

Gdańsk, 22.03.2020.

Prof. dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska
Zakład Patologii i Neuropatologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
eczis@gumed.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Michała Wągradzkiego na temat:
„Ocena przydatności statusu mutacji genu *H3F3A* w diagnostyce guza
olbrzymiokomórkowego kości”**

Promotor Prof. dr hab. med. Piotr Rutkowski,
Promotor pomocniczy dr med. Andrzej Tysarowski

Pierwotne nowotwory kości stanowią szczególną i heterogenną grupę guzów pod względem epidemiologicznym, klinicznym i histopatologicznym. W ostatnich latach odkryto charakterystyczne zmiany genetyczne występujące w pewnych typach guzów. Postęp w diagnostyce i leczeniu chirurgicznym oraz onkologicznym spowodował podniesienie jakości i wydłużenie życia znacznej liczby chorych ze złośliwymi i miejscowo złośliwymi nowotworami kości. Jednakże wiele z tych nowotworów diagnozowanych jest w zaawansowanym stadium, ma niekorzystną lokalizację, albo charakteryzuje się opornością na dostępne terapie. Pogłębianie wiedzy na temat biologicznych uwarunkowań powstawania i przebiegu nowotworów konieczne jest do opracowania nowych metod diagnostycznych i leczniczych. Guz olbrzymiokomórkowy kości, będący tematem rozprawy jest nowotworem rzadkim o występowaniu ok. 1/ mln/ rok. Nowotwór ten rozwija się najczęściej u młodych dorosłych, ma skłonność do wznów miejscowych, pewien odsetek guzów jest pierwotnie złośliwy lub progresja złośliwości występuje we wznowie. Guz ten może mieć nietypową prezentację radiologiczną i heterogenne utkanie histologiczne ze zmianami wtórnymi, co w małym materiale biopsyjnym uniemożliwia ustalenie jednoznacznego rozpoznania. Ponieważ spektrum zmian należących do kręgu histopatologicznej diagnostyki różnicowej olbrzymiokomórkowych zmian kostnych jest szerokie, konieczne jest stosowanie metod immunohistochemicznych i molekularnych. Temat badań podjętych w pracy doktorskiej lek. Michała Wągradzkiego jest aktualny i ważny, zawiera aspekty poznawcze i praktyczne.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska posiada formę jednostronnego wydruku komputerowego w twardej oprawie, liczącego 138 stron, z wykazem tabel, rycin i obfita dokumentacją fotograficzną oraz załącznikami schematycznie prezentującymi metodę

odwapienia kości oraz proponowany algorytm diagnostyczny zmian olbrzymiokomórkowych kości. Ogólna struktura rozprawy jest typowa dla prac doktorskich w dziedzinie nauk medycznych. Na początku rozprawy doktorant przedstawia informację o finansowaniu badań, które zrealizowano ze środków projektu badawczego SN/GW30/2017 przyznanych przez NIO im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Spis treści monografii jest szczegółowy i wyczerpujący, z właściwymi odnośnikami do stron. Streszczenie w języku polskim i angielskim stanowi ustrukturyzowany informatywny tekst. Autor przedstawił także szczegółowy wykaz skrótów stosowanych w dysertacji. Tekst pracy ilustrowany jest licznymi rycinami i schematami autorstwa własnego lub zaczerpniętymi z literatury. Obecne są jedynie nieliczne błędy literowe i edytorskie. Przydatne w czytaniu są umieszczone na końcu monografii wykazy: tabel (praca zawiera 17 czytelnych tabel zbiorczych) oraz rycin (20 rycin z opisowymi tytułami). Rozprawa napisana jest staranną polszczyzną z zachowaniem płynności tekstu i przejrzystości prezentowanych danych.

Wstęp pracy liczy 26 stron i podzielony został na podrozdziały, w których dokonano szczegółowej charakterystyki klinicznej, radiologicznej, histologicznej i molekularnej badanego typu nowotworu - guza olbrzymiokomórkowego kości. We wstępie podkreślono trudności diagnostyczne dotyczące nowotworów kości, konieczność ścisłej współpracy pato-klinicznej i bezwzględnej korelacji z obrazem radiologicznym. Zdobycie gruntownego doświadczenia w rozpoznawaniu zwłaszcza guzów rzadkich lub o nietypowej prezentacji klinicznej możliwe jest w referencyjnym ośrodku specjalistycznym z wzorcową współpracą zespołową. Doktorant porusza także problematykę leczenia badanego typu guza kości, uwzględniając aspekty chirurgiczne oraz omawiając dostępną od kilku lat nowoczesną terapię denosumabem - przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko RANKL. Denosumab zapobiegając interakcji RANKL/RANK hamuje powstawanie, aktywację i przeżycie osteoklastów, zmniejszając w ten sposób resorpcję kości. Terapia podejmowana jest w przypadku znacznego zaawansowania guza, nawrotu lub stadium przerzutowego.

W kolejnym podrozdziale wstępu autor omawia zwięźle białka histonowe – ich strukturę, warianty, modyfikacje posttranslacyjne oraz kodujące je geny. Białka te powinny być szerzej omówione pod względem funkcjonalnym ze względu na temat dysertacji odnoszący się do mutacji genu kodującego białka histonowe.

Przegląd piśmiennictwa dotyczący mutacji genu *H3F3A* w nowotworach został przeprowadzony w sposób merytoryczny i klarowny. Należy podkreślić, że historia tych badań ma dopiero kilka lat. W 2012 roku mutacje *H3F3A* opisano w glejakach u dzieci, a w

2013 r. w guzie olbrzymiokomórkowym kości wykazano mutacje punktowe w kodonie 34 *H3F3A* p.Gly34Trp (97% przypadków) i p.Gly34Leu. W grupie innych guzów kości podobne zmiany stwierdzono poza tym głównie w niewielkich podgrupach kostniakomięsaków wysokiego stopnia złośliwości histologicznej. Mutacje *H3F3B* występują natomiast w chrzęstniakach zarodkowych. Zmiany w genach kodujących białka histonów H3.3 rzadko dotyczą innych nowotworów człowieka. Doktorant wyjaśnia postulowaną rolę mutacji *H3F3A*, polegającą na zaburzeniach regulacji epigenetycznej, zmianie transkrypcji pewnych genów, deregulacji dojrzewania, różnicowania i proliferacji komórek. W guzie olbrzymiokomórkowym dochodzi m.in. do nadekspresji białka RANKL związanej z wtórą osteoklastogenezą i nadekspresji TP63.

W dalszej części doktorant wspomina o dostępności komercyjnych przeciwciał wykrywających mutacje genu *H3F3A*. Warto byłoby szerzej skomentować przeciwciała wykrywające białka będące efektem mutacji onkogennych, ze względu na ich użyteczność we współczesnej patomorfologii i onkologii. W ostatniej części wstępu doktorant komentuje krótko metody wykrywania mutacji punktowych, odnosząc się kilkakrotnie do ceny tych badań. Należy podkreślić, że wstęp pracy jest napisany interesująco i merytorycznie poprawnie, ujawnia wysoką wiedzę doktoranta i dogłębne zrozumienie poruszanych zagadnień naukowych w obszarze patologii guzów kości.

Rozdział Założenia i cele pracy badawczej. W rozdziale tym umieszczono cele i jasno sformułowane hipotezy badawcze. Celem głównym pracy doktorskiej była ocena przydatności oznaczeń mutacji *H3F3A* w diagnostyce różnicowej guza olbrzymiokomórkowego kości. Lek. Michał Wądrodzki wyodrębnił cel teoretyczno-poznawczy jakim była ocena czułości i specyficzności wykrywania mutacji genu *H3F3A* przy zastosowaniu sekwencjonowania bezpośredniego metodą Sangera oraz badania immunohistochemicznego. Drugim celem był cel praktyczny polegający na opracowaniu nowych algorytmów diagnostycznych w badanym typie nowotworu. Hipoteza 1. „Guzy olbrzymiokomórkowe kości charakteryzują się obecnością mutacji genu *H3F3A*” nie wymaga weryfikacji, bowiem od kilku lat ww. mutacja to ustalona i typowa cecha molekularna tych nowotworów.

Materiał i metodykę badawczą opisano właściwie i wyczerpująco. Umieszczono informację o zgodzie Komisji Bioetycznej NIO W Warszawie na prowadzenie badań. Materiał do badań pochodził od 210 pacjentów z guzami kości, w tym 116 z guzem olbrzymiokomórkowym i 94 z innymi zmianami olbrzymiokomórkowymi (kostniakomięsaki, ziarniniaki olbrzymiokomórkowe, torbiele tętniakowate, chrzęstniaki zarodkowe, guzy

brunatne i inne), diagnozowanych i leczonych w referencyjnym ośrodku klinicznym Klinice Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków NIO w Warszawie. 123 próbki pochodziły z biopsji gruboigłowych wykonanych w ww. ośrodku. 87 przypadków (materiał z biopsji otwartych, gruboigłowych i wyłyżeczkowania guza), nadesłanych do konsultacji, pochodziło z różnych 39 ośrodków w Polsce. Badania doktorskie prowadzono w latach 2015-2019, w okresie 2015-18 gromadzono materiał tkankowy i poddawano go szczegółowej ocenie histopatologicznej, a w okresie 2018-19 przeprowadzono badania immunohistochemiczne i molekularne oraz analizę statystyczną. Materiał tkankowy z NIO przeprowadzano w odczynniku oxfordzkim i/lub EDTA w celu optymalnego odwapnienia z minimalizacją degradacji materiału genetycznego guza. U części pacjentów z NIO powtarzano biopsję w przypadku zbyt małej ilości materiału do badań molekularnych. We wszystkich przypadkach dysponowano wynikami badań radiologicznych i wywiadem klinicznym oraz krótką obserwacją pooperacyjną, bądź po leczeniu denosumabem. Materiał na podstawie korelacji radiologiczno-histopatologiczno-klinicznych i molekularnych podzielono na dwie grupy: guzy olbrzymiokomórkowe kości (GCTB) i na inne zmiany olbrzymiokomórkowe kości (non-GCTB). Taki perfekcyjny dobór grupy badawczej i kontrolnej podnosił informatywność i znamienność uzyskanych wyników. Jednakże istotna część danych z Rozdziału 3 dysertacji, które do precyzyjnego wyodrębnienia grup badawczej i kontrolnej pozyskano w efekcie szczegółowych analiz i badań opisanych w metodach, powinna znaleźć się w rozdziale Wyniki. Autor każdorazowo podaje dokładne kryteria włączenia próbek do badań molekularnych oraz zastosowane odczynniki i szczegółową, zgodną z dobrą praktyką laboratoryjną, metodykę wykonania analiz. W analizie wykorzystano samodzielnie zaprojektowane startery genów *H3F3A*, *H3F3B*, *GNAS8* i *GNAS9*. Badania te wykonano przy użyciu nowoczesnej aparatury i odczynników komercyjnych wysokiej klasy. Zastosowano typowe i zindywidualizowane metody izolacji DNA. Przeprowadzono sekwencjonowanie bezpośrednie DNA, w oparciu o sekwenator kapilarny ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Interpretację wyników wykonano manualnie analizując fluorogram w programach Chromas lub FinchTV, w oparciu o ścisłe kryteria oceny. Kolejnym elementem badań molekularnych były badania metodą *FISH* oceniające rearanżację genu *USP6/TRE17* (sonda typu *break-apart*) oraz status *MDM2* (sonda *MDM2/CCP12*). Doktorant podał szczegółowy protokół badania *FISH* i kryteria jego oceny dla analizowanych genów, dokonywanej przez dwóch niezależnych diagnostów. Przeprowadzano też statystyczną analizę zgodności oceny odczynów pomiędzy badaczami. Kolejny etap badań stanowiła analiza immunohistochemiczna odczynów wg opracowanej procedury, z przeciwciałem anti-histon H3.3 G34W (RM263), oraz H3.3 K36M (RM193)

(Biosciences). Ocenę odczynów przeprowadzało dwóch niezależnych badaczy w skali procentowej w odniesieniu do komórek jednojądrowych.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań została wykonana przy użyciu programu IBM SPSS Statistics 23.0.0.2. Zastosowano właściwe testy statystyczne, posłużono się wykresami dobrze wizualizującymi uzyskane wyniki.

Rozdział Wyniki, stanowi 16 stron manuskryptu, doktorant przedstawił w sposób bardzo uporządkowany i logiczny, umieszczając wykresy i tabele. Wysokiej jakości odczyny immunohistochemiczne ukazuje umieszczona w załączniku obszerna dokumentacja fotograficzna z adekwatnymi szczegółowymi opisami. Czulość i specyficzność dla mutacji *H3F3A* w grupie GCTB w badanej grupie wyniosła 100%, przy czym w 114/116 przypadków ujawniono typową najczęściej występującą substytucję p.Gly35Trp (G35W).

W badaniach immunohistochemicznych, stwierdzono czulość i specyficzność odczynu białka p.Gly35Trp H3.3 odpowiednio w 95,2% i 100% przypadkach GCTB. Zgodność oceny IHC pomiędzy obserwatorami była bardzo wysoka. Przeprowadzono także porównanie aktywności mitotycznej dla GCTB klinicznie latentnych i agresywnych, wykazując istotną zależność aktywności mitotycznej z agresywnym przebiegiem guza. Zależności aktywności mitotycznej od agresywności radiologicznej GCTB wg skali Campanacci natomiast nie stwierdzono. Ostatnią krótką część wyników stanowi podrozdział dotyczący odsetka zmiany rozpoznania w materiale nadesłanym do konsultacji w NIO w Warszawie. Poza danymi numerycznymi nie ma jednak szczegółowych informacji na temat typów zmienianych rozpoznań histologicznych, co miałoby istotną wartość dydaktyczną. W wynikach nie pokazano też podstawowych danych pato-klinicznych badanych przypadków GCTB. Nie ma charakterystyki wyodrębnionej grupy guzów po leczeniu denosumabem oraz podgrupy wtórnych złośliwych guzów olbrzymiokomórkowych. Do kryteriów włączenia do grupy non-GCTB należały wyniki badań molekularnych, których nie zaprezentowano w pracy. Część z ww. informacji, które powinny być ujęte w wynikach, pojawia się w dyskusji.

W rozdziale **Dyskusja** autor przeprowadził krytyczną analizę metodologii i omówienie wyników własnych, odnosząc się szczegółowo do dostępnej literatury tematu. Bardzo cenną część tego rozdziału stanowi omówienie aspektów histopatologicznych, świadcząca o doświadczeniu i profesjonalizmie doktoranta. Wysoko oceniam też rozważania poświęcone procedurom opracowania / odwapnienia materiału kostnego w kontekście badań molekularnych i immunohistochemicznych. Uszczegółowienie procedur odwapniania materiału tkankowego ma dużą wartość praktyczną i edukacyjną. Omówienie wyników molekularnych wskazuje na zgodność uzyskanych wyników z dostępnymi publikacjami w

zakresie częstości i typu mutacji H3F3A w GCTB oraz efektywności jej detekcji immunohistochemicznej. Ważną obserwacją, zbieżną z piśmiennictwem jest to, że centralne ziarniniaki olbrzymiokomórkowe twarzoczaszki są zmianami molekularnie i klinicznie odmiennymi od GCTB i w kościach twarzoczaszki nie objętych chorobą Pageta występują niezwykle rzadko. W tekście pojawia się informacja o występowaniu mutacji H3F3A w 9/13 przypadków GCTB po leczeniu denosumabem, nie ma jednak danych w jakim odsetku guzy te wykazywały mutację przed leczeniem.

W omówieniu wyników oznaczeń immunohistochemicznych z przeciwciałem anti-histon H3.3 G34W autor podkreśla fakt średniej i silnej ekspresji w jednojądrowej populacji komórek nowotworowych z wysoką medianą komórek wybarwionych (60%). Immunoreaktywność dotyczyła 95% przypadków GCBT i odnotowano wysoką zgodność między oceniającymi badaczami. Kompletny brak reakcji IHC z przeciwciałem anti-histon H3.3 G34W w zmianach non-GCTB świadczy o swoistości i przydatności tego przeciwciała w rutynowej pracy diagnostycznej. Należy jednak uważnie odnosić się do odczynów przeprowadzonych w złym technicznie materiale i pamiętać o możliwości braku reaktywności w przypadkach GCTB z inną substytucją w genie histonu H3F3A. Doktorant dodaje także, że reakcja IHC może być heterogenna w guzach o różnorodnym utkaniu ze zmianami wstecznymi, czy z komponentem torbielowatym lub remodelingiem po leczeniu. Zdaniem recenzenta, w oparciu o przedstawione badania doktorskie i dane z literatury, dodatni odczyn IHC z przeciwciałem anti-histon H3.3 G34W w zmianie olbrzymiokomórkowej kości o typowej lokalizacji jest wystarczającym potwierdzeniem rozpoznania GCTB. Molekularne potwierdzenie mutacji wobec tak swoistego narzędzia IHC winno być zarezerwowane z przyczyn organizacyjnych i kosztowych dla przypadków niejednoznacznych.

Ważne treści zawiera część dyskusji poświęcona analizie odsetka rozbieżności diagnostycznych i zmienionych rozpoznań z innych ośrodków. Autor komentuje trudności patomorfologów z ośrodków nie referencyjnych we współpracy pato-klinicznej w diagnostyce guzów kości – dostarczanie skierowań na badanie patomorfologiczne bez danych z wywiadu klinicznego i opisu radiologicznego zmiany, brak spotkań multidyscyplinarnych. Ponadto rolę odgrywa doświadczenie diagnozujących patomorfologów, jakość nadsyłanego materiału diagnostycznego i niski dostęp do badań dodatkowych w guzach układu kostno-szkieletowego. Kolejnym czynnikiem wpływającym na jakość rozpoznań w zmianach olbrzymiokomórkowych jest brak określonych wiarygodnych kryteriów histopatologicznych złośliwości i agresywności GCTB. Według części autorów, zgodnie z wynikami pracy doktorskiej, pomocne może być oznaczanie indeksu mitotycznego w kontekście całości

obrazu morfologicznego i klinicznego. Reasumując, istnieje zatem bezwzględna konieczność ustawicznej edukacji zarówno ortopedów jak i patomorfologów w zakresie postępowania diagnostycznego guzów kości oraz funkcjonowanie ośrodków doskonałości i referencyjnych.

Badania Doktoranta mają wysoką wartość poznawczą, są jednymi z nielicznych, tak kompleksowymi analizami w grupie guzów olbrzymiokomórkowych. Omówienie wyników pokazuje rozległą wiedzę w obszarze badawczym oraz dojrzałość naukową autora. Dyskusja przeprowadzona została precyzyjnie z właściwym wykorzystaniem piśmiennictwa.

Bibliografia jest właściwie dobrana, zawiera 147 pozycji, głównie z ostatnich lat, jednak obejmuje też znaczące publikacje historyczne. W wykazie prace ujęto w kolejności pojawiania w tekście. Forma zapisu pozycji nie zawsze jest jednolita, np. poz. 147.

Wnioski sformułowano w postaci pięciu punktów korespondujących z celami pracy. Treść wniosków miejscami zawiera elementy wyników. Wniosek mówiący o konieczności włączenia oznaczania statusu *H3F3A* do algorytmu diagnostycznego jest bardzo ważny. Podobnie wniosek dotyczący właściwego opracowania materiału kostnego.

Podsumowując stwierdzam, że całość rozprawy doktorskiej lek. Michała Piotra Wągradzkiego pt. „Ocena przydatności statusu mutacji genu *H3F3A* w diagnostyce guza olbrzymiokomórkowego kości” stanowi współczesne, oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie medycyna, wykazuje wysoką ogólną wiedzę teoretyczną i doświadczenie w pracy specjalistycznej Kandydata oraz Jego wnikliwość i umiejętności prowadzenia różnorodnych metodycznie prac naukowych.

Przedstawiona dysertacja spełnia ustawowe (w Ustawie o stopniach i tytule naukowym) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, mając powyższe na uwadze wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytut Badawczy w Warszawie o dopuszczenie lek. Michała Piotra Wągradzkiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska

spec. patomorfolog, spec. neuropatolog

1308827 / prof. dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska
patomorfolog, neuropatolog
ul. Kryształowa 19, 80-180 Gdańsk