

Katedra Patomorfologii i Medycyny Sądowej, Wydział Lekarski;
Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie.

Kierownik Katedry Patomorfologii i Medycyny Sądowej;
Dr hab.n.med. Konrad Ptaszyński, Profesor UWM

Szczecin dn.24 sierpnia 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Anny Seligi pt.:

„Poszukiwanie nowych, prognostycznych i diagnostycznych markerów molekularnych w diagnostyce niezróżnicowanych nowotworów tkanek miękkich.”

Nowotwory tkanek miękkich i kości stanowią zróżnicowaną grupę chorób a ich rozpoznawanie, odpowiednia klasyfikacja oraz ocena czynników prognostycznych i predykcyjnych należą do najtrudniejszych zadań zespołu diagnostycznego. Badania cytogenetyczne i molekularne nowotworów tkanek miękkich i kości wykazały, w tych nowotworach, proste i złożone aberracje chromosomalne i molekularne. Badania immunohistochemiczne są metodą od lat stosowaną w każdej pracowni patomorfologii. Od kilku lat dostępne są przeciwciała generowane przeciw białkowym produktom genów fuzyjnych powstałych wskutek specyficznych translokacji stwierdzanych w mięsakach. Badania molekularne przy pomocy metody Fluorescencyjnej Hybrydyzacji in situ (FISH) stosowane są tylko w nielicznych ośrodkach jako metoda diagnostyczna z uwagi na relatywnie wysoki koszt zorganizowania pracowni FISH, ale koszt samego badania jest coraz niższy i zlecany coraz częściej. Jeszcze trudniejsze jest zorganizowanie pracowni Sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Istotną trudnością jest również aspekt świadomości, wiedzy i doświadczenia w ośrodkach diagnostycznych, dlatego dobra praktyka to centralizacja ośrodków diagnozujących nowotwory tkanek miękkich i zatrudnienie ekspertów w dziedzinie m.in. patomorfologii, biologii molekularnej.

Cel pracy doktorskiej mgr. Katarzyny Anny Seligi to poszukiwanie nowych prognostycznych i diagnostycznych zmian molekularnych i ocena przydatności metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS) do identyfikacji istotnych markerów w różnicowaniu nowotworów tkanek miękkich. Ponadto postawione przez doktorantkę cele to: wdrożenie schematu diagnostycznego z wykorzystaniem NGS, analiza wyników

sekwencjonowania w kontekście aktualnej klasyfikacji guzów tkanek miękkich u dzieci i dorosłych, wyselekcjonowanie nowych podgrup i podjednostek chorobowych w zakresie nowotworów tkanek miękkich oraz ocena przydatności NGS, w kontekście wdrożenia terapii celowanych w mięsakach.

Oceniana rozprawa doktorska ma poprawny, typowy układ przyjęty dla prac oryginalnych, liczy 172 strony i podzielona jest na 8 rozdziałów. Początek pracy to Streszczenie, *Summary*, Spis skrótów a następnie poszczególne rozdziały 1. Wstęp, 2. Cel Pracy, 3. Materiały i Metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Wnioski, 7. Piśmiennictwo, 8. Suplement zawierający Załącznik nr 1 w postaci tabeli 45 z klasyfikacją WHO mięsaków tkanek miękkich. Następne części dysertacji to kopie certyfikatów jakości GenQA udzielonych laboratorium, Spis tabel, Spis rycin, Spis zdjęć i Spis równań. Brak jest spisu wykresów. Układ pracy jest bardzo przejrzysty co bardzo ułatwia nawigację przez elementy rozprawy. Praca zawiera 45 tabel, 10 rycin, 7 wykresów, 4 zdjęcia w postaci mikrofotografii i 4 równania. Należy zaznaczyć, że dokumentacja w postaci tabel, rycin, wykresów i zdjęć jest bardzo klarowna i niezwykle starannie wykonana.

Wstęp umieszczony na stronach 17-61, został podzielony na osiem części. Początek tego rozdziału zawiera ogólne informacje dotyczące mięsaków tkanek miękkich i kości. Pierwsze części wstępu omawiają epidemiologię tych nowotworów u dzieci i dorosłych, w Polsce i na świecie, etiologię i podział mięsaków tkanek miękkich. Następne części przedstawiają aspekty kliniczne wraz z leczeniem. Kolejno doktorantka wspomniała o technikach biopsji w celu uzyskania materiału do badań morfologicznych, diagnostycznych, prognostycznych, predykcyjnych i molekularnych a także zamieściła tabelę oceny histologicznego stopnia złośliwości mięsaków, tabelę stopnia ich zróżnicowania oraz tabelę stopnia zaawansowania według 8 wydania klasyfikacji TNM.

W dwóch ostatnich częściach wstępu doktorantka omówiła mechanizmy zmian molekularnych: translokacji, mutacji, delecji i insercji w nowotworach tkanek miękkich. Załączona została rozbudowana, wyczerpująca tabela przedstawiająca liczne aberracje cytogenetyczne oraz geny fuzyjne stwierdzane w tych nowotworach. Następnie przedstawione zostały techniki biologii molekularnej stosowane w diagnostyce nowotworów tkanek miękkich. Ponadto, szczegółowo zostały omówione wybrane mięsaki:

niezróżnicowany mięsak pleomorficzny; *Undifferentiated pleomorphic sarcoma* (UPS), śluzakowłókniamięsak; *Myxofibrosarcoma* (MFS), mięśniakomięsak gładkokomórkowy; *Leiomyosarcoma* (LMS), złośliwy guz wywodzący się z osłonek nerwowych; *Malignant peripheral nerve sheath tumor* (MPNST), mięsak Ewinga; *Ewing sarcoma* (ES) i niezróżnicowany mięsak okrągłokomórkowy, *Undifferentiated round cell sarcoma* (URCS). Doktorantka dokładnie opisała cechy kliniczne, leczenie, cechy histologiczne i immunofenotyp tych mięsaków a następnie omówiła zmiany molekularno-genetyczne stwierdzane w omawianych mięsakach i udział molekularnych badań wykazujących te zmiany w diagnostyce i reklasyfikacji mięsaków.

Na koniec umieszczona została tabela z krótką charakterystyką histologiczną i immunohistochemiczną grupy przykładowych mięsaków i nisko zróżnicowanego raka, który musi być uwzględniany w diagnostyce różnicowej przedstawionych mięsaków. Krótko, ale bardzo trafnie opisane zostały zmiany klasyfikacji guzów drobnookrągłokomórkowych w wyniku systematycznie opisywanych nowych fuzji genowych. Informacje zawarte w tej części opierają się na aktualnych danych bibliograficznych.

We wstępie stwierdziłem niewielką liczbę niekonsekwencji nomenklatury w zakresie epidemiologii i klasyfikacji nowotworów.

Materiał do badań stanowiła tkanka nowotworowa, utrwalona w formalinie i zatopiona w blokach parafinowych pochodząca od 350 pacjentów, którzy wyrazili zgodę na badanie genetyczne. Projekt badania został zaaprobowany przez Komisję Bioetyczną Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Materiał badawczy podzielono na dwie grupy. Pierwsza grupa licząca 237 pacjentów badana była w kontekście weryfikacji wstępnego rozpoznania, druga zaś, licząca 113 pacjentów ze względu na znalezienie punktu molekularnego uchwytu leczenia celowanego. W dalszej części dokładnie została opisana metodologia zabezpieczenia materiału tkankowego a także podzielono materiał ze względu na wiek i płeć pacjentów a także ze względu na pochodzenie z ośrodków diagnostyczno-leczniczych. Na koniec wyszczególnione zostały odczynniki i zestawy użyte do pracy.

Metody zawierają dokładny opis procedur laboratoryjnych izolacji RNA, przygotowania bibliotek i sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z wykorzystaniem zestawów firmy

Archer z różnym zakresem badanych genów. Zakres paneli został klarownie podany w tabelach od 9 do 11. Bioinformatyczna analiza została przeprowadzana przy użyciu oprogramowania Archer Analysis. W części przypadków zdecydowano o użyciu metody Fluorescencyjnej Hybrydyzacji In Situ (FISH). Szczegółowy opis tej procedury wraz z przykładowymi fotografiami został zawarty w tej części pracy. Na koniec opisano użyte metody statystyczne.

Wyniki wykonanych badań przedstawiono na stronach 91-128. W części tej umieszczono liczne, przemyślane i starannie wykonane tabele, ryciny i wykresy. Graficznie przedstawiono zaproponowany algorytm postępowania diagnostycznego z udziałem histopatologii, immunohistochemii, FISH i NGS.

W pierwszej grupie pacjentów zastosowano panel diagnostyczny *FusionPlex Sarcoma* i *Expanded Sarcoma*. Do celów badawczych podzielono pacjentów ze względu na wiek tworząc przedziały wiekowe, a histopatologię mięsaków na typy morfologiczne: wrzecionowatokomórkowy, okrągło i owoidnokomórkowy, pleomorficzny, myksoidny i mieszany. Przypisano możliwe obrazy morfologiczne do różnych wariantów fuzyjnych genów używając paneli diagnostycznych i przedstawiono te informacje tabelarycznie, łącznie z pierwotnym jak i zmienionym rozpoznaniem mięsaka wg klasyfikacji WHO. Następnie przeprowadzono badania statystyczne zależności typu morfologicznego od zmiany lub potwierdzenia rozpoznania, analizę zgodności FISH i NGS. W 33% przypadków wyniki te były niezgodne. W 6 przypadkach (2.5%) spośród 237 badanych, oprócz zmiany rozpoznania w wyniku identyfikacji wariantu genetycznego, możliwa była kwalifikacji do leczenia celowanego (przy pomocy tylko paneli diagnostycznych Tabela 32). Następnie badano zależności związane z oceną jakości materiału genetycznego.

Zależności aberracji genów powodujących transformację nowotworową (driver genes) z obrazem morfologicznym mięsaka przedstawiono w elegancki sposób graficznie przy pomocy zestawu wykresów kołowych. Informacja i jej prezentacja pozwalają na wnioskowanie co do potencjalnej aberracji molekularnej podczas obserwacji obrazu morfologiczny mięsaka pod mikroskopem. W grupie badanej zebrano 70 przypadków mięsaków niezróżnicowanych. Badanie NGS pozwoliło jedynie na sklasyfikowanie 23% przypadków takich mięsaków. Przedstawiono te informacje w tabeli 38.

Druga grupa pacjentów to badanie NGS przy pomocy panelu terapeutycznego *FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung* (Panel CTL). Zidentyfikowano warianty fuzyjne

pozwalające na wdrożenie leczenia celowanego tylko w 4.4% chorych. Dane te w jasny sposób przedstawiono w tabeli 41 a rycina 9 ilustruje zidentyfikowane fuzje genowe.

Trzecia grupa – to grupa pilotażowa badana panelem *Expanded Sarcoma*. Dzięki temu badaniu nie tylko można było ustalić ostateczne rozpoznania, ale również wyodrębnić nowe jednostki na podstawie identyfikacji nowych rearanżacji genetycznych.

W części tej stwierdzam nieliczne niekonsekwencje dotyczące nazewnictwa i klasyfikacji nowotworów.

Dyskusja przedstawionej do oceny rozprawy zawarta jest na stronach 129 – 148 i składa się ze wstępu i 8 rozdziałów. Tekst dyskusji rzeczowo omawia uzyskane przez doktorantkę wyniki i porównuje je z danymi z piśmiennictwa.

Pierwsza część to omówienie istotnego zagadnienia, szczególnie z punktu widzenia patomorfologa zajmującego się diagnozowaniem nowotworów tkanek miękkich i kości. Jest to opracowanie i opis wdrożenia schematu diagnostycznego z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Rycina 5 przedstawia klarowny schemat postępowania diagnostycznego z zastosowaniem NGS. Opracowany schemat zakłada ustalenie ostatecznego lub wstępnego rozpoznania i klasyfikację nowotworu na podstawie badania histopatologicznego wraz badaniem immunohistochemicznym a następnie ewentualny wybór badania FISH i/lub NGS. W praktyce wiadomo, że w części nowotworów tkanek miękkich panel IHC jest na tyle wiarygodny, że dalsze badania molekularne do celów diagnostycznych nie są konieczne. W przypadkach innych nowotworów konieczne jest wsparcie w postaci badania FISH. Ostatnio rekomendowane jest (ESMO 2018, CAP), że w przypadkach nowotworów niezróżnicowanych i takich, gdzie diagnostyka rutynowa jest trudna, wskazane jest zastosowanie badania NGS. Bywa, że już obraz morfologiczny sugeruje zastosowanie takiej procedury. Podobne schematy proponowane były przez innych autorów.

Bardzo cenne uwagi zostały ujęte w części 3 dyskusji, w którym doktorantka omówiła i porównała praktyczne aspekty FISH i NGS w zakresie przygotowania materiału, techniki a także czułości metody, podając również przykłady wstępnych, fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich badań FISH, które przyczyniły się do błędnych rozpoznań i niewłaściwego leczenia. W piątej części znajduje się omówienie problemu diagnostyki nowotworów drobnookrągło komórkowych oraz nowotworów z rearanżacją genu *EWSR1*.

Wśród diskutowanych wyników należy wspomnieć również o nieznanych, do czasu badania przez doktorantkę, fuzjach genowych, które przypisano do niecharakterystycznego obrazu histologicznego kilku badanych nowotworów.

W części siódmej dyskusji opisano próby znalezienia markerów terapeutycznych przy pomocy panelu terapeutycznego NGS. Stwierdzono jedynie 3% chorych z dodatnimi markerami, głównie w postaci translokacji z udziałem *ALK* w IMT i LMS a także jeszcze rzadziej z udziałem *NTRK* w mięsaku nieodróżnicowanym i *intimal sarcoma*. Dane literaturowe z jednej strony wskazują na rzadko występujące przypadki dodatnich markerów terapeutycznych a z drugiej strony obiecujące dane dotyczące pacjentów, którym wdrożono leczenie celowane. Doktorantka omówiła ograniczenia niniejszego badania w części ósmej dyskusji. Brak jednorodnej grupy poddanej badaniu to pierwszy, istotny problem. Różne grupy pacjentów badane były różnymi panelami NGS. Ponadto, znacznej liczby przypadków mięsaków nieodróżnicowanych nie udało się sklasyfikować przy pomocy dostępnych metod i paneli NGS.

Wnioski w pełni odnoszą się do założeń przedstawionych w Celach pracy.

Piśmiennictwo zawiera 149 pozycji w większości z lat 2017-2021. Wszystkie pozycje piśmiennictwa znajduje się w bazach danych publikacji naukowych.

Streszczenie właściwie prezentuje najważniejsze zagadnienia poruszane w rozprawie.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedmiot podjętych badań, dobór materiału i metod, prezentacja wyników, rzeczowość dyskusji oraz przedstawione wnioski odpowiadają kryteriom stawianym pracom doktorskim.

W związku z powyżej przedstawioną oceną stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Katarzyny Anny Seligi do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie rozprawy.