełna charakterystyka guzów pierwotnych obejmowała następujące parametry: grubość nacieku nowotworowego wg skali Breslowa i Clarka, obecność owrzodzenia, wskaźnik mitotyczny, obecność limfangioinwazji, obecność i gradacja limfocytarnego nacieku zapalnego (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs), obecność mikrosatelitozy oraz wykładników morfologicznych regresji) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parametry histopatologiczne guzów pierwotnych.

<b>PARAMETRY HISTOPATOLOGICZNE GUZA PIERWOTNEGO</b>	<b>No (%)</b>
<b>Grubość nacieku wg Breslowa</b>	
≤1 mm	30 (23.4)
1.01-2.00 mm	20 (15.6)
2.01-4.00 mm	35 (27.4)
>4 mm	43 (33.6)
<b>Grubość nacieku wg Clarka</b>	
I	0 (0.0)
II	37 (28.9)
III	42 (32.8)
IV	36 (28.1)
V	13 (10.2)
<b>Typ histologiczny</b>	
Czerniak szerzący się powierzchownie (SSM)	58 (45.3)
Czerniak guzkowy (NM)	66 (51.6)
Czerniak akralny (ALM)	4 (3.1)
<b>Wskaźnik mitotyczny</b>	
0	34 (26.8)
1-3	26 (20.4)
≥4	67 (52.8)
<b>Owrzodzenie</b>	
Brak	77 (60.1)
Obecne	51 (39.8)
<b>Limfangioinwazja</b>	
Brak	121 (94.5)
Obecna	7 (5.5)
<b>Limfocytarny naciek zapalny (TILs)</b>	
Brak	7 (5.5)
Słaby/umiarkowany	79 (61.7)
Intensywny	42 (32.8)
<b>Mikrosatelitoza</b>	
Brak	123 (96.1)
Obecna	5 (3.9)
<b>Regresja</b>	
Brak	122 (95.3)
Obecna	6 (4.7)

### 3.3. Badania immunohistochemiczne

Reakcje immunohistochemiczne (IHC) wykrywające białko PARP1 przeprowadzono z użyciem mysiego, monoklonalnego przeciwciała (B-10: sc-74470 rozcieńczenie 1:50; Santa Cruz Biotechnology, USA) wykorzystując skrawki parafinowe z guzów pierwotnych o grubości 4 µm. Odparafinowanie, ponowne uwodnienie i odsłonięcie antygeny wykonano przy użyciu PT Link, z EnVision Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Dania) stosowanym przez 20 do 40 minut podczas inkubacji w 97°C. Barwienie przeprowadzono przy użyciu Autostainer Link z odczynnikami do wizualizacji EnVision FLEX / HRP (SM802 Dako, Glostrup, Dania).

Celem skontrołowania prawidłowości zastosowanej procedury immunohistochemicznej wykonano **kontrole pozytywne** oraz **negatywne**. Przeciwciała były w kontrolach zastępowane surowicą celem eliminacji nieswoistych reakcji immunoglobulin.

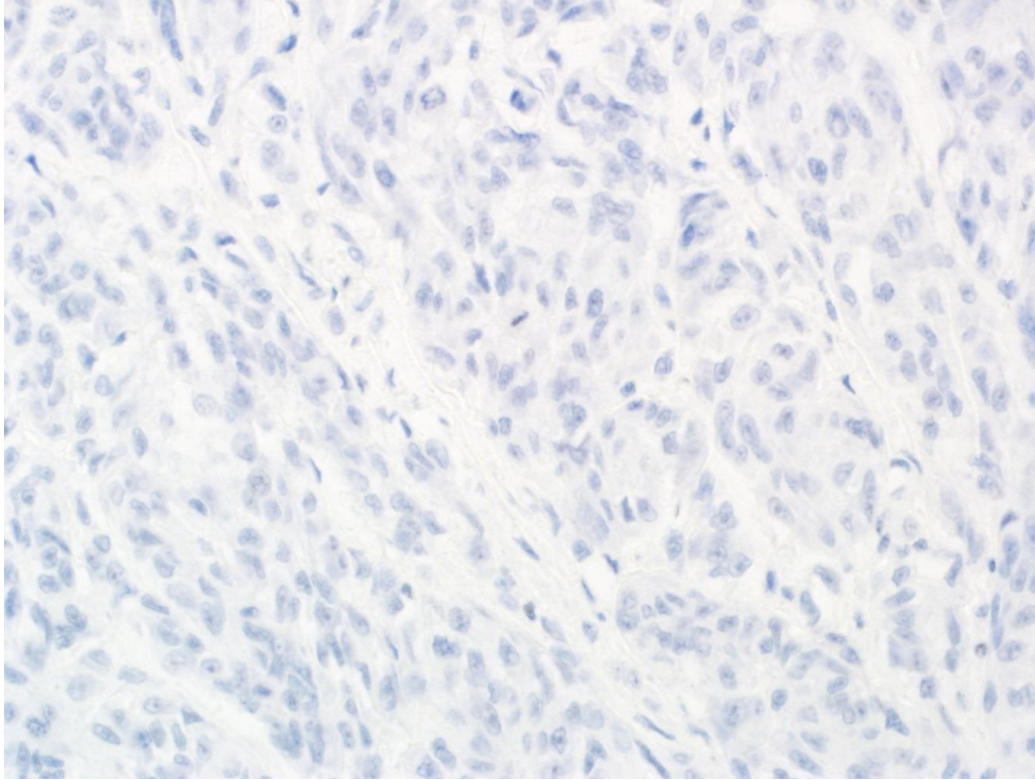
### 3.4. Histopatologiczna ocena immunoekspresji PARP1 w komórkach czerniaka

Ocenę ekspresji PARP1 przeprowadzono wykorzystując mikroskop świetlny OLYMPUS BX41. Zastosowano powiększenia: okular 10×, obiektywy 20× i 40×. Histopatologiczną ewaluację preparatów immunohistochemicznych przeprowadzili dr hab. n. med. Piotr Donizy oraz lek. Jakub Marczuk (doktorant). Reakcje immunohistochemiczne zostały ocenione wykorzystując metodę H-score, według poniższego wzoru:

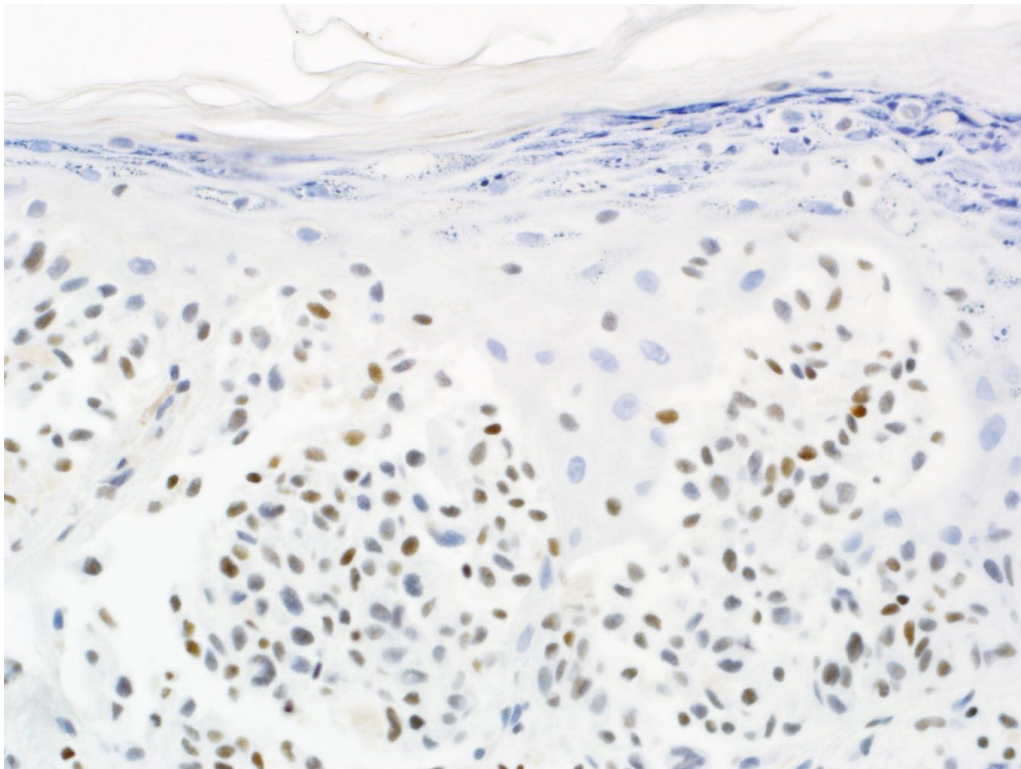
$$\mathbf{H\text{-}score = 1 \times P1 + 2 \times P2 + 3 \times P3}$$

gdzie P1: % komórek o słabej immunoreaktywności, P2: % komórek o umiarkowanej immunoreaktywności, P3: % komórek o silnej immunoreaktywności. Uzyskane wartości mieściły się w zasięgu wartości 0-300 [159].

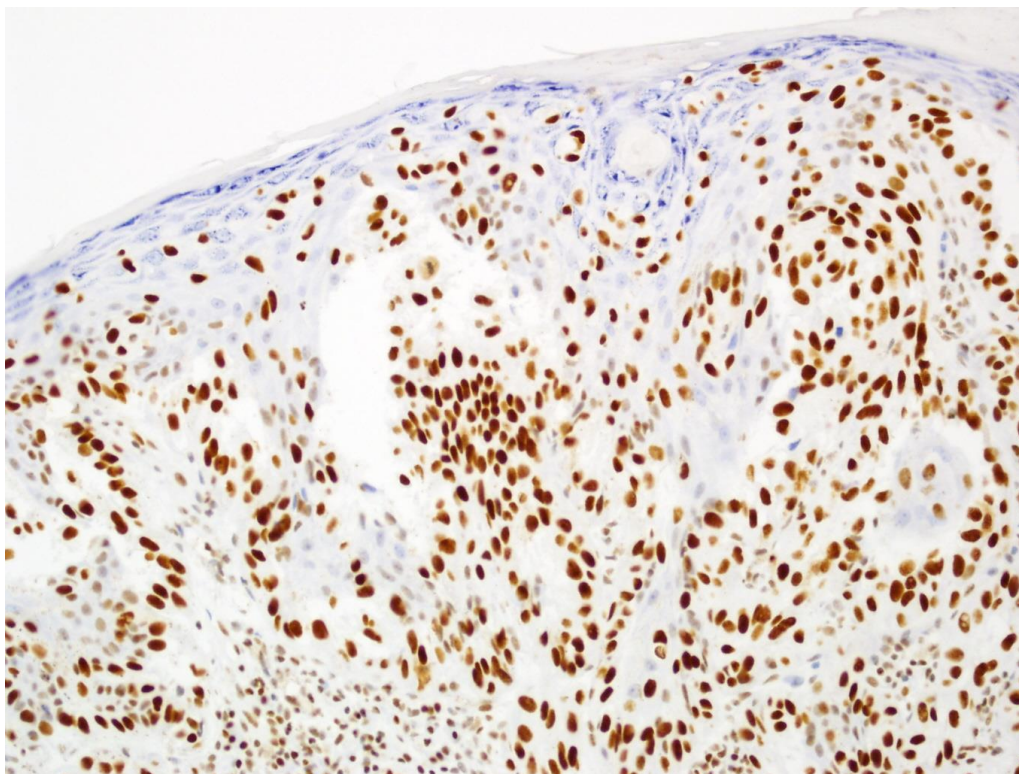
Na poniżej przedstawionych mikrofotografiach uwidoczono przypadki z różnym nasileniem ekspresji badanego białka PARP1 w komórkach guza pierwotnego (Mikrofotografie 1-6).



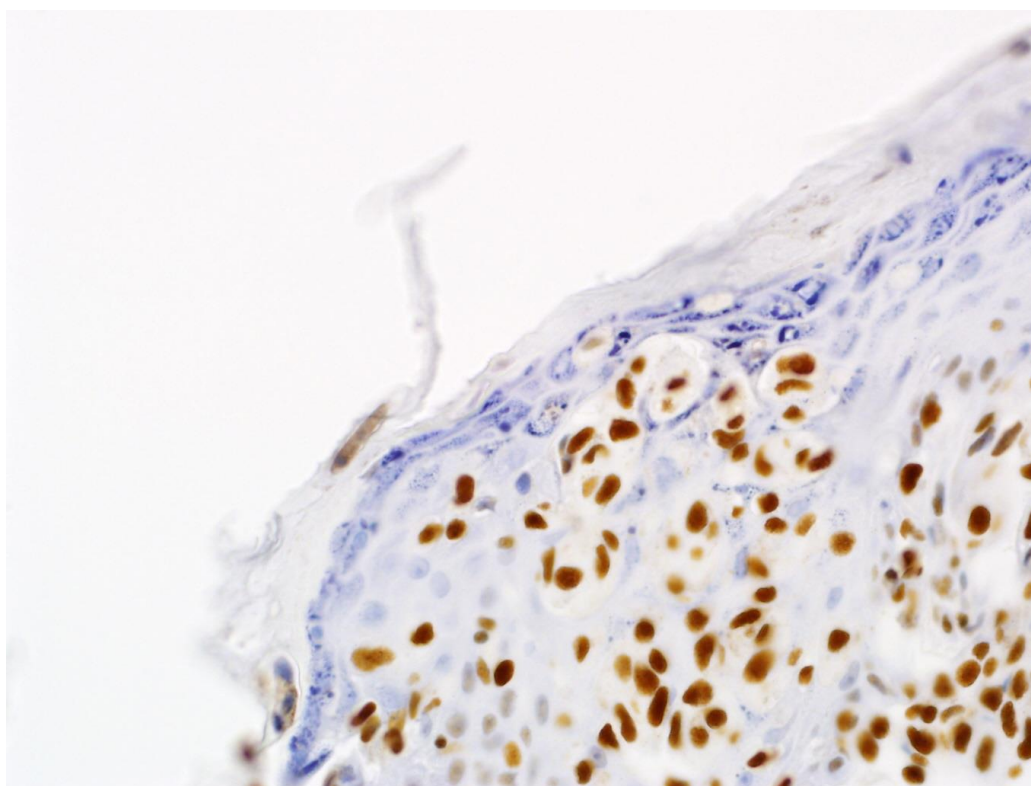
**Mikrofotografia 1.** Brak ekspresji PARP1 w komórkach czerniaka ( $\times 400$ ).



**Mikrofotografia 2.** Niedużego stopnia ekspresja PARP1 w obrębie jąder komórek czerniaka. Brak immunoreaktywności w obrębie keratynocytów ( $\times 400$ ).

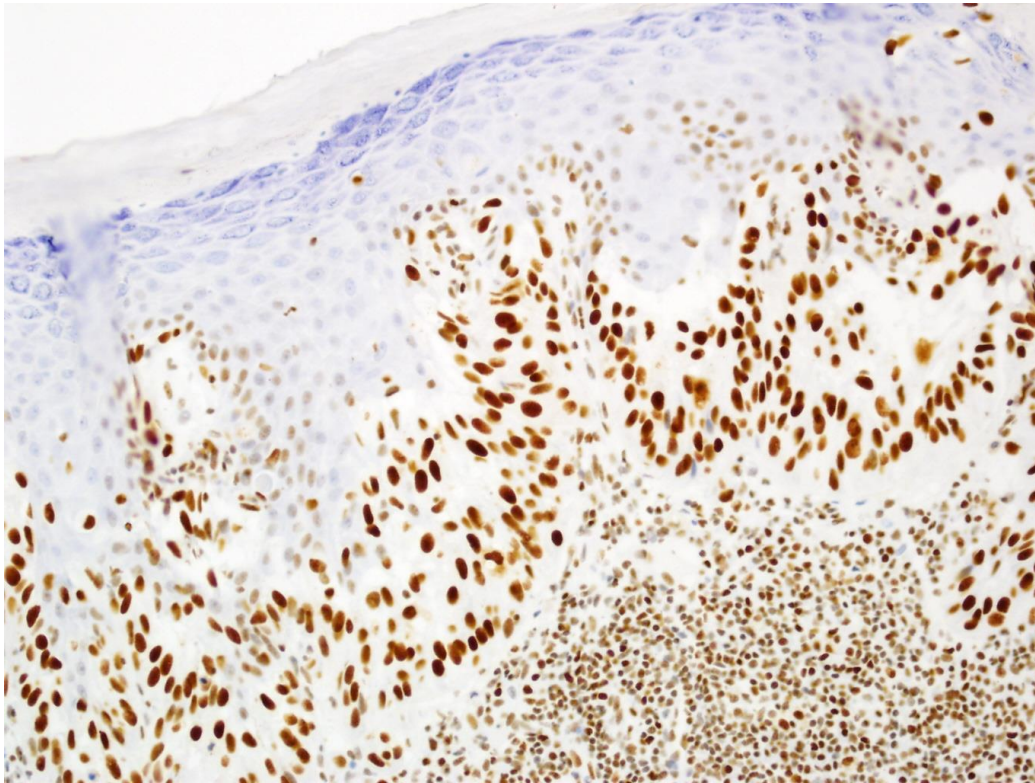


**Mikrofotografia 3.** Wysoka ekspresja PARP1 w komórkach czerniaka w komponentcie *melanoma in situ* ( $\times 200$ ).

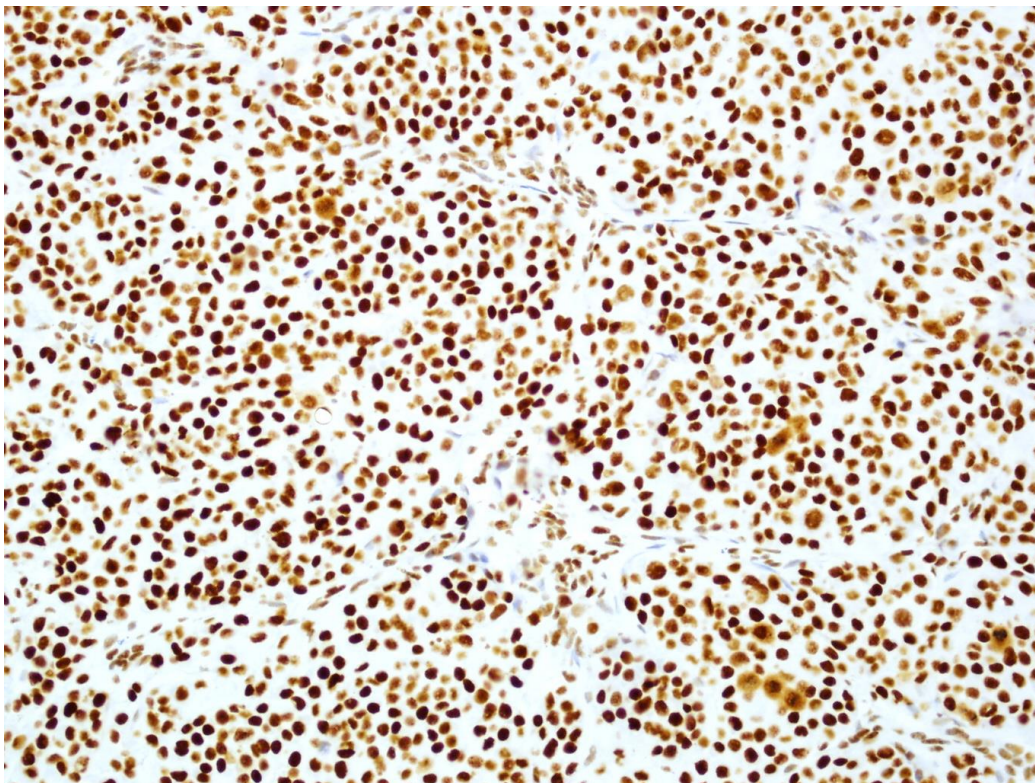


**Mikrofotografia 4.** Pagetoidny typ naciekania naskórka przez PARP1-dodatnie komórki czerniaka ( $\times 400$ ).





**Mikrofotografia 5.** Nadekspresja PARP1 w obrębie komórek czerniaka *in situ* oraz wysoki odsetek PARP1-dodatnich limfocytów ( $\times 200$ ).



**Mikrofotografia 6.** Wysoka immunoreaktywność PARP1 w obrębie komórek czerniaka inwazyjnego ( $\times 200$ ).

### 3.5. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna oraz nadzór nad prawidłową interpretacją otrzymanych wyników zostały przeprowadzone przez dr hab. inż. Przemysława Biecka, prof. PW, adiunkta Zakładu Statystyki Matematycznej na Wydziale Matematyki, Informatyki i Mechaniki Politechniki Warszawskiej.

Analiza statystyczna przeprowadzona została z użyciem programu „R language” (dostęp online: <https://www.r-project.org>) oraz pakietu „Survminer” (dostęp online: <https://cran.r-project.org/package=survminer>).

Na potrzeby analizy statystycznej dokonano podziały grupy badanej na dwie podgrupy: (1) z wysoką ekspresją PARP1, definiowaną jako H-score >280 (30/128; 23.4% pacjentów) oraz z obniżoną ekspresją PARP1, definiowaną jako H-score  $\leq$  280 (98/128; 76.6% pacjentów).

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą następujących testów:

- Wilcoxon dla par obserwacji (w celu określenia korelacji pomiędzy nasileniem ekspresji PARP1 a zmiennymi ciągłymi);
- dokładny Fishera (w celu określenia korelacji pomiędzy nasileniem ekspresji PARP1 a zmiennymi binarnymi);
- $\chi^2$  (w przypadku, gdy choć jedna z cech jest nominalna);
- estymator Kaplana-Meiera funkcji przeżycia i test log-rank (w celu określenia korelacji pomiędzy nasileniem ekspresji PARP1 a kategoriami przeżycia).

Celem określenia wpływu ekspresji PARP1 na przeżycia pacjentów z czerniakiem skóry wykorzystano dwie kategorie czasu przeżycia – CSOS (czas specyficzny dla choroby nowotworowej, *cancer specific overall survival*) oraz DFS (czas wolny od nawrotu, *disease free survival*). Za poziom istotności przyjęto  $p < 0.05$ .

### 3.6. Zgoda Komisji Bioetycznej

W pracy wykorzystano archiwalną dokumentację medyczną pacjentów oraz materiał tkankowy – badanie miało charakter retrospektywny. Praca uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu dn. 6 maja 2020 (Skany 1 i 2).



KOMISJA BIOETYCZNA  
przy  
Uniwersytecie Medycznym  
we Wrocławiu  
ul. Pasteura 1; 50-367 WROCLAW

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 277 /2020

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 133/XV R/2017 z dnia 21 grudnia 2017 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami ) w składzie:

prof. dr hab. Jacek Daroszewski (choroby wewnętrzne, endokrynologia, diabetologia)

prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)

dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)

mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)

prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)

ks. dr hab. Piotr Mrzygłód, prof. nadzw. (duchowny)

mgr Luiza Müller (prawo)

dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)

prof. dr hab. Leszek Szenborn, (pediatria, choroby zakaźne)

Danuta Tarkowska (pielęgniarstwo)

prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska (farmakologia kliniczna)

dr hab. Andrzej Wojnar, prof. nadzw. (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel

Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)

dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem

prof. dr hab. Jana Kornafela ( ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej, po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.

„Znaczenie prognostyczne ekspresji polimerazy poli(ADP-rybozy)-1(PARP-1) u pacjentów z czerniakiem skóry”

zgłoszonym przez **lek. Jakuba Marczuka** zatrudnionego w Oddziale Dermatologicznym z Pododdziałem Dermatologii Dziecięcej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego Ośrodka Badawczo Rozwojowego we Wrocławiu oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła **wyrazić zgodę** na przeprowadzenie badania w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej pod nadzorem dr hab. Piotra Donizego **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych**.

Uwaga: Badanie to zostało objęte ubezpieczeniem odpowiedzialności cywilnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z tytułu prowadzonej działalności.

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu.

Opinia powyższa dotyczy projektu badawczego będącego podstawą rozprawy doktorskiej.

Wrocław, dnia 6 maja 2020 r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KOMISJA BIOETYCZNA  
Przewodniczący  
prof. dr hab. Jan Kornafel

## **4. WYNIKI**

### **4.1. Ekspresja PARP1 w komórkach guza pierwotnego**

Ekspresja PARP1, zdefiniowana jako H-score > 0, została wykazana w 127 guzach pierwotnych (99.2% przypadków); jedynie w jednym przypadku (0.8%) immunoreaktywność PARP1 nie została zaobserwowana. Średni H-score wynosił: 229.88 ( $\pm$  67.68), zaś mediana: 245. We wszystkich dodatnich przypadkach wykazano wyłącznie jądrową ekspresję PARP1.

Niską ekspresję PARP1 (definiowaną jako H-score  $\leq$  280) stwierdzono u 98 pacjentów (76.6%), zaś wysoką (definiowaną jako H-score > 280) wykazano u 30 pacjentów (23.4%).

### **4.2. Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami klinicznymi pacjentów**

U pacjentów cechujących się wysoką ekspresją PARP1 czerniak częściej lokalizuje się na skórze głowy i szyi w porównaniu do grupy wykazującej obniżoną ekspresję PARP1 ( $p=0.015$ ). Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy zwiększoną immunoreaktywnością PARP1 i pozostałymi parametrami klinicznymi (Tabela 3).

**Tabela 3.** Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami klinicznymi pacjentów z czerniakiem skóry.

PARAMETRY KLINICZNE	Ekspresja PARP1		Wartość <i>p</i>
	Niska (H-score ≤280) (No. 98)	Wysoka (H-score >280) (No. 30)	
<b>Wiek (18-86) <sup>a</sup></b>	61 (50 - 73)	69 (58 - 74)	0.090
<b>Płeć <sup>b</sup></b>			0.41
Kobiety	52 (53%)	13 (43%)	
Mężczyźni	46 (47%)	17 (57%)	
<b>Lokalizacja guza pierwotnego <sup>c</sup></b>			<b>0.015</b>
Głowa/szyja	4 (4%)	7 (23%)	
Kończyny	44 (45%)	10 (33%)	
Tułów	46 (47%)	13 (43%)	
Dłoń/stopa	4 (4%)	0 (0%)	
<b>Guz pierwotny (pT) <sup>a</sup></b>			0.16
pT1	27 (28%)	3 (10%)	
pT2	15 (15%)	5 (17%)	
pT3	27 (28%)	8 (27%)	
pT4	29 (30%)	14 (47%)	
<b>Status biopsji węzła wartowniczego (SNLB) <sup>b</sup></b>			0.099
Bez przerzutów (SNLB-)	24 (54%)	10 (83%)	
Obecne przerzuty (SNLB+)	20 (46%)	2 (17%)	
<b>Status regionalnych węzłów chłonnych (pN) <sup>b</sup></b>			0.63
Bez przerzutów (pN-)	72 (73%)	24 (80%)	
Obecne przerzuty (pN+)	26 (27%)	6 (20%)	
<b>Przerzuty odległe <sup>b</sup></b>			1.0
Brak	88 (90%)	27 (90%)	
Obecne	10 (10%)	3 (10%)	
<b>Nawrót choroby nowotworowej <sup>b</sup></b>			0.083
Bez nawrotu	67 (68%)	15 (50%)	
Nawrót obecny	31 (32%)	15 (50%)	

<sup>a</sup> wartość *p* dla testu Wilcozona dla par obserwacji

<sup>b</sup> wartość *p* dla testu dokładnego Fishera

<sup>c</sup> wartość *p* dla testu  $\chi^2$

Pogrubioną czcionką wyróżniono  $p < 0,05$ .

#### **4.3. Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami histopatologicznymi**

Analiza statystyczna ujawniła istotne statystycznie korelacje pomiędzy podwyższoną ekspresją PARP1 a częstszym występowaniem owrzodzenia ( $p=0.036$ ) oraz wyższym wskaźnikiem mitotycznym ( $p=0.0010$ ). Nie potwierdzono zależności pomiędzy ekspresją PARP1 a pozostałymi histopatologicznymi parametrami guzów pierwotnych (Tabela 4).

**Tabela 4.** Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami histopatologicznymi guzów pierwotnych pacjentów z czerniakiem skóry.

PARAMETRY HISTOPATOLOGICZNE	Ekspresja PARP1		Wartość <i>p</i>
	Niska (H-score ≤280) (No. 98)	Wysoka (H-score >280) (No. 30)	
<b>Grubość nacieku wg Breslowa <sup>a</sup></b>			0.16
≤1 mm	27 (28%)	3 (10%)	
1.01-2.00 mm	15 (15%)	5 (17%)	
2.01-4.00 mm	27 (28%)	8 (27%)	
>4 mm	29 (30%)	14 (47%)	
<b>Głębokość nacieku wg Clarka <sup>a</sup></b>			0.37
I	0 (0%)	0 (0%)	
II	32 (33%)	5 (17%)	
III	30 (31%)	12 (40%)	
IV	26 (27%)	10 (33%)	
V	10 (10%)	3 (10%)	
<b>Typ histologiczny <sup>b</sup></b>			0.30
Czerniak szerzący się powierzchniowo (SSM)	47 (48%)	11 (37%)	
Czerniak guzkowy (NM)	47 (48%)	19 (63%)	
Czerniak akralny (ALM)	4 (4%)	0 (0%)	
<b>Wskaźnik mitotyczny <sup>a</sup></b>			<b>0.0010</b>
0	33 (34%)	1 (4%)	
1-3	19 (20%)	7 (23%)	
≥4	45 (46%)	22 (73%)	
<b>Owrzodzenie <sup>c</sup></b>			<b>0.036</b>
Brak	64 (65%)	13 (43%)	
Obecne	34 (35%)	17 (57%)	
<b>Limfangioinwazja <sup>c</sup></b>			1.0
Brak	92 (94%)	29 (97%)	
Obecna	6 (6%)	1 (3%)	
<b>Limfocytarny naciek zapalny (TILs) <sup>c</sup></b>			0.60
Brak	6 (6%)	1 (3%)	
Słaby/umiarkowany	58 (59%)	21 (70%)	
Intensywny	34 (35%)	8 (27%)	
<b>Mikrosatelitoza <sup>c</sup></b>			0.084
Brak	96 (98%)	27 (90%)	
Obecna	2 (2%)	3 (10%)	
<b>Regresja <sup>c</sup></b>			0.14
Brak	95 (97%)	27 (90%)	
Obecna	3 (3%)	3 (10%)	

<sup>a</sup> wartość *p* dla testu Wilcozona dla par obserwacji

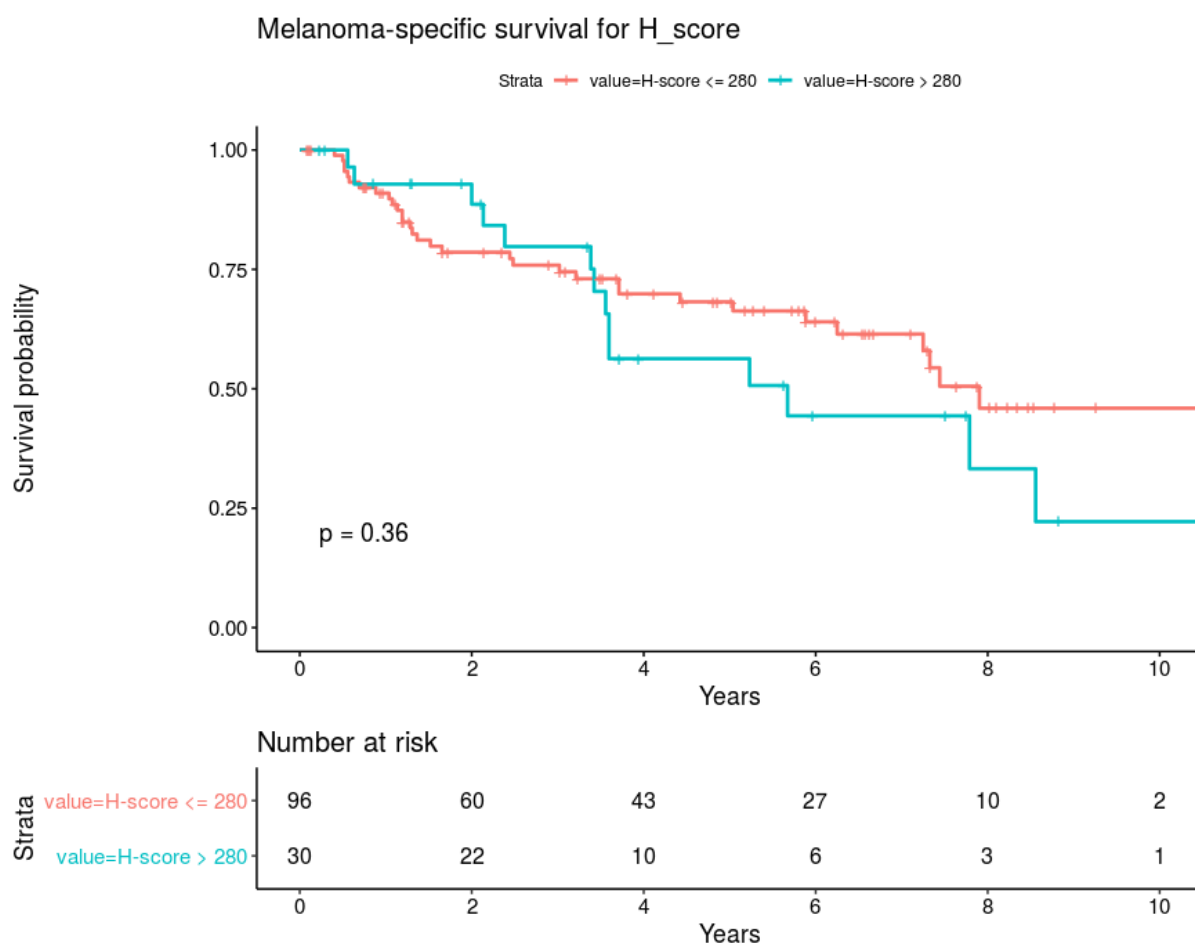
<sup>b</sup> wartość *p* dla testu  $\chi^2$

<sup>c</sup> wartość *p* dla testu dokładnego Fishera

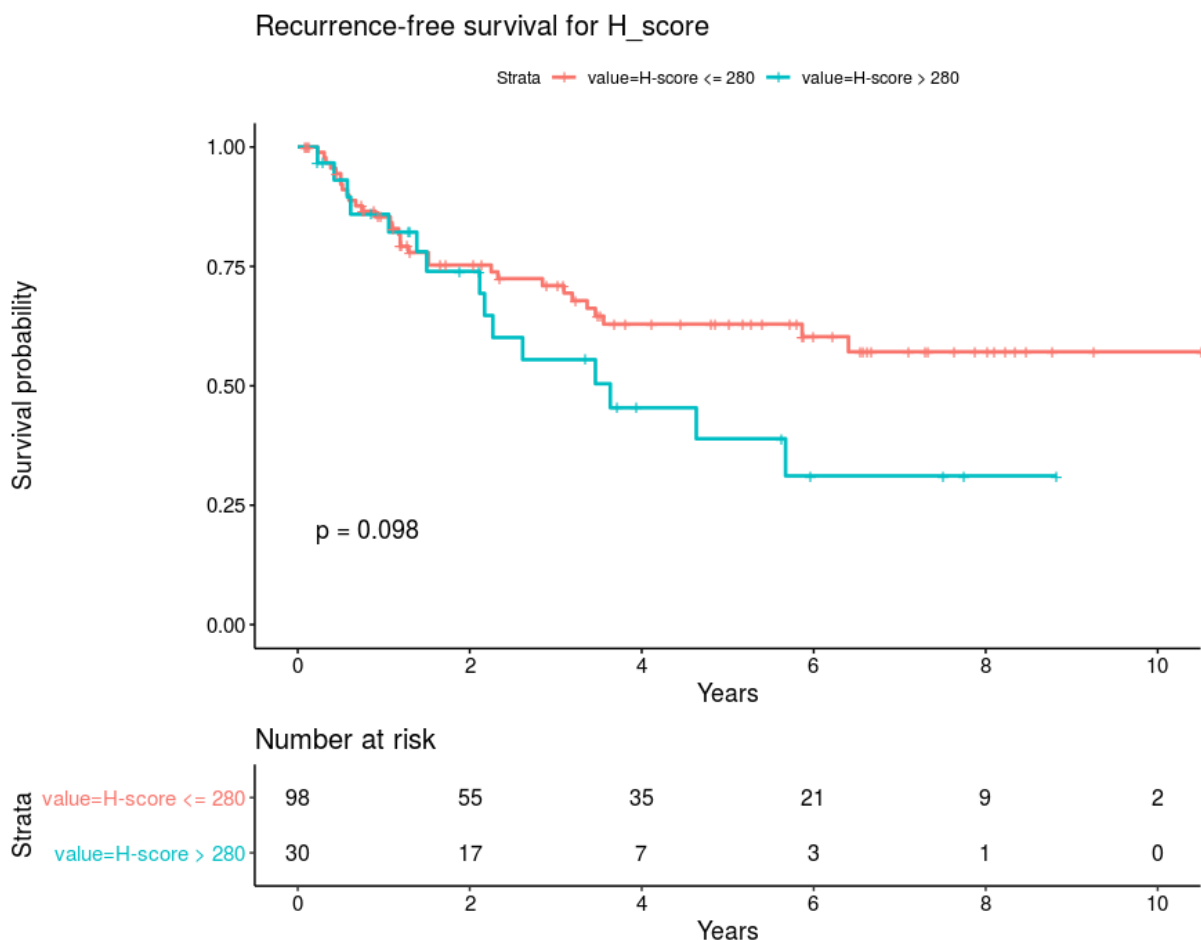
Pogrubioną czcionką wyróżniono  $p < 0,05$ .

#### 4.4. Analiza wpływu ekspresji PARP1 na przeżycia odległe – estymatory Kaplana-Meiera dla CSOS (*cancer-specific overall survival*) i DFS (*disease-free survival*)

Analiza krzywych Kaplana-Meiera nie wykazała korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 a rokowaniem u pacjentów z czerniakiem skóry, zarówno w kontekście czasu specyficznego dla choroby nowotworowej (CSOS;  $p=0.36$ ) (Wykres 1), jak i czasu wolnego od nawrotu (DFS;  $p=0.098$ ) (Wykres 2).



**Wykres 1.** Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość CSOS. Linia czerwona obrazuje przypadki z H-score  $\leq 280$ , zaś linia niebieska – z H-score  $> 280$ .



**Wykres 2.** Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość DFS. Linia czerwona obrazuje przypadki z H-score ≤ 280, zaś linia niebieska – z H-score > 280.

#### 4.5. Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami klinicznymi u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych

W grupie pacjentów niewykazujących przerzutów w węzłach chłonnych (96 pacjentów) wykazano korelację pomiędzy podwyższoną ekspresją PARP1 a zaawansowaniem guza pierwotnego ( $pT$ ;  $p=0.0016$ ), pojawieniem się nawrotu choroby ( $p=0.0061$ ) oraz częstszym występowaniem nowotworu na skórze głowy i szyi ( $p=0.016$ ). Pomędzy ekspresją PARP1 a wiekiem pacjentów, płcią i obecnością przerzutów odległych statystycznie istotnych zależności nie wykazano (Tabela 5).



**Tabela 5.** Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami klinicznymi pacjentów z czerniakiem skóry bez przerzutów w węzłach chłonnych.

PARAMETRY KLINICZNE	Ekspresja PARP1		Wartość <i>p</i>
	Niska (H-score ≤280) (No. 72)	Wysoka (H-score >280) (No. 24)	
<b>Wiek (24-86) <sup>a</sup></b>	61 (50 - 73)	70 (60 - 75)	0.055
<b>Płeć <sup>b</sup></b>			1.0
Kobiety	37 (51%)	12 (50%)	
Mężczyźni	35 (49%)	12 (50%)	
<b>Lokalizacja guza pierwotnego <sup>c</sup></b>			<b>0.016</b>
Głowa/szyja	3 (4%)	6 (25%)	
Kończyny	33 (46%)	8 (33%)	
Tułów	36 (50%)	10 (42%)	
Dłoń/stopa	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Guz pierwotny (pT) <sup>a</sup></b>			<b>0.0030</b>
pT1	26 (36%)	2 (8%)	
pT2	15 (21%)	5 (21%)	
pT3	20 (28%)	5 (21%)	
pT4	11 (15%)	12 (50%)	
<b>Przerzuty odległe <sup>b</sup></b>			1.0
Brak	68 (94%)	23 (96%)	
Obecne	4 (6%)	1 (4%)	
<b>Nawrót choroby nowotworowej <sup>b</sup></b>			<b>0.0061</b>
Bez nawrotu	60 (87%)	13 (54%)	
Nawrót obecny	12 (17%)	11 (46%)	

<sup>a</sup> wartość *p* dla testu Wilcoxona dla par obserwacji

<sup>b</sup> wartość *p* dla testu dokładnego Fishera

<sup>c</sup> wartość *p* dla testu  $\chi^2$

Pogrubioną czcionką wyróżniono  $p < 0,05$ .

#### **4.6. Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami histopatologicznymi pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych**

Podobnie jak poprzednio, wykazano zależność pomiędzy grubością nacieku wg Breslowa (tożsamą z cechą T) a podwyższoną ekspresją PARP1 u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych; ponadto wyraźnie zaznaczyła się statystycznie istotna korelacja pomiędzy podwyższonymi wartościami wskaźnika mitotycznego i obecnością owrzodzenia a zwiększoną immunoreaktywnością PARP (odpowiednio  $p=0.00071$  oraz  $p=0.023$ ). Nie zaobserwowano innych, statystycznie znamiennych zależności w kontekście parametrów histopatologicznych (Tabela 6).

**Tabela 6.** Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami histopatologicznymi guzów pierwotnych pacjentów z czerniakiem skóry bez przerzutów w węzłach chłonnych.

PARAMETRY HISTOPATOLOGICZNE	Ekspresja PARP1		Wartość <i>p</i>
	Niska (H-score ≤280) (No. 72)	Wysoka (H-score >280) (No. 24)	
<b>Grubość nacieku wg Breslowa <sup>a</sup></b>			<b>0.0030</b>
≤1 mm	26 (36%)	2 (8%)	
1.01-2.00 mm	15 (21%)	5 (21%)	
2.01-4.00 mm	20 (28%)	5 (21%)	
>4 mm	11 (15%)	12 (50%)	
<b>Głębokość nacieku wg Clarka <sup>a</sup></b>			<b>0.13</b>
I	0 (0%)	0 (0%)	
II	30 (42%)	4 (17%)	
III	22 (31%)	10 (42%)	
IV	16 (22%)	8 (33%)	
V	4 (6%)	2 (8%)	
<b>Typ histologiczny <sup>b</sup></b>			<b>0.16</b>
Czerniak szerzący się powierzchniowo (SSM)	43 (60%)	10 (42%)	
Czerniak guzkowy (NM)	29 (40%)	14 (58%)	
Czerniak akralny (ALM)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Wskaźnik mitotyczny <sup>a</sup></b>			<b>0.00071</b>
0	30 (42%)	1 (4%)	
1-3	17 (24%)	7 (29%)	
≥4	25 (35%)	16 (67%)	
<b>Owrzodzenie <sup>c</sup></b>			<b>0.023</b>
Brak	53 (74%)	11 (46%)	
Obecne	19 (26%)	13 (54%)	
<b>Limfangioinwazja <sup>c</sup></b>			<b>1.0</b>
Brak	70 (97%)	24 (100%)	
Obecna	2 (3%)	0 (0%)	
<b>Limfocytarny naciek zapalny (TILs) <sup>c</sup></b>			<b>0.26</b>
Brak	4 (6%)	1 (4%)	
Słaby/umiarkowany	37 (51%)	17 (71%)	
Intensywny	31 (43%)	6 (25%)	
<b>Mikrosatelitoza <sup>c</sup></b>			<b>1.0</b>
Brak	72 (100%)	24 (100%)	
Obecna	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Regresja <sup>c</sup></b>			<b>0.15</b>
Brak	71 (99%)	22 (96%)	
Obecna	1 (1%)	1 (4%)	

<sup>a</sup> wartość *p* dla testu Wilcozona dla par obserwacji

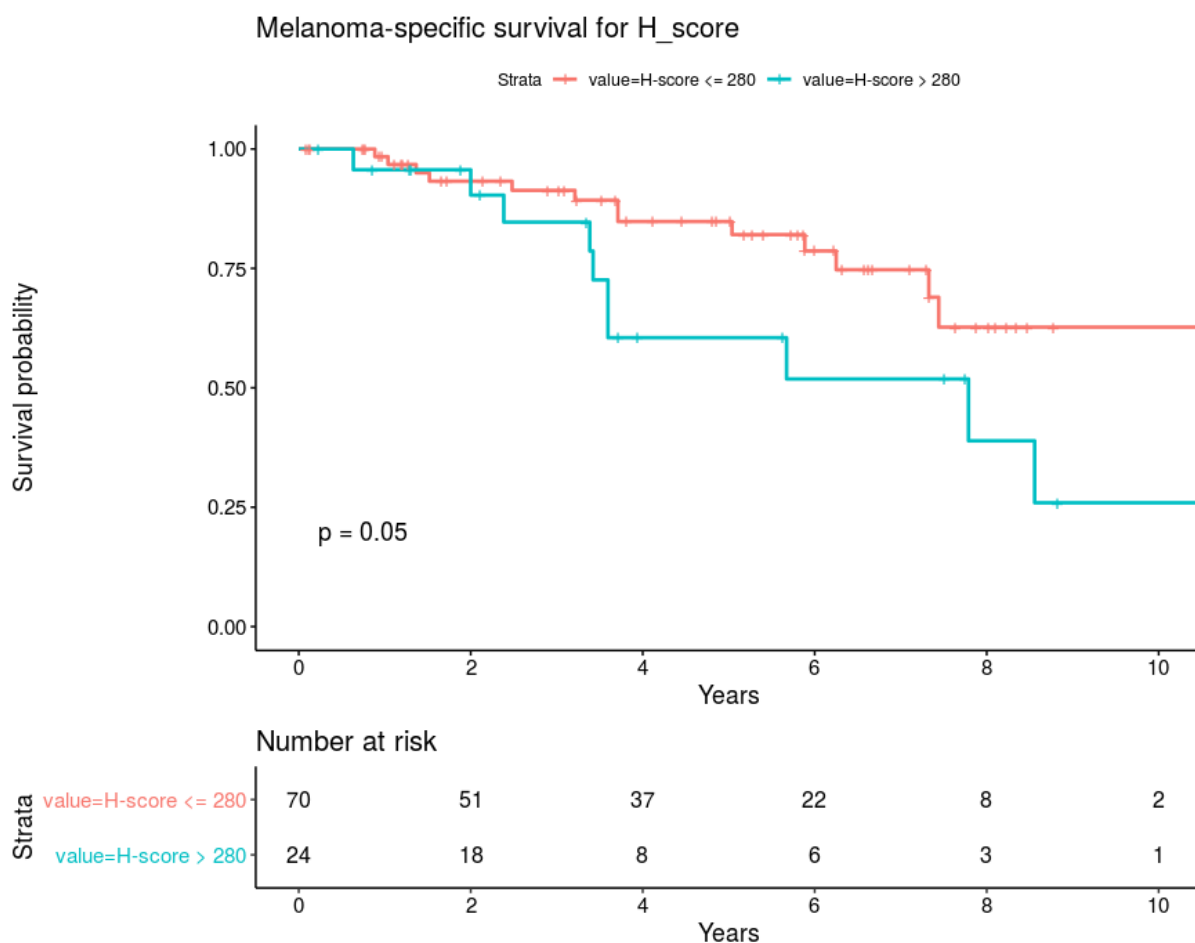
<sup>b</sup> wartość *p* dla testu  $\chi^2$

<sup>c</sup> wartość *p* dla testu dokładnego Fishera

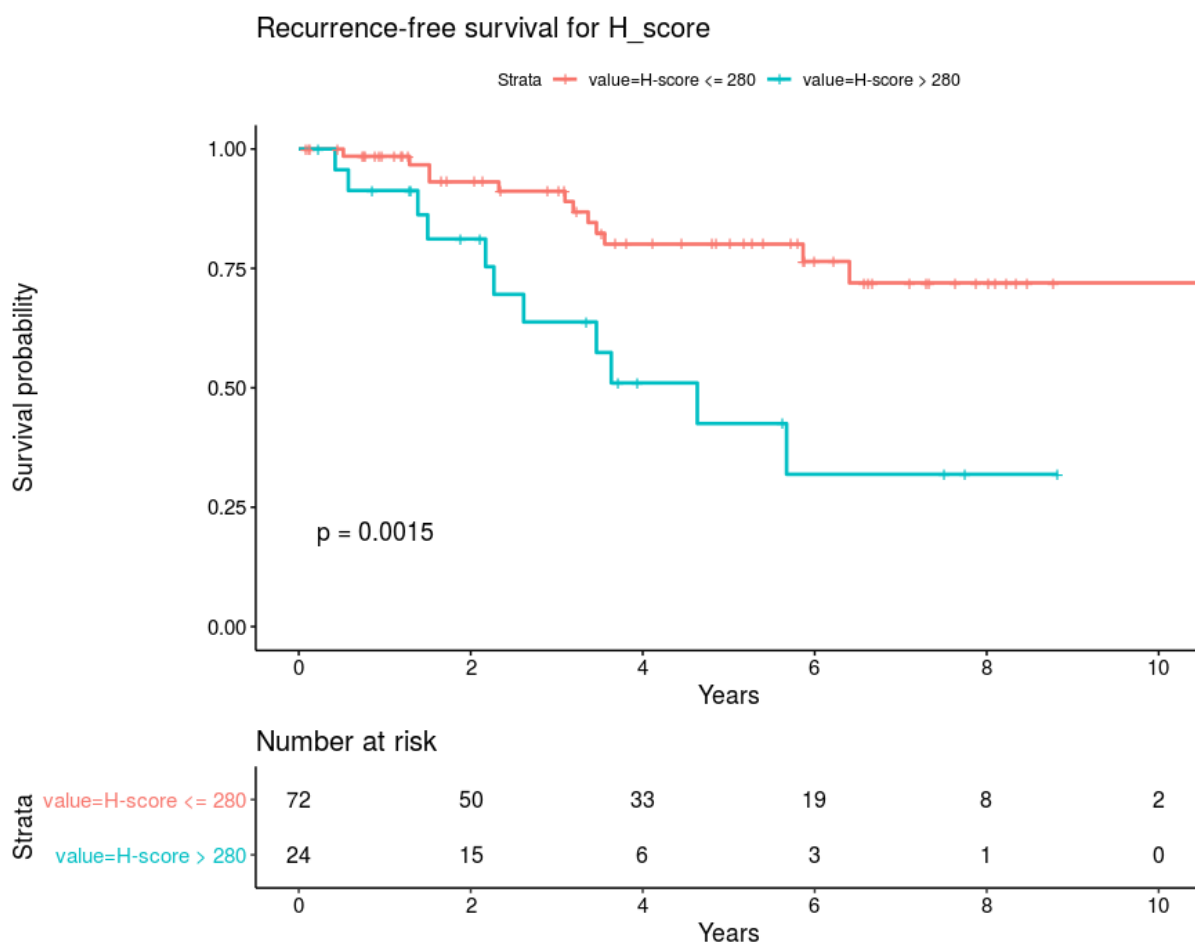
Pogrubioną czcionką wyróżniono  $p < 0,05$ .

#### 4.7. Analiza wpływu ekspresji PARP1 na przeżycia odległe – estymatory Kaplana-Meiera dla CSOS (*cancer-specific overall survival*) i DFS (*disease-free survival*) u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych

U pacjentów z czerniakiem skóry bez zajęcia węzłów chłonnych wykazano, na granicy znamienności statystycznej, związek pomiędzy wyższym H-score dla PARP1 a krótszym CSOS ( $p=0.05$ ) (Wykres 3), oraz statystycznie istotną korelację podwyższonej immunoreaktywności PARP1 z krótszym DFS ( $p=0.0015$ ) (Wykres 4).



**Wykres 3.** Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość CSOS u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych. Linia czerwona obrazuje przypadki z H-score ≤ 280, zaś linia niebieska – z H-score > 280.



**Wykres 4.** Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość DFS u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych. Linia czerwona obrazuje przypadki z H-score  $\leq 280$ , zaś linia niebieska – z H-score  $> 280$ .

#### 4.8. Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami klinicznymi pacjentów u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych

U pacjentów z czerniakiem skóry i potwierdzonymi przerzutami w węzłach chłonnych nie zaobserwowano statystycznie istotnego związku pomiędzy immunoreaktywnością PARP1 a parametrami klinicznymi (Tabela 7).

**Tabela 7.** Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami klinicznymi pacjentów z czerniakiem skóry i przerzutami w węzłach chłonnych.

PARAMETRY KLINICZNE	Ekspresja PARP1		Wartość <i>p</i>
	Niska (H-score ≤280) (No. 26)	Wysoka (H-score >280) (No. 6)	
<b>Wiek (18-80) <sup>a</sup></b>	60 (53 - 73)	66 (44 - 70)	0.87
<b>Płeć <sup>b</sup></b>			0.17
Kobiety	15 (58%)	1 (17%)	
Mężczyźni	11 (42%)	5 (83%)	
<b>Lokalizacja guza pierwotnego <sup>c</sup></b>			0.54
Głowa/szyja	1 (4%)	1 (17%)	
Kończyny	11 (42%)	2 (33%)	
Tułów	10 (38%)	3 (50%)	
Dłoń/stopa	4 (15%)	0 (0%)	
<b>Guz pierwotny (pT) <sup>a</sup></b>			0.22
pT1	1 (4%)	1 (17%)	
pT2	0 (0%)	0 (0%)	
pT3	7 (27%)	3 (50%)	
pT4	18 (69%)	2 (33%)	
<b>Przerzuty odległe <sup>b</sup></b>			0.62
Brak	20 (77%)	4 (67%)	
Obecne	6 (23%)	2 (33%)	
<b>Nawrót choroby nowotworowej <sup>b</sup></b>			1.0
Bez nawrotu	7 (27%)	2 (33%)	
Nawrót obecny	19 (73%)	4 (67%)	

<sup>a</sup> wartość *p* dla testu Wilcoxona dla par obserwacji

<sup>b</sup> wartość *p* dla testu dokładnego Fishera

<sup>c</sup> wartość *p* dla testu  $\chi^2$

Pogrubioną czcionką wyróżniono  $p < 0,05$ .

#### **4.9. Korelacje pomiędzy parametrami ekspresji PARP1 w komórkach guza pierwotnego a parametrami histopatologicznymi u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych**

W tej samej grupie pacjentów nie wykazano również istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją PARP1 a większością parametrów histopatologicznych; jedynym wyjątkiem jest tutaj mikrosatelitoza, która częściej występowała u pacjentów z nasiloną immunoreaktywnością PARP1 ( $p=0.034$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami histopatologicznymi guzów pierwotnych pacjentów z czerniakiem skóry i przerzutami w węzłach chłonnych.

PARAMETRY HISTOPATOLOGICZNE	Ekspresja PARP1		Wartość <i>p</i>
	Niska (H-score ≤280) (No. 26)	Wysoka (H-score >280) (No. 6)	
<b>Grubość nacieku wg Breslowa <sup>a</sup></b>			0.22
≤1 mm	1 (4%)	1 (17%)	
1.01-2.00 mm	0 (0%)	0 (0%)	
2.01-4.00 mm	7 (27%)	3 (50%)	
>4 mm	18 (69%)	2 (33%)	
<b>Grubość nacieku wg Clarka <sup>a</sup></b>			0.92
I	0 (0%)	0 (0%)	
II	2 (8%)	1 (17%)	
III	8 (31%)	2 (33%)	
IV	10 (38%)	2 (33%)	
V	6 (23%)	1 (17%)	
<b>Typ histologiczny <sup>b</sup></b>			0.80
Czerniak szerzący się powierzchniowo (SSM)	4 (15%)	1 (17%)	
Czerniak guzkowy (NM)	18 (70%)	5 (83%)	
Czerniak akralny (ALM)	4 (15%)	0 (0%)	
<b>Wskaźnik mitotyczny <sup>a</sup></b>			1.00
0	3 (12%)	0 (0%)	
1-3	2 (8%)	0 (0%)	
≥4	20 (80%)	6 (100%)	
<b>Owrzodzenie <sup>c</sup></b>			1.0
Brak	11 (42%)	2 (33%)	
Obecne	15 (58%)	4 (67%)	
<b>Limfangioinwazja <sup>c</sup></b>			1.0
Brak	22 (85%)	5 (83%)	
Obecna	4 (15%)	1 (17%)	
<b>Limfocytarny naciek zapalny (TILs) <sup>c</sup></b>			0.51
Brak	2 (8%)	0 (0%)	
Słaby/umiarkowany	21 (81%)	4 (67%)	
Intensywny	3 (12%)	2 (33%)	
<b>Mikrosatelitoza <sup>c</sup></b>			<b>0.034</b>
Brak	24 (92%)	3 (50%)	
Obecna	2 (8%)	3 (50%)	
<b>Regresja <sup>c</sup></b>			0.48
Brak	24 (92%)	5 (83%)	
Obecna	2 (8%)	1 (17%)	

<sup>a</sup> wartość *p* dla testu Wilcozona dla par obserwacji

<sup>b</sup> wartość *p* dla testu  $\chi^2$

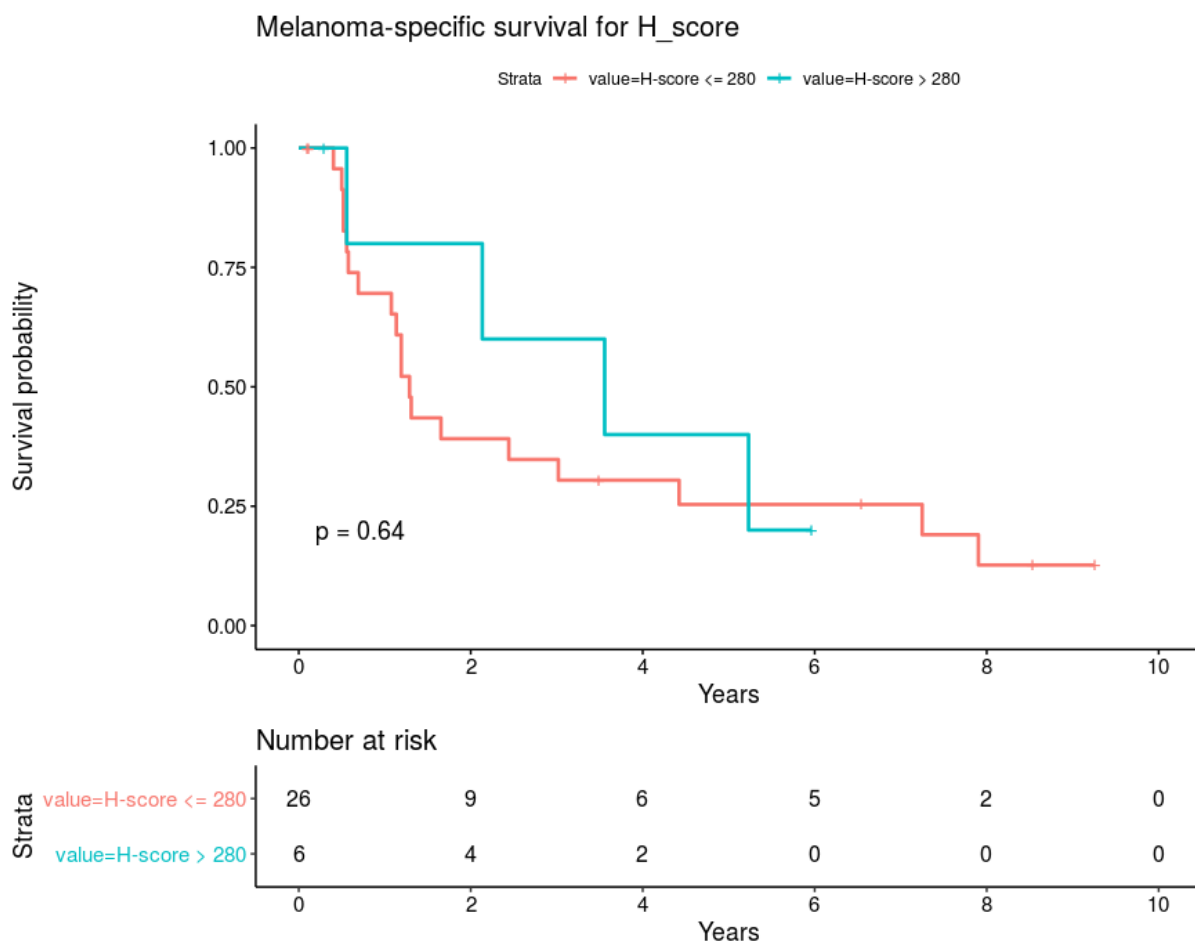
<sup>c</sup> wartość *p* dla testu dokładnego Fishera

Pogrubioną czcionką wyróżniono  $p < 0,05$ .

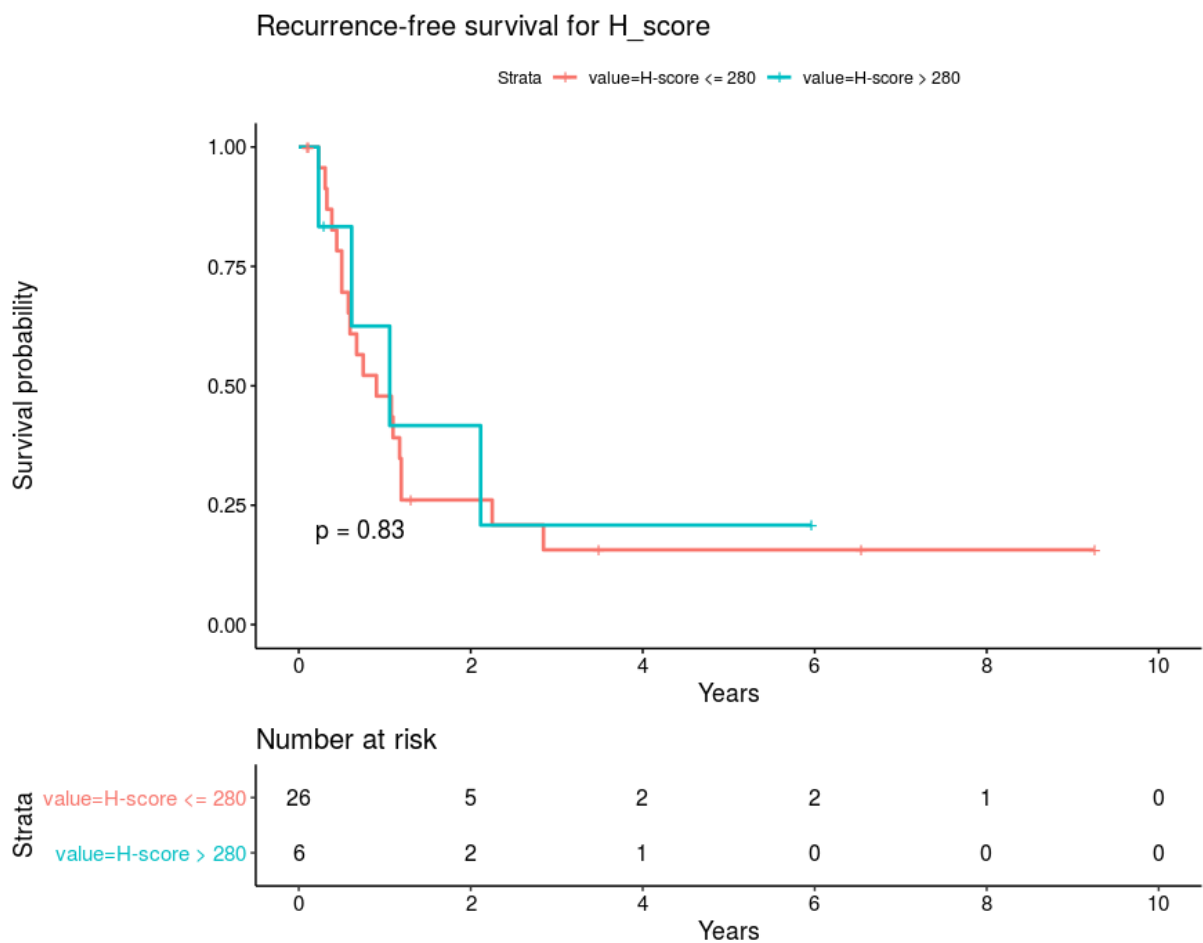


#### 4.10. Analiza wpływu ekspresji PARP1 na przeżycia odległe – estymatory Kaplana-Meiera dla CSOS (*cancer-specific overall survival*) i DFS (*disease-free survival*) u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych

Nie zaobserwowano statystycznie znamiennej zależności pomiędzy ekspresją PARP1 a parametrami CSOS i DFS u pacjentów z czerniakiem skóry z zajęciem węzłów chłonnych (Wykresy 5 i 6).



**Wykres 5.** Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość CSOS u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych. Linia czerwona obrazuje przypadki z H-score  $\leq$  280, zaś linia niebieska – z H-score  $>$  280.



**Wykres 6.** Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość DFS u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych. Linia czerwona obrazuje przypadki z H-score ≤ 280, zaś linia niebieska – z H-score > 280.

## 5. DYSKUSJA

W powyższym badaniu wykazano, że wysoka ekspresja PARP1 u pacjentów bez przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych jest nowym markerem związanym z gorszym rokowaniem. Wykazano, że nadekspresja PARP1 w jądrach komórek nowotworowych pacjentów bez przerzutów węzłowych wykazuje ścisłą korelację z istotnie krótszym czasem wolnym od nawrotu ( $p=0.0015$ ) oraz skróconym czasem przeżycia specyficznym dla choroby nowotworowej ( $p=0.05$ ). Nie potwierdzono znaczenia prognostycznego ekspresji PARP1 u pacjentów z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych.

Wysoka immunoreaktywność PARP1 w grupie pacjentów bez przerzutów węzłowych była istotnie skorelowana z większą grubością nacieku nowotworowego wg skali Breslowa, obecnością owrzodzenia oraz wyższym indeksem mitotycznym (odpowiednio  $p=0.0016$ ,  $p=0.023$  oraz  $p<0.001$ ). U pacjentów z obecnością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych wysoka immunoreaktywność PARP1 była istotnie związana z obecnością mikrosatelitozy ( $p=0.034$ ). W całej grupie pacjentów ekspresja PARP1 była istotnie skorelowana z wysokim indeksem mitotycznym ( $p=0.001$ ) oraz obecnością owrzodzenia ( $p=0.036$ ). Co ciekawe, u pacjentów charakteryzujących się wysoką ekspresją PARP1 czerniak częściej lokalizował się na skórze głowy i szyi ( $p=0.015$ ), co może mieć związek z większym nagromadzeniem uszkodzeń DNA powodowanych przez promieniowanie UV.

W kontekście roli PARP1 w melanomogenezie, spośród wszystkich rodzajów czerniaka najwięcej opublikowanych badań dotyczy jego lokalizacji skórnej. Pierwsze znane mi badanie zajmujące się rolą PARP1 w czerniaku skóry opublikowano w roku 2001, gdzie, przy użyciu linii komórkowych czerniaka ludzkiego (Hs294T), badano rolę tego białka w regulacji ekspresji chemokiny CXCL1, której przypisuje się rolę w rozwoju zapalenia oraz przemiany prawidłowych melanocytów w komórki *melanoma* [160]. Temat ten został podjęty ponownie 5 lat później; w oparciu o uzyskane wyniki (badano ludzkie linie komórkowe czerniaka SK-MEL-5, SK-MEL-28, WM115 oraz Hs294T) zaproponowano model, zgodnie z którym w komórkach czerniaka dochodzi do zwiększenia aktywności enzymatycznej PARP1 (w porównaniu do zdrowych melanocytów), wskutek czego dochodzi do parylacji różnych białek (i samego PARP1) z wtórnym oddysocjowaniem NF- $\kappa$ B od PARP1,

wiązaniem się NF- $\kappa$ B z promotorem genu CXCL1 i wzrostem jego transkrypcji [161]. Postulowana rola PARP1 w procesie zapalnym przyczyniającym się do melanomogenezy nie znajduje odzwierciedlenia w wynikach niniejszej rozprawy, gdzie nie wykazano istotnych korelacji pomiędzy immunoreaktywnością PARP1 i gradacją nacieku zapalnego (TILs) w obrębie nowotworu. Ewentualne znaczenie kliniczne białka w indukcji zapalenia wymaga więc dalszych badań.

W tym samym czasie opublikowano badanie nad czerniakiem skóry okolicy głowy i szyi [162]. Za pomocą metod immunohistochemicznych oraz Western blotting stwierdzono, że podwyższona ekspresja PARP1 koreluje z przejściem nowotworu z fazy wzrostu radialnego do fazy wertykalnej, a także koreluje dodatnio z grubością nowotworu w wertykalnej fazie wzrostu (ale nie radialnej), co jest zgodne z przytoczonymi wyżej wynikami mojej pracy [162]. Kolejne badanie kilka lat później potwierdziło rolę PARP1 w progresji nowotworu, a także w rozwoju oporności na chemioterapię; wykazano mianowicie, że zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* linie komórkowe czerniaka (linia B16 mysiego pochodzenia), w których wyciszono ekspresję PARP1, cechowały się wrażliwością na działanie temozolomidu, stosowanego m.in. w rozsianym czerniaku [163]. Niedawno zaobserwowano, że PARP1 aktywuje (jednak niezależnie od procesu parylacji) transkrypcję genu MITF kodującego białko onkogenne specyficzne dla linii komórek melanocytarnych; białko to odgrywa rolę w progresji nowotworu [164,165].

Jedna z najnowszych prac dostarcza kolejnego dowodu na rolę PARP1 w melanomogenezie, wykazując, że gen dla tego białka jest hipometylowany, a tym samym jego ekspresja ulega zwiększeniu [166]. Wydaje się, że hipometylacja genu może być jedną przyczyn zwiększonej immunoreaktywności PARP1, którą wykazano w analizowanej grupie pacjentów.

Niedawne badania wskazują na rolę PARP1 w generowaniu przerzutów czerniaka. Wykazano bowiem, że PARP-i zmniejszyły zdolność komórek czerniaka do przerzutowania, co wyrażało się m.in. w ograniczeniu zjawiska mimikry naczyniowej zaobserwowanym na liniach komórkowych czerniaka ludzkiego (G361) oraz mysiego (B16-F10) [167]. W przypadku mojej pracy nie zaobserwowano wprawdzie korelacji pomiędzy wysoką ekspresją PARP1 a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych i narządach odległych, jednakże, wykazano, że PARP1 jest

istotnym markerem złego rokowania u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych. Być może PARP1 odgrywa kluczową rolę na początkowych etapach rozwoju nowotworu, gdy ten dopiero zaczyna nabywać zdolność do przerzutowania. Jak stwierdzono w przytoczonym badaniu, PARP1 promuje zmiany w fenotypie komórek czerniakowych poprzez wpływ na ekspresję wimentyny [167]. Wimentyna z kolei doprowadza do hamowania ekspresji kadheryny E, aktywacji Snail1 oraz zwiększonej ruchliwości i migracji komórek nowotworowych [167]. Zastosowanie PARP-i wywołuje przeciwne efekty, zarówno na ludzkiej, jak i mysiej linii komórkowej czerniaka [167]. W innym badaniu po zastosowaniu weliparybu (ABT-888) zauważono wzmożenie apoptozy i jednocześnie osłabienie inwazyjności i zdolności do przemieszczania się komórek czerniakowych z linii komórkowych A375 oraz A375R (ta ostatnia wykazująca oporność na dabrafenib) [168]. Co więcej, efekty te były widoczne w znacznym stopniu w liniach komórkowych opornych na inhibitory BRAF, co otwiera perspektywę na stosowanie PARP-i w przypadkach czerniaka opornego na wspomniane leki [168]. Wcześniej wspomniany wpływ PARP1 na MITF również przekłada się na przerzutowanie, gdyż MITF odgrywa rolę także w tym procesie [164]. Być może również, jak na przykładzie innych nowotworów, PARP1 obniża ekspresję fibronektyny, co byłoby kolejnym mechanizmem promującym EMT [94].

Warto w tym miejscu nadmienić, że niedawno przeprowadzono badanie nad korelacją pomiędzy PARP1, SIRT1 i SMAD7, na tej samej próbie, która stanowi podstawę niniejszej pracy (dane niepublikowane). Stwierdzono m.in., że wysoka ekspresja PARP1 koreluje dodatnio z ekspresją SIRT1 i SMAD7. Jak wspomniano w podrozdziale 1.6.4., SIRT1 wchodzi w interakcje z PARP1 (wzajemna regulacja), mające znaczenie w procesach zapalnych (PARP1 ma działać prozapalnie, zaś SIRT1 hamować rozwój zapalenia) oraz zaburzeniach metabolicznych i starzeniem organizmu [91]. Z kolei białko SMAD7, jak wykazano, zaburza szlak sygnałowy TGF $\beta$  (w którym biorą udział dwa receptory dla TGF $\beta$  oraz białka SMAD2, SMAD3 i SMAD4), przez co odhamowaniu ulegają procesy prowadzące do rozwoju nowotworu [169]. Niedawno wykazano, że SMAD7 jest markerem agresywności czerniaka i prognostykiem niekorzystnego przebiegu klinicznego tego nowotworu [169]. Być może więc interakcje pomiędzy PARP1, SIRT1 i SMAD7 pełnią ważną rolę w progresji *melanoma*.

Podejmowano nieliczne próby powiązania PARP1 z konkretnymi cechami klinicznymi bądź histopatologicznymi czerniaka. Zaobserwowano między innymi, że u źle rokujących pacjentów z czerniakiem skóry w stadium III (wg siódmej wersji klasyfikacji AJCC) występowała zwiększona ekspresja PARP1 i że białko to może być jednym z markerów różnicujących pacjentów z rokowaniem lepszym od tych z gorszą prognozą [170]. Zauważono również związek pomiędzy zwiększoną ekspresją PARP1 a występowaniem owrzodzenia [171]. Ostatnia obserwacja jest zgodna z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy (korelacja pomiędzy podwyższoną ekspresją PARP1 a obecnością owrzodzenia w całej grupie badanej).

Badań dotyczących roli PARP1 w czerniaku gałki ocznej nie ma zbyt wiele. Niedawno wykazano podwyższoną ekspresję różnych białek z rodziny PARP (również PARP1) w komórkach pochodzących od pacjentów z czerniakiem gałki ocznej [172]. Zauważono także, że olaparyb (będący PARP-i), choć stosowany samodzielnie nie wywiera dużego efektu terapeutycznego, to stosowany łącznie z dakarbazyną znacząco zwiększa skuteczność tej ostatniej [172]. W innym, starszym doniesieniu, wykorzystującym linie komórkowe T97, T98, T108 oraz T115 raportowano, że inhibicja białka PARP1 prowadziła do spowolnienia bądź prawie całkowitego zahamowania rozwoju nowotworu [173].

Bardzo skąpa jest liczba badań nad czerniakiem błon śluzowych – w chwili pisania rozprawy udało się znaleźć jedynie jedną pracę podejmującą temat PARP1 w tej postaci czerniaka. W wielośrodkowym, retrospektywnym badaniu wykazano, że wysoka ekspresja PARP1 była skorelowana ze zwiększoną liczbą obserwowanych mitoz (powyżej 4 na mm<sup>2</sup>), a także dodatnio skorelowana z ekspresją IDO1 (enzym zaburzający funkcję limfocytów T i wywołujący ich apoptozę) i PD-L1 (białko uczestniczące w hamowaniu funkcji cytotoksycznych limfocytów T) w komórkach nowotworowych [174]. Ponadto PARP1 okazał się być niezależnym, negatywnym czynnikiem prognostycznym (związanym z krótszym OS oraz DSOS, określanym także jako MSS – *melanoma-specific survival*) [174]. Krótsze OS i DSOS (MSS) obserwowano także przy łącznej wysokiej ekspresji PARP1 oraz IDO1 [174].

Zestawiając niniejszą pracę z dotychczas opublikowanymi badaniami, można powiedzieć, iż owa rozprawa jest pierwszą, która analizuje zależność PARP1 od

powszechnie uznanych parametrów klinicznych i histopatologicznych, a ponadto wpływ PARP1 na rokowanie u pacjentów z rozpoznaniem czerniaka skóry. Wyżej opisywane badania bowiem albo cechowały się bowiem wybiórczością lokalizacji nowotworu (jedynie ze skóry głowy i szyi [162] czy z przerzutów do węzłów chłonnych [170]), albo skupiały się na czerniaku pozaskórnym [174], albo też analizowały jedynie pacjentów z określonym stopniem zaawansowania nowotworu (III wg ówczesnych wytycznych AJCC [170]), czy obejmowały stosunkowo ograniczoną liczbę przypadków w porównaniu do niniejszej pracy [162,170]. Pełna analiza związku PARP1 pomiędzy uznanymi parametrami klinicznymi i histopatologicznymi w czerniaku skóry również nie została przeprowadzona – o ile w jednej pracy analizowano związek PARP1 z obecnością owrzodzenia czy limfangioinwazji, to nie sprawdzano korelacji z innymi parametrami, np. obecnością regresji, mikrosatelitozy, TILs i wielu innych [171]. Wreszcie, dotychczasowe prace (z jednym wyjątkiem [174]) opierały się na starszych wersjach wytycznych AJCC dotyczących czerniaka [162,170,171]. Jedynie trzy prace [162,170,174] wykorzystywały materiał uzyskany od pacjentów, pozostałe opierały się na badaniu linii komórkowych i/lub modeli zwierzęcych (mysich) [160,161,163,165-168,171-173].

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki są zgodne z dotychczasowymi badaniami nad rolę PARP1 w czerniaku skóry. Jednakże, mając na uwadze względnie niewielką liczbę prac na ten temat oraz ich niedostatki, wydaje się konieczne prowadzenie dalszych drobiazgowych badań celem jednoznacznego określenia roli PARP1 w poszczególnych nowotworach, w tym czerniaku. Ewentualne potwierdzenie uzyskanych przeze mnie wyników przez kolejne badania mogłoby w dalszej perspektywie rozszerzyć wachlarz leków stosowanych w terapii *melanoma*.

## 6. WNIOSKI

1. Wysoka ekspresja PARP1 jest nowym markerem niekorzystnego rokowania u pacjentów bez przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych.
2. Wzrost immunoreaktywności PARP1 istotnie koreluje z parametrami morfologicznymi świadczącymi o inwazyjności komórek nowotworowych guza pierwotnego (m.in. z wysokim indeksem mitotycznym i obecnością owrzodzenia).
3. Nadekspresja PARP1 może być wyrazem uszkodzeń DNA wskutek działania promieniowania UV – guzy pierwotne z wysoką immunoreaktywnością PARP1 istotnie częściej lokalizowały się w rejonie głowy i szyi.

Z uwagi na retrospektywny charakter pracy i względnie małą liczebność badanej grupy uzyskane zależności wymagają potwierdzenia w kolejnych, szerzej zakrojonych badaniach, stanowią jednak zarzewie do dalszych rozważań i analiz.



## 7. PIŚMIENNICTWO

- [1] Urteaga O.B., Pack G.T. On the antiquity of melanoma. *Cancer*. 1966;19:607–610.
- [2] Rebecca V.W., Sondak V.K., Smalley K.S. *Melanoma Res*. 2012 Apr;22(2):114-22.
- [3] Cohen P.J., Hormann M.A., Sterry W., Schwartz R.A. Melanoma. W: Schwartz R.A. (red.). Skin cancer. Recognition and management. Blackwell Publishing, Oxford 2008, 152-199.
- [4] Roesch A., Volkenandt M. Czerniak. W: Burgdorf W.H.C., Plewig G., Wolff H.H., Landthaler M. *Dermatologia Braun-Falco*. Czelej, Lublin 2010, 1442-1459.
- [5] Khalil D.N., Carvajal R.D. Treatments for noncutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014 Jun;28(3):507-21.
- [6] Apalla Z., Lallas A., Sotiriou E. Et al. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol Pract Concept*. 2017 Apr 30;7(2):1-6.
- [7] Karimkhani C., Green A.C., Nijsten T. et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol*. 2017 Jul;177(1):134-140.
- [8] Chen S.T., Geller A.C., Tsao H. Update on the Epidemiology of Melanoma. *Curr Dermatol Rep*. 2013 Mar 1;2(1):24-34.
- [9] Wojciechowska U., Czaderny K., Ciuba A., Olasek P., Didkowska J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2016 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2018.
- [10] Chwieralska E., Kępska K., Lipska E., Modrzejewska M., Błaszczyk J. Nowotwory złośliwe w woj. dolnośląskim w roku 2016. Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu, Wrocław 2018.
- [11] Drosik K., Wojciechowska U., Gebauer T., Owsiak D. Nowotwory złośliwe w województwie opolskim w 2016 roku. Opolskie Centrum Onkologii im. prof. Tadeusza Koszarowskiego, Opole 2018.
- [12] Berrino F., De Angelis R., Sant M. et al. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol*. 2007 Sep;8(9):773-83.

- [13] De Angelis R., Sant M., Coleman M.P. et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014 Jan;15(1):23-34.
- [14] Nowowiejska J., Pałdyna M., Baran A. et al. The assessment of students' knowledge regarding melanoma and sun-protection habits. *Dermatol Rev/Przeegl Dermatol* 2019, 106, 159–172.
- [15] Gershenwald J.E., Scolyer R.A., Hess K.R. et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 Nov;67(6):472-492.
- [16] Balch C.M., Gershenwald J.E., Soong S.J. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 20;27(36):6199-206.
- [17] Clark W.H. Jr, From L., Bernardino E.A. et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969 Mar;29(3):705-27.
- [18] McGovern V.J. The classification of melanoma and its relationship with prognosis. *Pathology.* 1970 Apr;2(2):85-98.
- [19] Kuk D, Shoushtari AN, Barker CA et al. Prognosis of Mucosal, Uveal, Acral, Nonacral Cutaneous, and Unknown Primary Melanoma From the Time of First Metastasis. *Oncologist.* 2016 Jul;21(7):848-54.
- [20] Namikawa K., Yamazaki N. Targeted Therapy and Immunotherapy for Melanoma in Japan. *Curr Treat Options Oncol.* 2019; 20(1): 7.
- [21] Swetter S.M., Boldrick J.C., Jung S.Y. et al. Increasing incidence of lentigo maligna melanoma subtypes: northern California and national trends 1990-2000. *J Invest Dermatol.* 2005 Oct;125(4):685-91.
- [22] Bradford P.T., Goldstein A.M., McMaster M.L. et al. Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. *Arch Dermatol.* 2009 Apr;145(4):427-34.
- [23] Tyrrell H., Payne M. Combatting mucosal melanoma: recent advances and future perspectives. *Melanoma Manag.* 2018 Oct 8;5(3):MMT11.
- [24] Clark W.H. Jr, Elder D.E., Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol.* 1986 May;17(5):443-50.
- [25] Kardynał A., Słowińska M., Rudnicka L. Czerniak złośliwy – co nowego? W: Szepietowski J., Reich A. (red.). *Dermatologia – co nowego? Tom II.* Cornetis, Wrocław 2011, 117-124.

- [26] Shain A.H., Bastian B.C. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016 Jun;16(6):345-58.
- [27] Cichorek M., Wachulska M., Stasiewicz A. et al. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013 Feb; 30(1): 30–41.
- [28] Damsky W.E., Bosenberg M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene*. 2017 Oct 19;36(42):5771-5792.
- [29] Lazar A.J. Skóra. Czerniak. W: Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C. (red.). Patologia Robbins. Edra Urban & Partner, Wrocław 2019, 1049-1053.
- [30] Wang A.X., Qi X.Y. Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. *IUBMB Life*. 2013 Sep;65(9):748-58.
- [31] Amaral T., Sinnberg T., Meier F. et al. The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I - Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Eur J Cancer*. 2017 Mar;73:85-92.
- [32] Acosta A.M., Kadkol S.S. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in Cutaneous Melanoma: An Updated Review. *Arch Pathol Lab Med*. 2016 Nov;140(11):1290-1296.
- [33] Sałamacha M., Koseła H., Falkowski S. et al. Zespół von Recklinghausena (Neurofibromatoza typu 1) – najczęstszy uwarunkowany genetycznie zespół prowadzący do powstawania mięsaków tkanek miękkich. *Nowotwory. Journal of Oncology* 2011;61(1):43.
- [34] Liu Y., Sheikh M.S. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Mol Cell Pharmacol*. 2014;6(3):228.
- [35] Palmieri G., Colombino M., Casula M. et al. Molecular Pathways in Melanomagenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. *Curr Oncol Rep*. 2018; 20(11): 86.
- [36] Castellano E., Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*. 2011 Mar;2(3):261-74.
- [37] Dan H.C., Ebbs A., Pasparakis M. et al. Akt-dependent activation of mTORC1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ). *J Biol Chem*. 2014 Sep 5;289(36):25227-40.
- [38] Bai D., Ueno L., Vogt P.K. Akt-mediated regulation of NF $\kappa$ B and the essentialness of NF $\kappa$ B for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer*. 2009 Dec 15; 125(12): 2863–2870.

- [39] Krześlak A. Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów. *Postepy Hig Med Dosw*, 2010; 64: 490-503.
- [40] Papa A., Pandolfi P.P. The PTEN-PI3K Axis in Cancer. *Biomolecules*. 2019 Apr 17;9(4). pii: E153.
- [41] Shaughnessy M., Klebanov N., Tsao H. Clinical and therapeutic implications of melanoma genomics. *J Transl Genet Genom* 2018;2:14.
- [42] Fedorenko I.V., Gibney G.T., Sondak V.K., et al. Beyond BRAF: where next for melanoma therapy? *Br J Cancer*. 2015 Jan 20; 112(2): 217–226.
- [43] Mihajlovic M., Vlajkovic S., Jovanovic P. et al. Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012; 5(8): 739–753.
- [44] Perez D.E., Henle A.M., Amsterdam A. et al. Uveal melanoma driver mutations in GNAQ/11 yield numerous changes in melanocyte biology. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018 Sep; 31(5): 604–613.
- [45] Soura E., Eliades P.J., Shannon K. et al. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Mar;74(3):395-407; quiz 408-10.
- [46] Masoomian B., Shields J.A., Shields C.L. Overview of BAP1 cancer predisposition syndrome and the relationship to uveal melanoma. *Journal of Current Ophthalmology*, 30(2), 102–109.
- [47] Solomon D.A., Perry A. Familial Tumor Syndromes. W: Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach. Elsevier, Philadelphia 2018, 505-545.
- [48] Przemęcka M., Kaczmarek M., Jakubik J. Nowotwory złośliwe w przebiegu xeroderma pigmentosum — opis przypadku i przegląd piśmiennictwa. *Onkol. Prak. Klin*. 2013; 9, 5: 204-208.
- [49] Kiuru M.H., Busam K.J. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory Investigation*, 97(2), 146-157.
- [50] Giavedoni P., Ririe M., Carrera C. et al. Familial Melanoma Associated with Li-Fraumeni Syndrome and Atypical Mole Syndrome: Total-body Digital Photography, Dermoscopy and Confocal Microscopy. *Acta Derm Venereol*. 2017 Jun 9;97(6):720-723.
- [51] Correa R., Salpea P., Stratakis C. Carney Complex: an update. *Eur J Endocrinol*. 2015 Oct; 173(4): M85–M97.
- [52] Domingues B., Lopes J.M., Soares P. et al. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther*. 2018; 7: 35–49.

- [53] Strojjan P. Role of radiotherapy in melanoma management. *Radiol Oncol.* 2010 Mar; 44(1): 1–12.
- [54] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2019/125554s070lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/125554s070lbl.pdf) (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [55] Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 24 sierpnia 2020 r. w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych na 1 września 2020 r.
- [56] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/202806s008lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/202806s008lbl.pdf) (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [57] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/204114s007lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/204114s007lbl.pdf) (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [58] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/210496lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210496lbl.pdf) (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [59] Dummer R., Ascierto P.A., Gogas H.J. et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 May;19(5):603-615.
- [60] Mangerich A., Bürkle A. How to kill tumor cells with inhibitors of poly(ADP-ribose)ylation. *Int J Cancer.* 2011 Jan 15;128(2):251-65.
- [61] Langelier M.F., Eisemann T., Riccio A.A. et al. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. *Curr Opin Struct Biol.* 2018 Dec;53:187-198.
- [62] Palazzo L., Ahel I. PARPs in genome stability and signal transduction: implications for cancer therapy. *Biochem Soc Trans.* 2018 Dec 17; 46(6): 1681–1695.
- [63] Cohen M.S., Chang P. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-riboseylation. *Nat Chem Biol.* 2018 Feb 14;14(3):236-243.
- [64] Hottiger M.O. SnapShot: ADP-Ribosylation Signaling. *Mol Cell.* 2015 Jun 18;58(6):1134-1134.e1.
- [65] Lin K.Y., Huang D., Kraus W.L. Generating Protein-linked and Protein-free Mono-, Oligo-, and Poly(ADP-Ribose) In Vitro. *Methods Mol Biol.* 2018;1813:91-108.
- [66] Chambon P., Weill J.D., Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. Biochemical and biophysical research communications. *Biochem Biophys Res Commun.* 1963 Apr 2;11:39-43.

- [67] Ko H.L., Ren E.C. Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules*. 2012 Dec; 2(4): 524–548.
- [68] Dębska S., Kubicka J., Czyżykowski R. et al. Inhibitory PARP – podstawy teoretyczne i zastosowanie kliniczne. *Postepy Hig Med Dosw*, 2012; 66: 311-321.
- [69] Kamaletdinova T., Fanaei-Kahrani Z., Wang Z.Q. The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers. *Cells*. 2019 Dec 12;8(12). pii: E1625.
- [70] McCann K.E., Hurvitz S.A. Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer. *Drugs Context*. 2018 Aug 8;7:212540.
- [71] Kiliańska Z.M., Żolnierczy J., Węsierska-Gądek J. Biologiczna aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy)-1. *Postepy Hig Med Dosw*, 2010; 64: 344-363
- [72] Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Oct;18(10):610-621.
- [73] Krishnakumar R., Kraus W.L. The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Mol Cell*. 2010 Jul 9;39(1):8-24.
- [74] Deshmukh D., Qiu Y. Role of PARP-1 in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*. 2015 Apr 25;3(1):1-12.
- [75] del Rivero J., Kohn E.C. PARP Inhibitors: The Cornerstone of DNA Repair-Targeted Therapies. *Oncology (Williston Park)*. 2017 Apr 15;31(4):265-73.
- [76] Sirbu B.M., Cortez D. DNA Damage Response: Three Levels of DNA Repair Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Aug 1;5(8):a012724.
- [77] Popławski T., Stoczyńska E., Błasiak J. Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców— nowe białka, nowe funkcje, nowe mechanizmy. *Postępy Biochemii* 55 (1) 2009.
- [78] Mladenov E., Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res*. 2011 Jun 3;711(1-2):61-72.
- [79] Kwiatkowski D., Śliwiński T. Naprawa DNA przez wycinanie zasad azotowych w chorobie Alzheimera. *Postepy Hig Med Dosw*, 2014; 68: 976-986
- [80] Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018 Mar;25(3):486-541.

- [81]** Robinson N., Ganesan R., Hegedűs C. et al. Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol.* 2019 Sep;26:101239.
- [82]** Künzi L., Holt G.E. Cigarette smoke activates the parthanatos pathway of cell death in human bronchial epithelial cells. *Cell Death Discov.* 2019; 5: 127.
- [83]** Rodríguez-Vargas J.M., Oliver-Pozo F.J., Dantzer F. PARP1 and Poly(ADP-ribose)ation Signaling during Autophagy in Response to Nutrient Deprivation. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jun 9;2019:2641712.
- [84]** Shaheen M., Allen C., Nickoloff J.A. et al. Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood.* 2011 Jun 9;117(23):6074-82.
- [85]** Toma M., Skorski T., Śliwiński T. Synthetic lethality as a functional tool in basic research and in anticancer therapy. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68 : 1091-1103.
- [86]** Hartwell L.H., Szankasi P., Roberts C.J. et al. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science.* 1997 Nov 7;278(5340):1064-8.
- [87]** Chen C.C., Feng W., Lim P.X. Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2018 Mar;2:313-336.
- [88]** Byrum A.K., Vindigni A., Mosammamarast N. Defining and Modulating 'BRCAness'. *Trends Cell Biol.* 2019 Sep;29(9):740-751.
- [89]** Lord C.J., Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer.* 2016 Feb;16(2):110-20.
- [90]** Kim K., Leong S.P.L., Singer M.I. et al. Frequency of genetic homologous recombination (HR) alterations in metastatic cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 35, no. 15\_suppl
- [91]** C.T. Chung, Y. Joe. Antagonistic crosstalk between SIRT1, PARP-1, and -2 in the regulation of chronic inflammation associated with aging and metabolic diseases. *Integr Med Res.* 2014 Dec; 3(4): 198–203.
- [92]** Hassa P.O., Hottiger M.O. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Sep;59(9):1534-53.
- [93]** Swindall A.F., Stanley J.A., Yang E.S. PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis? *Cancers (Basel).* 2013 Jul 26;5(3):943-58.
- [94]** Schiewer M.J., Knudsen K.E. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Mol Cancer Res.* 2014 Aug;12(8):1069-80.

- [95] Schiewer M.J., Mandigo A.C., Gordon N. et al. PARP-1 regulates DNA repair factor availability. *EMBO Mol Med*. 2018 Dec;10(12). pii: e8816.
- [96] Wei W., Li Y., Lv S. et al. PARP-1 may be involved in angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett*. 2016 Dec;12(6):4561-4567.
- [97] Scarpulla R.C. Nuclear Control of Respiratory Chain Expression by Nuclear Respiratory Factors and PGC-1-Related Coactivator. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec; 1147: 321–334.
- [98] Hossain M.B., Ji P., Anish R. et al. Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Interacts with Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF-1) and Plays a Role in NRF-1 Transcriptional Regulation. *J Biol Chem*. 2009 Mar 27; 284(13): 8621–8632.
- [99] Ding L., Chen X., Xu X. PARP1 Suppresses the Transcription of PD-L1 by Poly(ADP-Ribosyl)ating STAT3. *Cancer Immunol Res*. 2019 Jan;7(1):136-149.
- [100] Hunter J.E., Willmore E., Irving J.A.E. et al. NF-κB mediates radio-sensitization by the PARP-1 inhibitor, AG-014699. *Oncogene*. 2012 Jan 12; 31(2): 251–264.
- [101] Chen Z.T., Zhao W., Qu S. et al. PARP-1 promotes autophagy via the AMPK/mTOR pathway in CNE-2 human nasopharyngeal carcinoma cells following ionizing radiation, while inhibition of autophagy contributes to the radiation sensitization of CNE-2 cells. *Mol Med Rep*. 2015 Aug;12(2):1868-76.
- [102] Lu Y., Liu Y., Pang Y. et al. Double-barreled gun: Combination of PARP inhibitor with conventional chemotherapy. *Pharmacol Ther*. 2018 Aug; 188: 168–175.
- [103] Pulliam L., Tang J., Wang W. et al. Poly-ADP-Ribosylation of Estrogen Receptor-Alpha by PARP1 Mediates Antiestrogen Resistance in Human Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan 4;11(1). pii: E43.
- [104] Yi M., Dong B., Qin S. et al. Advances and perspectives of PARP inhibitors. *Exp Hematol Oncol*. 2019 Nov 11;8:29.
- [105] Jiang X., Li W., Li X. et al. Current status and future prospects of PARP inhibitor clinical trials in ovarian cancer. *Cancer Manag Res*. 2019 May 10;11:4371-4390.
- [106] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/208558s001lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/208558s001lbl.pdf)  
(data dostępu: 18.10.2020r.)
- [107] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/209115s003lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/209115s003lbl.pdf)  
(data dostępu: 18.10.2020r.)
- [108] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/208447lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208447lbl.pdf)  
(data dostępu: 18.10.2020r.)



- [109] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/211651s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/211651s000lbl.pdf) (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [110] Friedlander E., Meniawy T., Markman B. et al. Pamiparib in combination with tislelizumab in patients with advanced solid tumours: results from the dose-escalation stage of a multicentre, open-label, phase 1a/b trial. *Lancet Oncol.* 2019 Sep;20(9):1306-1315.
- [111] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03933761> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [112] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03712930> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [113] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03333915> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [114] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03519230> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [115] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03427814> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [116] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03575065> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [117] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02361723> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [118] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04164199> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [119] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03749187> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [120] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03914742> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [121] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03150810> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [122] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03150862> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [123] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02158507> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [124] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01351909> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [125] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02595905> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [126] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01009788> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [127] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02163694> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [128] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01149083> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [129] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02032277> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [130] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01618357> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [131] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01506609> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [132] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01749397> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [133] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01012817> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [134] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02470585> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [135] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00989651> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [136] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02860819> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [137] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01908478> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [138] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01489865> (data dostępu: 18.10.2020r.)

- [139] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02890355> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [140] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01585805> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [141] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03581292> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [142] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02152982> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [143] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01139970> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [144] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00588991> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [145] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03289910> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [146] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03227016> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [147] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01386385> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [148] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02264990> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [149] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01576172> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [150] Yélamos J. Galindo M., Navarro J. et al. Enhancing tumor-targeting monoclonal antibodies therapy by PARP inhibitors. *Oncoimmunology*. 2016; 5(1): e1065370.
- [151] Soni A., Li F., Wang Y. et al. Inhibition of Parp1 by BMN673 Effectively Sensitizes Cells to Radiotherapy by Upsetting the Balance of Repair Pathways Processing DNA Double-Strand Breaks. *Mol Cancer Ther*. 2018 Oct;17(10):2206-2216.
- [152] Middleton M.R., Friedlander P., Hamid O. et al. Randomized phase II study evaluating veliparib (ABT-888) with temozolomide in patients with metastatic melanoma. *Ann Oncol*. 2015 Oct;26(10):2173-9
- [153] Khan O.A., Gore M., Lorigan P. et al. A phase I study of the safety and tolerability of olaparib (AZD2281, KU0059436) and dacarbazine in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer*. 2011 Mar 1;104(5):750-5.
- [154] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02645149> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [155] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03925350> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [156] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04187833> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [157] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03207347> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [158] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01366144> (data dostępu: 18.10.2020r.)
- [159] Ishibashi H., Suzuki T., Suzuki S., et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 May;88(5):2309-17.
- [160] Nirodi C., NagDas S., Gygi S.P. et al. A Role for Poly(ADP-ribose) Polymerase in the Transcriptional Regulation of the Melanoma Growth Stimulatory Activity (CXCL1) Gene Expression. *J Biol Chem*. 2001 Mar 23;276(12):9366-74. Epub 2000 Dec 8.

- [161] Amiri K.I., Ka H.C., Smulson M.E. et al. Differential regulation of CXCL1 transcription in melanoma cell lines by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Oncogene*. 2006 Dec 14;25(59):7714-22. Epub 2006 Jun 26.
- [162] Staibano S., Pepe S., Lo Muzio L. et al. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 expression in malignant melanomas from photoexposed areas of the head and neck region. *Hum Pathol*. 2005 Jul;36(7):724-31.
- [163] Tentori L., Muzi A., Dorio A.S. et al. Stable depletion of poly (ADP-ribose) polymerase-1 reduces in vivo melanoma growth and increases chemosensitivity. *Eur J Cancer*. 2008 Jun;44(9):1302-14.
- [164] Hartman M.L., Czyż M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72(7): 1249–1260.
- [165] Choi J., Xu M., Makowski M.M. et al. A common intronic variant of PARP1 confers melanoma risk and mediates melanocyte growth via regulation of MITF. *Nat Genet*. 2017 Sep;49(9):1326-1335.
- [166] Wouters J., Vizoso M., Martinez-Cardus A. et al. Comprehensive DNA methylation study identifies novel progression-related and prognostic markers for cutaneous melanoma. *BMC Med*. 2017 Jun 5;15(1):101.
- [167] Rodríguez M.I., Peralta-Leat A., O'Valle F. et al. PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS Genet*. 2013 Jun;9(6):e1003531.
- [168] Fratangelo F., Camerlingo S., Carriero M.V. et al. Effect of ABT-888 on the apoptosis, motility and invasiveness of BRAFi-resistant melanoma cells. *Int J Oncol*. 2018 Sep; 53(3): 1149–1159.
- [169] Kaczorowski M., Biecek P., Donizy P. et al. SMAD7 is a novel independent predictor of survival in patients with cutaneous melanoma. *Transl Res*. 2019 Feb;204:72-81
- [170] Mactier S., Kaufman K.L., Wang P. et al. Protein signatures correspond to survival outcomes of AJCC stage III melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Nov;27(6):1106-16.
- [171] Davies J.R., Jewell R., Affleck P. et al. Inherited variation in the PARP1 gene and survival from melanoma. *Int J Cancer*. 2014 Oct 1; 135(7): 1625–1633.
- [172] de Koning L., Decaudin D., El Botty R. et al. PARP Inhibition Increases the Response to Chemotherapy in Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun; 11(6): 751.

**[173]** Molloy-Simard V., St-Laurent J.F., Vigneault F. et al. Altered expression of the poly(ADP-ribosyl)ation enzymes in uveal melanoma and regulation of PARG gene expression by the transcription factor ERM. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Sep 14;53(10):6219-31.

**[174]** Donizy P., Wu C.L., Mull J. et al. Up-Regulation of PARP1 Expression Significantly Correlated with Poor Survival in Mucosal Melanomas. *Cells.* 2020 May 5;9(5). pii: E1135.

## 8. STRESZCZENIE

**WSTĘP.** PARP1 (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*) jest enzymem zaangażowanym w regulację różnorodnych procesów komórkowych, m.in. uczestniczy w naprawie uszkodzeń DNA, regulacji podziałów komórkowych i odpowiedzi immunologicznej.

**CEL.** Celem pracy była analiza ekspresji PARP1 w komórkach czerniaka skóry pochodzących z guzów pierwotnych i analiza jej korelacji ze szczegółowymi parametrami kliniczno-patologicznymi oraz przeżyciami odległymi pacjentów.

**MATERIAŁ I METODY.** Badanie objęło 128 pacjentów leczonych w latach 2005-2010 w Opolskim Centrum Onkologii z powodu czerniaka skóry. Immunoreaktywność białka PARP1 zbadano za pomocą metody immunohistochemicznej z wykorzystaniem skrawków parafinowych guzów pierwotnych.

**WYNIKI.** Wysoką ekspresję PARP1 (H-score > 280) wykazano u 30 pacjentów (23.4%), zaś niską – u 98 (76,6%). We wszystkich dodatnich przypadkach wykazano wyłącznie jądrową ekspresję PARP1.

Nadekspresja PARP1 w jądrach komórek nowotworowych pacjentów bez przerzutów węzłowych wykazuje ścisłą korelację z istotnie krótszym czasem wolnym od nawrotu ( $p=0.0015$ ) oraz skróconym czasem przeżycia specyficznym dla choroby nowotworowej ( $p=0.05$ ). Nie potwierdzono znaczenia prognostycznego ekspresji PARP1 u pacjentów z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych.

Wysoka immunoreaktywność PARP1 w grupie pacjentów bez przerzutów węzłowych była istotnie skorelowana z większą grubością nacieku nowotworowego wg skali Breslowa, obecnością owrzodzenia oraz wyższym indeksem mitotycznym (odpowiednio  $p=0.0016$ ,  $p=0.023$  oraz  $p<0.001$ ). U pacjentów z obecnością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych wysoka immunoreaktywność PARP1 była istotnie związana z obecnością mikrosatelitozy ( $p=0.034$ ). W całej grupie pacjentów ekspresja PARP1 była istotnie skorelowana z wysokim indeksem mitotycznym ( $p=0.001$ ) oraz obecnością owrzodzenia ( $p=0.036$ ). Co więcej, u pacjentów charakteryzujących się wysoką ekspresją PARP1 czerniak częściej lokalizował się na skórze głowy i szyi ( $p=0.015$ ), co może mieć związek z większym nagromadzeniem uszkodzeń DNA powodowanych przez promieniowanie UV.

**WNIOSKI.** Wysoka ekspresja PARP1 jest nowym markerem niekorzystnego rokowania u pacjentów bez przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych. Koreluje ona również istotnie z parametrami morfologicznymi świadczącymi o wysokiej inwazyjności komórek nowotworowych guza pierwotnego (m.in. z wysokim indeksem mitotycznym i obecnością owrzodzenia). Nadekspresja PARP1 może być wyrazem uszkodzeń DNA wskutek działania promieniowania UV – guzy pierwotne z wysoką ekspresją PARP1 istotnie częściej lokalizowały się w rejonie głowy i szyi.

## 9. SUMMARY

**INTRODUCTION.** PARP1 (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*) is a pleiotropic enzyme involved in several cellular processes, e.g: DNA damage repair, regulation of mitosis and immunologic response.

**AIM.** The aim of the study was to examine the expression of PARP1 in the cutaneous melanoma cells obtained from primary tumors and to assess its correlation with detailed clinico-pathological characteristics and patient long-term survival.

**MATERIAL AND METHODS.** The examined group consisted of 128 patients treated for cutaneous melanoma in the Oncology Center in Opole from 2005 to 2010. The PARP1 immunoreactivity was assessed by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of primary tumors.

**RESULTS.** High PARP1 expression (H-score > 280) was observed in 30 patients (23.4%), whilst the remaining 98 patients (76.6%) had low PARP1 immunoreactivity. All positive cases showed only nuclear expression pattern.

Elevated nuclear PARP1 expression in patients without nodal metastases strongly correlates with significantly shorter disease-free survival ( $p=0.0015$ ) and shorter cancer-specific overall survival ( $p=0.05$ ). Prognostic significance of PARP1 expression in patients with nodular metastases was not confirmed.

High PARP1 immunoreactivity in patients without lymph node metastases was significantly associated with higher Breslow tumor thickness, presence of ulceration and higher mitotic index ( $p=0.0016$ ,  $p=0.023$  and  $p<0.001$ , respectively). In patients with nodal metastases, high PARP1 expression significantly correlated with presence of microsatellitosis ( $p=0.034$ ). In the entire analyzed group, PARP1 expression was significantly associated with high mitotic index ( $p=0.001$ ) and presence of ulceration ( $p=0.036$ ). Moreover, in patients with elevated PARP1 expression, melanoma was more frequently located in the skin of head and neck region ( $p=0.015$ ).

**CONCLUSIONS.** High PARP1 expression is a new marker of unfavourable prognosis in patients without regional lymph node metastases. It also significantly correlates with morphological parameters indicating enhanced invasiveness of primary tumor cells (e.g., high mitotic index and presence of ulceration). PARP1 overexpression may result from DNA damage due to UV-radiation exposure

– primary tumors with elevated PARP1 expression were more frequently located in the head and neck region.



## 10. SPIS TABEL

<b>Tabela 1.</b> Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy badawczej.....	41
<b>Tabela 2.</b> Parametry histopatologiczne guzów pierwotnych.....	43
<b>Tabela 3.</b> Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami klinicznymi pacjentów z czerniakiem skóry .....	52
<b>Tabela 4.</b> Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami histopatologicznymi guzów pierwotnych pacjentów z czerniakiem skóry.....	54
<b>Tabela 5.</b> Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami klinicznymi pacjentów z czerniakiem skóry bez przerzutów w węzłach chłonnych .....	57
<b>Tabela 6.</b> Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami histopatologicznymi guzów pierwotnych pacjentów z czerniakiem skóry bez przerzutów w węzłach chłonnych.....	59
<b>Tabela 7.</b> Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami klinicznymi pacjentów z czerniakiem skóry i przerzutami w węzłach chłonnych .....	62
<b>Tabela 8.</b> Analiza korelacji pomiędzy ekspresją PARP1 i parametrami histopatologicznymi guzów pierwotnych pacjentów z czerniakiem skóry i przerzutami w węzłach chłonnych ...	64

## 11. SPIS MIKROFOTOGRAFII, SKANÓW I WYKRESÓW

<b>Mikrofotografia 1.</b> Brak ekspresji PARP1 w komórkach czerniaka (×400).....	45
<b>Mikrofotografia 2.</b> Niedużego stopnia ekspresja PARP1 w obrębie jąder komórek czerniaka. Brak immunoreaktywności w obrębie keratynocytów (×400).....	45
<b>Mikrofotografia 3.</b> Wysoka ekspresja PARP1 w komórkach czerniaka w komponente melanoma in situ (×200) .....	46
<b>Mikrofotografia 4.</b> Pagetoidny typ naciekania naskórka przez PARP1-dodatnie komórki czerniaka (×400).....	46
<b>Mikrofotografia 5.</b> Nadekspresja PARP1 w obrębie komórek czerniaka in situ oraz wysoki odsetek PARP1-dodatnich limfocytów (×200) .....	47
<b>Mikrofotografia 6.</b> Wysoka immunoreaktywność PARP1 w obrębie komórek czerniaka inwazyjnego (×200).....	47
<b>Skany 1.</b> Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań (strona 1.).....	49
<b>Skany 2.</b> Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań (strona 2. – ostatnia).....	50
<b>Wykres 1.</b> Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość CSOS .....	55
<b>Wykres 2.</b> Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość DFS .....	56
<b>Wykres 3.</b> Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość CSOS u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych .....	60
<b>Wykres 4.</b> Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość DFS u pacjentów bez przerzutów w węzłach chłonnych .....	61
<b>Wykres 5.</b> Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość CSOS u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych .....	65
<b>Wykres 6.</b> Znaczenie prognostyczne immunoreaktywności PARP1 w kontekście wpływu na długość DFS u pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych .....	66

## 12. WYKAZ SKRÓTÓW

**AIF** (*apoptosis inducing factor*) – czynnik indukujący apoptozę

**AJCC** (*American Joint Committee on Cancer*) – Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka

**ALM** (*acral lentiginous melanoma*) – czerniak akralny, czerniak odsiebnych części kończyn

**ARH** (*ADP-ribosyl-acceptor hydrolase*) – hydrolaza ADP-rybozy

**ART** (*ADP-ribosyltransferase*) – ADP-rybozylotransferaza

**ARTD`1-17** (*ADP-ribosyltransferase diphtheria-toxin like 1-17*) – ADP-rybozylotransferaza 1-17 podobna do toksyny błoniczej

**BAP1** (*BRCA1-associated protein-1*) – białko 1 związane z BRCA1

**BCC** (*basal cell carcinoma*) – rak podstawnokomórkowy

**BER** (*base excision repair*) – naprawa uszkodzonego DNA przez wycięcie zasady

**BRCA1/2** (*breast cancer type 1 or 2 susceptibility protein*) – białko BRCA1/2

**BRCT** (*C-terminal domain of breast cancer protein BRCA1*) – C-końcowa domena dla białka BRCA1

**CAP** (*College of American Pathologists*) – Kolegium Amerykańskich Patologów

**COPD** (*chronic obstructive pulmonary disease*) – przewlekła obturacyjna choroba płuc

**CSOS** (*cancer-specific overall survival*) – czas przeżycia specyficznego dla choroby nowotworowej

**CTLA-4** (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*) antigen 4 cytotoksycznych limfocytów T

**DFS** (*disease-free survival*) – czas przeżycia wolny od nawrotu choroby

**DSB, dsDB** (*double-strand break*) – dwuniciowe uszkodzenie (pęknięcie) DNA

**FAMMM** (*familial atypical multiple mole melanoma syndrome*) – zespół rodzinnego występowania znamion atypowych i czerniaka

**FEN1** (*flap endonuclease 1*) – flap endonukleaza 1

**GDP** (*guanine nucleotide diphosphate*) – guanozynydifosforan

**GEF** (*guanine-nucleotide exchange factor*) – czynnik wymiany nukleotydu guaniny

**GPCR** (*G-protein coupled receptor*) – receptor związany z białkiem G

**GTP** (*guanine nucleotide triphosphate*) – guanozynotrifosforan

**HDR, HR** (*homology-directed repair, homologous recombination*) – naprawa uszkodzonego DNA na drodze rekombinacji homologicznej

**IHC** (*immunohistochemistry*) – immunohistochemia, metoda immunohistochemiczna

**IκB** (*inhibitor of κB*) – inhibitor κB

**IFN α-2b** (*interferon α-2b*) – interferon α-2b

**IL-2** (*interleukin-2*) – interleukina 2

**IRS** (*immunoreactive score*) – wskaźnik IRS, wskaźnik immunoekspresji

**LM** (*lentigo maligna*) – plama soczewicowata

**LMM** (*lentigo maligna melanoma*) – czerniak rozwijający się z plamy soczewicowatej

**MAPK** (*mitogen-activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana mitogenami

**MAR** (*mono (ADP-ribose)*) – monomer ADP-rybozy

**MC1R** (*melanocortin 1 receptor*) – receptor dla melanokortyny 1

**MCM** (*mucosal melanoma*) – czerniak błon śluzowych

**MEK-1/2** (*MAPK/ERK kinase-1 and -2*) – kinaza 1/2 MAPK/ERK

**MIF** (*macrophage migration inhibitory factor*) – czynnik hamujący migrację makrofagów

**MMEJ** (*microhomology-mediated end-joining*) – naprawa uszkodzonego DNA poprzez łącze końców w oparciu o mikrohomologię

**MMR** (*mismatch repair*) – naprawa uszkodzonego DNA poprzez naprawę błędnie sparowanych nukleotydów

**mTORC1** (*mammalian target of rapamycin complex 1*) – kompleks 1 mTOR

**NAD<sup>+</sup>** (*nicotinamide adenine dinucleotide*) – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

**NER** (*nucleotide excision repair*) – naprawa uszkodzonego DNA poprzez wycięcie nukleotydów

**NF1** (*neurofibromin 1*) – neurofibromina 1

**NFκB** (*nuclear factor-κB*) – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB

**NHEJ** (*non-homologous end joining*) – naprawa uszkodzonego DNA na drodze niehomologicznego łączenia końców DNA

**NM** (*nodular melanoma*) – czerniak guzkowy

**NRF** (*nuclear respiratory factor*) – jądrowy czynnik oddechowy 1

**OFTPPC** (*ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer*) – rak jajnika, jajowodu i pierwotny rak otrzewnej

**OAR** (*oligo (ADP-ribose)*) – oligomer ADP-rybozy

**PAR** (*poly (ADP-ribose)*) – polimer ADP-rybozy

**PARG** (*poly (ADP-ribose) glycohydrolase*) – glikohydrolaza poli(ADP-rybozy)

**PARP1-16** (*poly (ADP-ribose) polymerase 1-16*) – polimeraza poli(ADP-rybozy) 1-16

**PARP-i** (*PARP inhibitor*) – inhibitor PARP

**PD-1** (*programmed cell death protein 1*) – białko programowanej śmierci komórki 1

**PDK** (*phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) – kinaza 1 zależna od fosfoinozytydu

**PI3K** (*phosphatidylinositol 3-kinase*) – kinaza 3 fosfatydyloinozytolowa

**PIP2** (*phosphatidylinositol 4,5-diphosphate*) – 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu

**PIP3** (*phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) – 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu

**PTEN** (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*) – białko PTEN

**RAF** (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) – rodzina białek RAF

**RAS** (*rat sarcoma*) – rodzina białek RAS

**RTK** (*receptor thyrosine kinase*) – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej

**SCC** (*squamous cell carcinoma*) – rak płaskonabłonkowy

**SGTP** (*small guanine triphosphatases*) – mała GTP-aza, mała guanozynotrifosfataza

**SL** (*synthetic lethality*) – sztucznie indukowana letalność

**SNLB** (*sentinel lymph node biopsy*) – biopsja węzła wartowniczego

**SSB, ssDB** (*single-strand break*) – jednoniciowe uszkodzenie (pęknięcie) DNA

**SSM** (*superficial spreading melanoma*) – czerniak szerzący się powierzchownie

**TILs** (*tumor-infiltrating lymphocytes*) – limfocytarny naciek zapalny

**TSC2** (*tuberous sclerosis complex 2*) – kompleks stwardnienia guzowatego 2, tuberyna

**αMSH** (*α-melanocyte-stimulating hormone*) – melanotropina α, hormon stymulujący melanocyty α