

O C E N A

rozprawy doktorskiej lek. Michała Piotra Wągrodzkiego zatytułowanej
**„Ocena przydatności oznaczenia mutacji genu *H3F3A* w diagnostyce guza
olbrzymiokomórkowego kości”.**

Moją recenzję pragnę zacząć od gratulacji zarówno dla Promotora, jak i dla Doktoranta, a to za przyczyną tematu dysertacji, którą mam przyjemność recenzować. Obydwu Panom, którzy nakreślili temat i kierunek prac zawartych w dysertacji składam szczególne gratulacje.

Wiarygodność diagnostyczna analizy badań obrazowych i genetycznych umożliwiających postawienie rzetelnego rozpoznania klinicznego, nadal jest problemem w zakresie nauk podstawowych i stosowanych, mimo rozwoju wiedzy i technik badawczych guzów tkanki kostnej.

Rozpoznanie guza olbrzymiokomórkowego kości stanowi zasadniczy problem kliniczny, zarówno onkologiczny jak i ortopedyczny dotyczący nawrotów miejscowych, szczególnie po ich wyłyżeczkowaniu, niezależnie od wypełnienia łoży; cementem kostnym lub kością gąbczastą z fenolem czy ciekłym azotem. Zatem zagadnienie to jest szczególnie istotne dla pojęcia rzetelnej decyzji leczniczej prowadzącej do wyleczenia.

O trudności problemu świadczy fakt, że przedmiotem rozprawy jest guz nazwany przez odkrywców „osteoclastoma” przed niemal 200 laty i dotychczas stwarza problemy diagnostyczne, co umacnia zasadność przedmiotu rozprawy.

Szczęśliwie prognostycznie, że badania molekularne nowotworów, w tym kostnych stają się coraz częściej integralną częścią procesu diagnostycznego.

Wiarygodne rozpoznanie bowiem jest podstawą decyzji szczególnie w zakresie możliwości zastosowania terapii celowanej wraz z wprowadzeniem do leczenia GCTB przeciwciała przeciwko RANKL – denosumabu, pojawiła się zatem szansa na zastosowanie spersonalizowanej terapii także u chorych z guzem olbrzymiokomórkowym.

Rachunek ekonomiczny badań diagnostycznych jest również istotny, zatem wykonanie tańszego badania przesiewowego, które umożliwia pośrednią ocenę zmian genetycznych w laboratoriach nie dysponujących pracownią badań molekularnych wydaje się bardzo praktycznym.

Uważam zatem, iż w pełni uzasadnione było podjęcie przez Doktoranta pracy badawczej dotyczącej genetycznej diagnostyki guza olbrzymiokomórkowego kości, nie tylko oceny wiarygodności diagnostycznej, ale również standardów klinicznego leczenia, w tym ortopedycznego, co szczególnie wysoko cenię.

W tym miejscu pragnę pogratulować Panu Profesorowi Piotrowi

Rutkowskiemu siły naukowego oddziaływania na zainteresowania kandydata do stopnia doktora nauk medycznych problemami diagnostyki molekularnej guza olbrzymiokomórkowego kości, tak bardzo ważkimi z klinicznego i społecznego punktu widzenia.

Przedłożona do recenzji rozprawa podnosi zatem istotny klinicznie Problem poznawczy i kliniczny, którego opracowanie jest ze wszech miar zasadne, a praktycznie oczekiwane.

Rozprawa ma charakter kliniczny o typowym dla tego rodzaju prac układzie rozdziałów.

Wstęp, jak również wynikający z treści pracy rys historyczny przedstawił autor w oparciu o 147 pozycji piśmiennictwa anglojęzycznego. Autor tym samym wykazał wysoki poziom orientacji w stanie dotychczasowej wiedzy na temat będący przedmiotem rozprawy. Większość pozycji piśmiennictwa mieści się w ostatnich 7 latach, kilka pozycji jest wydanych w latach wcześniejszych, znaczy, że autor uważał je za historycznie istotne, co uważam za uzasadnione.

Z przeglądu źródeł piśmiennictwa doktorant wyciąga wnioski w sposób jasny i syntetyczny. Wystarczająco uzasadnił potrzebę realizacji własnej pracy wynikającą z dociekliwości badawczej rzetelnej diagnostyki guza olbrzymiokomórkowego, który określany jest w piśmiennictwie i praktyce klinicznej jako najtrudniejsza do diagnostyki zmiana kości. Trudności te wynikają z tego, że guz ten wykazuje zmienną prezentację kliniczną, może występować nietypowo u pacjentów w okresie wzrostu, jak również u osób starszych. Bywa zlokalizowany przynasadowo. Nadto może być mylony z mięsakiem kości, co jest szczególnie istotnym prognostycznie.

W liczącej 139 stron druku rozprawie autor odniósł się do tego, co w istocie dotyczyło uwarunkowań przydatności zastosowania badania mutacji genu *H3F3A* w diagnostyce guza olbrzymiokomórkowego, który jest miejscowo złośliwym nowotworem kości, a stanowi 5 do 8,6% wszystkich pierwotnych guzów kości. Istotnym jest również fakt, że guz ten dotyczy ludzi młodych dorosłych, po zarośnięciu płytek wzrostowych. Autor syntetycznie analizuje zagadnienia badawcze poddając krytyce ich wiarygodność diagnostyczną.

Doktorant zwraca uwagę na badania molekularne nowotworów, które stają się integralnym elementem diagnostyki różnicowej, szczególnie w odniesieniu do możliwości leczenia celowanego. Doktorant bazuje na fakcie wprowadzenia do leczenia guzów olbrzymiokomórkowych kości ludzkiego przeciwciała monoklonalnego (IgG₂) przeciwko RANKL (ligand RANK) - denosumabu, co właśnie jest szansą na zastosowanie terapii celowanej w przedmiotowym guzie.

Ekonomiczny element diagnostyki dotyczy wysokich kosztów oznaczeń molekularnych, co powoduje, że w pracowniach patomorfologii podejmowane są próby zastosowania markerów immunohistochemicznych celem wykrycia zmian genetycznych, jako tańszego badania przesiewowego, jednak potwierdzającego obecność zmian molekularnych umożliwiających pośrednią ocenę zmian genetycznych.

Z rozważań zawartych w części wstępnej pracy wynikają założenia i cele

rozprawy doktorskiej poprzedzone przez trzy analityczne hipotezy badawcze. do których należą:

1. Guzy olbrzymiokomórkowe kości charakteryzują się nieobecnością mutacji Genu *H3F3A*.
2. Inne niż GCTB zmiany olbrzymiokomórkowe kości nie wykazują mutacji genu *H3F3A*.
3. Immunologiczna reakcja z przeciwciałem anti-H3.3 G34W jest czułą i swoistą metodą oceny statusu mutacyjnego genu *H3.3G34W* jest czułą i swoistą metodą oceny statusu mutacyjnego genu *H3F3A*.

Celem praktycznym rozprawy jest opracowanie nowych algorytmów diagnostycznych guza olbrzymiokomórkowego kości w Polsce z implementacją badań molekularnych i z zastosowaniem właściwych technik odwapnienia materiału kostnego w celu zmniejszenia odsetka błędów medycznych oraz właściwego zastosowania terapeutycznego przeciwciała anti-RANKL (denosumab). Badania zrealizował doktorant w uznanych zakładach; Zakładzie Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej pod kierownictwem pani prof. Moniki Prochorec-Sobieszek oraz Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej pod kierownictwem pana prof. Janusza Aleksandra Siedleckiego w Narodowym Instytucie Onkologii w Warszawie.

Badanie było finansowane z grantu wewnętrznego Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie nr SN/GW30/2017.

Miejscowa Komisja Bioetyczna wyraziła zgodę (nr decyzji 7/2018).

Badania molekularne i histochemiczne przeprowadził doktorant w latach 2015-2019. Należą do nich zagadnienia dotyczące wielu elementów. Na uwagę zasługuje fakt, że autor jako pierwszy w Polsce przedłożył przydatność oznaczeń mutacji genu *H3F3A* w diagnostyce różnicowej GCTB.

Celem teoretyczno-poznawczym badania była ocena czułości i specyficzności wykrywania mutacji genu *H3F3A* w GCTB ocenianej przy zastosowaniu dwóch technik badawczych – sekwencjonowania metodą Sangera oraz badania immunohistochemicznego.

Celem praktycznym pracy badawczej było opracowanie nowych algorytmów diagnostycznych GCTB w Polsce, z implementacją testowanych badań molekularnych i immunohistochemicznych, w celu zmniejszenia odsetka błędów medycznych oraz właściwego zastosowania terapeutycznego przeciwciała anti-RANKL (denosumabu). Realizując postawione cele pracy autor zastosował metody odpowiednie warsztatowo.

Materiał badawczy stanowiło 210 chorych, w tym 116 z rozpoznaniem GCTB jako grupa badana i 94 chorych z rozpoznaniem innej niż GCTB zmiany olbrzymiokomórkowej kości, jako grupa kontrolna.

Sposób doboru analizowanych chorych i postawienie warunków odcinających świadczy o rzetelności badacza zmierzającego do opracowania grup jednorodnych przyczynowo. Biorąc pod uwagę szeroki zakres analizy klinicznej liczby te uważam za wystarczające w zastosowanej metodzie badawczej.

Metoda badania polegała na sekwencjonowaniu bezpośrednim i odczynach immunohistochemicznych przeprowadzonych na tkankach pochodzących z biopsji

guzów, utrwalonych w zbuforowanym roztworze formaliny, odwapnionych i zatopionych w bloczkach parafinowych.

Materiał biologiczny dotyczył 123 próbek z biopsji gruboigłowych Tru-Cut przeprowadzony przez zespół Kliniki Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków w Narodowym Instytucie Onkologii pod kierunkiem pana prof. Piotra Rutkowskiego, a 87 próbek pochodziło z innych ośrodków.

W programie badań stwierdzono racjonalne uporządkowanie poszczególnych etapów. Wyniki tychże badań zaprezentował autor właściwie, w sposób niesłychanie drobiazgowy. Uzyskane wyniki badań Doktoranta są czytelne i przydatne dla praktyki klinicznej. Dokumentacja w całości posiada wysoką jakość techniczną i przejrzystość. Omawianie wyników cechuje logika w doborze grup problemowych.

Dyskusję autor przeprowadził w sposób naukowo dojrzały, poparty doświadczeniem badawczym w zakresie hipotez badawczych, które potwierdził oraz przydatności analizy mutacji genu *H3F3A* w guzach olbrzymiokomórkowych w aspekcie praktycznym.

Całość rozprawy, a zwłaszcza „dyskusja” świadczą o dużym odczytaniu autora i bardzo dobrej znajomości poruszanego tematu, jak również o właściwym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia analizy oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na uzyskane wyniki.

Doktorant wykonał benedyktyńską pracę w analizie materiału badawczego przedłożoną na przejrzystych 17 tabelach, 20 rycinach oraz materiale obrazowym w załączniku pracy, co w istotny sposób dopełnia wartość rozprawy. Wynikami badań doktorant udowodnił wysoką czułość i specyficzność sekwencjonowania metodą Sagera w wykrywaniu mutacji genu *H3F3A* w GCTB. Czułość metody wynosiła 100% oraz jej specyficzność również 100%.

Doktorant ocenił również, że czułość i specyficzność badania immunohistochemicznego z zastosowaniem przeciwciała anti-histon H3.3 G34W w wykrywaniu mutacji w genie *H3F3A* w GCTB wynosiła odpowiednio 95,2% (95% CL: 90,6% - 99,8%) i 100% (95CL: 94,9%-100%).

Na podstawie przeprowadzonych badań i analizy wyników doktorant określił następujące wnioski zgodne z tematem rozprawy oraz odpowiadające w sposób krytyczny na cele pracy:

1. Wykrycie mutacji w kodonie 35 genu *H3F3A* metodą sekwencjonowania bezpośredniego umożliwia pewne rozpoznanie GCTB.
2. Badania immunohistochemicznego z zastosowaniem przeciwciała anti-histon H3.3 jest równie specyficzną, jednak mniej czułą metodą wykrywania GCTB niż badanie molekularne. Badanie immuno-histochemiczne może służyć jako metoda przesiewowa do wykrycia w GCTB mutacji p.Gly35Trp genu *H3F3A*.
3. Wynik badania immunohistochemicznego z zastosowaniem przeciwciała anti-histon H3.3 powinien być zweryfikowany badaniem molekularnym w ośrodku referencyjnym dla diagnostyki guzów kości.
4. Badanie molekularne pozostaje złotym standardem oceny statusu mutacyjnego genu *H3F3A*.

5. Zastosowanie badań molekularnych do diagnostyki zmian kostnych wymaga właściwego odwapnienia materiału kostnego przez zastosowanie roztworu EDTA.

Oryginalności rozprawy upatruję w opracowanej przez Doktoranta głębokiej i zróżnicowanej analizie badawczej przeprowadzonej zarówno w odniesieniu poznawczym, ale i praktycznym.

Podsumowując należy podkreślić, że **lek. Michał Piotr Wągorodzki** podjął bardzo istotne badania dla współczesnej onkologii, ortopedii i radiologii.

Doktorant wykazał umiejętność samodzielnej pracy naukowej, korzystania z piśmiennictwa, logicznego i zwięzłego formułowania wyników badań i spostrzeżeń.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska zatytułowana „**Ocena przydatności oznaczenia mutacji genu *H3F3A* w diagnostyce guza olbrzymiokomórkowego kości**” odpowiada w pełni wymogom stawianym pracom doktorskim w myśl ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych i na tej podstawie mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie wniosek o dopuszczenie lek. Michała Piotra Wągorodzkiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie tejże rozprawy doktorskiej.

Uzasadnieniem wniosku są następujące fakty:

- rozprawa jest wielospecjalistyczna, dotyczy złożonych i aktualnych zagadnień współczesnej onkologii, ortopedii i radiologii
- dobór metod badawczych znacznie wykracza poza zakres powszechny
- Doktorant wykonał „benedyktyńską” pracę analizy materiału klinicznego, przejrzystego i przystępnego zobrazowania oraz krytycznej analizy danych
- opracował sposób postępowania w zakresie koniecznym do wiarygodnej analizy patomorfologicznej, immunologicznej i histochemicznej guza olbrzymiokomórkowego
- rozprawa zawiera istotne elementy badawcze z możliwością zastosowania w pracy klinicznej.
- autor jako pierwszy w Polsce przedłożył przydatność oznaczeń mutacji genu *H3F3A* w diagnostyce różnicowej GCTB.

Prof. dr hab. n. med.
M. Karayński
CENTRUM ONKOLOGII-INSTYTUTU
im. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE
ul. Pawłowska 18 A
01-422 Warszawa
tel. 22 628 11 10
fax 22 628 11 13