



Leuven
8-12-2024

contact

Prof. dr hab.med. Maria

Dębiec-Rychter

Professor emeritus

e-mail maria.debiec-
rychter@kuleuven.be

mobile:

+48 538 407 428

campus Gasthuisberg
Herestraat 49 Bus 602
B - 3000 Leuven,
Belgium

tel. +32 16 34 72 18

fax +32 16 34 62 10

Ocena rozprawy doktorskiej

**mgr Agnieszki Zajac pt. „Opracowanie systemu immunologiczno-
molekularnego profilowania chrzęstniakomięsaków.”**

Przedstawiona do oceny praca pod w/w tytułem dotyczy badania chrzęstniakomięsaków (*ChS, ang. Chondrosarcoma*), pierwotnych złośliwych nowotworów kości, obejmujących heterogenną grupę o wielu podtypach histologicznych ze zróżnicowaną patomorfologią i rokowaniem. Leczenie pacjentów z rozpoznaniem ChS ogranicza się głównie do resekcji chirurgicznej, a inne opcje terapeutyczne są nieskuteczne ze względu na oporność tych nowotworów na klasyczną chemioterapię i radioterapię. Równocześnie, zarówno ich charakterystyka molekularna, jak i ich profil immunologiczny oraz mikrośrodowisko są nadal bardzo słabo poznane. Celem pracy było opracowanie sposobu prognostycznej klasyfikacji ChS w oparciu o ocenę czynników patohistologicznych, immunologicznych, oraz profilu genetycznego i transkrypcyjnego guza w korelacji ze wskaźnikami przeżycia całkowitego (*OS, ang. Overall Survival*) pacjentów i ich czasu przeżycia wolnego od progresji (*PFS, ang. Progression Free Survival*) choroby. Tematyka pracy jest ważna i nowatorska, a poznanie podłoża molekularnego i profilu immunologicznego choroby nowotworowej może wpłynąć na zastosowanie kierunkowej i spersonalizowanej terapii farmakologicznej i immunoterapii, zmieniającej całkowicie losy pacjentów w kierunku pełnego wyleczenia. Cała ta dziedzina uprawiana jest na świecie tylko w ośrodkach o bardzo wysokiej kompetencji w zakresie patologii i genetyki molekularnej. Doktorantka godnie reprezentuje swoją Instytucję i przedstawia znakomitą rozprawę doktorską na bardzo wysokim poziomie.

Układ pracy jest charakterystyczny dla prac badawczych i składa się z kolejnych rozdziałów obejmujących wstęp, założenia, cele i

metodykę badań, omówienie uzyskanych wyników, i wnioski. Zasadniczy tekst pracy obejmuje 187 stron, w tym 10 tabel i 52 ryciny. Ostatnie strony zajmuje bogate i aktualne piśmiennictwo obejmujące 290 pozycji literatury, przeważnie anglojęzycznej.

Do przeprowadzonych badań wykorzystano materiał pochodzący od 147 pacjentów, z rozpoznaniem chrzestniakomięsaka, leczonych radykalnie przez zabieg chirurgiczny w Klinice Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie (108 pacjentów), a także w ośrodkach zagranicznych – Istituto Ortopedico Rizzoli (Bologna, Włochy) oraz Centre Léon Bérard, (Lyon, Francja) (39 pacjentów). Materiał do badań pochodził z bloczków parafinowych.

Część metodyczna przedstawia metody immunologiczne, molekularne i biostatystyczne zastosowane w pracy:

- Do analiz immunologicznych włączono 131 guzów o różnych stopniach złośliwości histologicznej, wykorzystując barwienia immunohistochemiczne dla 20 markerów i z wykorzystaniem mikromacierzy tkankowych. Oceny nacieków komórek odpornościowych dokonano w centralnym i obwodowym regionie guza. Dodatkowo na podgrupie 53 pacjentów oceniono ekspresję genów związanych z mikrośrodowiskiem guza przy pomocy reakcji qPCR z wykorzystaniem komercyjnego panelu 84 genów (Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array).
- W celu analizy profilu molekularnego i obciążenia mutacyjnego guza (TMB) przeprowadzono sekwencjonowanie następnej generacji z wykorzystaniem celowanego panelu 409 genów (Oncomine™ Tumor Mutation Load Assay) na grupie 105 pacjentów. Dodatkowo oceniono niestabilność mikrosatelitarną (MSI, ang. *microsatellite instability*) z użyciem Idylla™ MSI Test-u w 108 guzach.
- Wieloczynnikową analizę biostatystyczną oceniającą wpływ czynników patohistologicznych i immunologiczno-molekularnych na przeżycia OS i PFS pacjentów przeprowadzono przy wykorzystaniu wieloparametrycznego modelu Coxa penalizowanego LASSO.

W kolejnej części pracy szczegółowo omówiono wyniki przeprowadzonych badań.

Na podstawie analiz immunologicznych i badania ekspresji genów wytypowano trzy różne immunofenotypy ChS, różniące się statystycznie znacząco ekspresją genów zaangażowanych w różne procesy immunologiczne oraz liczbą nacieków komórek immunologicznie kompetentnych w centralnym regionie guza, a zależnych od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu.

Analiza molekularna wykazała niskie obciążenia mutacyjnego guza (mediana TMB wyniosła 2,35 mut/Mb) i w żadnej z badanych próbek nie wykryto niestabilności mikrosatelitarnej. Najczęściej występujące mutacje (> 10% pacjentów) dotyczyły genów *IDH1/2*, *TP53*, *TAF1* i *RNF213*. Obecność mutacji w genach *IDH1/2* lub *TP53*, jak również obecność bardziej złożonych zmian molekularnych była związana z ChS o wyższym stopniu złośliwości histologicznej.

W analizie statystycznej wieloczynnikowej podtyp histologiczny, wielkość guza, obecność immunofenotypu z większą liczbą nacieków immunologicznych w centralnym regionie guza oraz obecność mutacji w genie *IDH1* były niezależnymi, negatywnymi czynnikami prognostycznymi. Są to niepodważalnie oryginalne obserwacje dokonane przy pomocy bardzo starannie dobranych i kompetentnie wykonanych metod immuno-molekularnych.

W dyskusji Kandydatka szczegółowo przeanalizowała i z dużą erudycją przedyskutowała wyniki badań własnych na tle danych literaturowych. Nie mam uwag merytorycznych do żadnej części lub fragmentu rozprawy.

Posumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska Kandydatki stanowi istotny wkład do badań nad patogenezą chrzęstniakomięsaków. Przeprowadzone analizy wykazały wyraźny stopień pato-histologicznego, immunologicznego i genomowego zróżnicowania, ujawniając obecność nowych, istotnych biomarkerów w tej grupie nowotworów, mających duże znaczenie prognostyczne. Przedstawione wyniki sugerują, że skojarzenie immunoterapii z inhibitorami genu *IDH1*

może przynieść potencjalne korzyści kliniczne w wybranej grupie pacjentów.

Stwierdzam więc, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Zając pt. „Opracowanie systemu immunologiczno-molekularnego profilowania chrzęstniakomięsaków” w pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorski charakter badań i perfekcję ich wykonania wnoszę również o nadanie stopnia doktora z wyróżnieniem.



Prof. dr hab. med. Maria Dębiec-Rychter

Professor emeritus

Center for Human Genetics, University of Leuven

Herestraat 49

B-3000 Leuven

Belgium

Phone: +32-16-347218

Fax: +32-16-346210

e-mail: maria.debiec-rychter@kuleuven.be