



UNIwersytet Medyczny w Lublinie
Zakład Genetyki Klinicznej ul. Radziwiłłowska 11, 20-080
Lublin; tel./fax. 81 448 61 10; E-mail: janusz.kocki@umlub.pl
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki

Lublin, dnia 24. 10. 2024 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**pt. „Zastosowanie wybranych metod diagnostyki molekularnej
w optymalizacji postępowania onkologicznego”**

lek. Tadeusza Kałużewskiego

z Zakładu Genetyki „Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi

W odpowiedzi na prośbę Pana prof. dr hab. n. med. Andrzeja Lewińskiego, Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi, przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej lek. Tadeusza Kałużewskiego, ubiegającego się o stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora: Pani dr hab. n. med. Agnieszki Gach, prof. Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi.

Rozprawę doktorską stanowi monotematyczny cykl trzech publikacji opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych z listy *JCR*:

Publikacja 1: Kałużewski, T., Przybylski, G. K., Bednarek, M., Glazar, S., Grabiec, M., Jędrzejczyk, A., Kępczyński, Ł., Kubiak, I., Kucharska, D., Morel, A., Owczarek, M., Rożniecki, M., Sałamunia, J., Szewczyk, D., Szwalski, J., & Kałużewski, B. (2021). The Usefulness of Cell-Based and Liquid-Based Urine Tests in Clarifying the Diagnosis and Monitoring the Course of Urothelial Carcinoma. Identification of Novel, Potentially Actionable, RB1 and ERBB2 Somatic Mutations. *Journal of personalized medicine*, 11(5), 362. <https://doi.org/10.3390/jpm11050362>. (IF = 3.508, MNiSW = 70)

Indywidualny wkład Doktoranta (70%): autor korespondencyjny odpowiedzialny za zaplanowanie i koncepcję pracy, udział w pozyskaniu środków na badanie, przeprowadzenie analizy bioinformatycznej, przygotowanie rycin oraz napisanie finalnej wersji manuskryptu.

Publikacja 2: Kałużewski T, Kubiak I, Kępczyński Ł, Jedrzejczyk A, Roźniecki M, Gach A, Kałużewski B. Mutacje promotora genu *TERT* jako markery molekularne stanów przednowotworowych raka pęcherza moczowego. Przegląd literatury oraz opis przypadku. W W. Krupski (red.), *Medycyna spersonalizowana 2022* : monografia (s. 33–38). (MNiSW = 20)

Indywidualny wkład Doktoranta (80%): autor korespondencyjny odpowiedzialny za koncepcję pracy, przegląd literatury oraz napisanie finalnej wersji manuskryptu.

Publikacja 3: Kałużewski, T., Kubiak, I., Bednarek, M., Sałamunia, J., Kucharska, D., Kępczyński, Ł., Stempień, M., Kubicki, T., Trzeciński, R., Gordon-Sönmez, Z., Bartosińska-Dyc, A., Gach, A., & Kałużewski, B. (2023). Report on the Effect of the Implementation of an Early Detection and Prevention of Cancer Program on Families at High Hereditary Risk-Concentrating on Patients Undergoing Genetic Diagnostics and Counseling in Central Poland. *International journal of molecular sciences*, 24(17), 13178. <https://doi.org/10.3390/ijms241713178>. (IF = 4.9, MNiSW = 140)

Indywidualny wkład Doktoranta (70%): autor korespondencyjny odpowiedzialny za zaplanowanie i koncepcję pracy, zgromadzenie danych klinicznych, interpretację wyników oraz napisanie finalnej wersji manuskryptu.

Dwie pierwsze publikacje zostały wykonane dzięki wsparciu środków europejskich w ramach RPO Województwa Łódzkiego na lata 2014-2020 (nr RPLD.01.02.01-10-0018/19 i RPLD 01.02.02- 10-0130/19).

Doktorant w ww. trzech publikacjach cyklu jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym. Łączny IF ww. trzech publikacji to 8,408 (230 punktów MNiSW).

Cykl publikacji spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zmianami - obowiązujące w postępowaniu o nadanie stopnia doktora.

Rozprawa doktorska jest napisana poprawnie w języku polskim i jest przedstawiona w formie wydruku komputerowego. Rozprawa liczy 83 strony, jest podzielona na następujące rozdziały - typowe dla tego rodzaju opracowań: *Wykaz stosowanych skrótów* str. 5-6, *Wykaz publikacji* str. 7-8, *Streszczenie w języku polskim* str. 9, *Streszczenie w języku angielskim* str. 10, *Wstęp* 11-17, *Omówienie publikacji 1* str. 18-24, *Omówienie publikacji 2* str. 25-26

Omówienie publikacji 3 str. 27-31, *Wnioski z cyklu publikacji* str. 32, *Podsumowanie* str. 33-35, *Kopie publikacji* str. 36-69, *Zgoda komisji bioetycznej* str. 70, *Piśmiennictwo* str. 71-83

Wysoko oceniam wybór tematu rozprawy doktorskiej. Podjęty temat rozprawy doktorskiej jest bardzo ważny klinicznie. Współczesna diagnostyka nowotworów złośliwych to wieloetapowy, bardzo złożony proces, angażujący wielodyscyplinarny zespół specjalistów. Badania genetyczne, zwłaszcza molekularne, ogrywają znaczącą rolę w tym procesie. Rozwój technik genetycznych w ostatnich latach, szczególnie technik wysokoprzepustowych, umożliwił jednoczesne sekwencjonowanie genomu i eksomu z różnego materiału klinicznego: zarówno komórkowego i wolnokrążącego DNA. W ostatnich latach obserwujemy znaczny wzrost badań nad patogenezą nowotworów, co zaowocowało odkryciem nowych mechanizmów genetycznych, takich jak interferencja RNA (Fire i Mello, nagroda Nobla w 2006 r.) czy odkrycie mikroRNA i jego roli w potranskrypcyjnej regulacji genów (Ambros i Ravkun, nagroda Nobla w bieżącym roku). Nowo odkryte kroki milowe współczesnej genetyki klinicznej są bardzo szybko wprowadzane do diagnostyki genetycznej nowotworów i coraz częściej pojawiają się w aktualizacjach wytycznych i nowych rekomendacjach postępowania diagnostycznego. Celem tych działań są wdrożenia badań klinicznych w tym obszarze, uwzględniające udział czynników genetycznych w patogenezie nowotworów, rokowaniu i wyborze najlepszej terapii celowanej. Pomimo tych działań, nadal istnieje wiele pytań bez odpowiedzi i sprzecznych ustaleń wymagających wyjaśnienia. Stąd podjęcie przez Doktoranta tematu optymalizacji postępowania diagnostycznego w obszarze wykorzystania metod diagnostyki molekularnej uważam za bardzo trafny i ważny dla współczesnej onkologii.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej zastosowanie badań genetycznych stanowi przykład skutecznego wykorzystania ich jako narzędzi diagnostycznych w onkologii, umożliwiających precyzyjne rozpoznawanie i molekularną klasyfikację nowotworów oraz identyfikację zespołów predyspozycji dziedzicznych.

Wstęp stanowi zbiór współczesnych informacji na temat znaczenia testów genetycznych w opiece onkologicznej, zastosowania badań molekularnych w badaniach przesiewowych m. in. w raku jelita grubego, raku prostaty czy raku pęcherza moczowego, zastosowania badań molekularnych w diagnostyce nowotworów złośliwych oraz zastosowania badań molekularnych w diagnostyce predyspozycji dziedzicznych.

Poniżej przedstawiam najważniejsze osiągnięcia poszczególnych publikacji stanowiących zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

W publikacji nr 1 (kazuistycznej) zostały postawione trzy cele pracy: ocena przydatności sekwencjonowania genomu komórek osadu moczu metodą NGS w diagnostyce raka pęcherza moczowego, opracowanie procedury określania charakteru somatycznego lub germinального wykrytych wariantów z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych oraz ocena wiarygodności testu metylacji *Bladder EpiCheck* w monitorowaniu raka pęcherza moczowego.

W pracy zastosowano kilka precyzyjnych i trudnych technicznie współczesnych technik badawczych: sekwencjonowanie całogenomowego, cytologię osadu moczu, immunocytochemiczną oceną ekspresji białka p53 oraz fluorescencyjną hybrydyzacją *in situ* (FISH).

Na uwagę zasługuje własna wizualizacja stwierdzonych wariantów strukturalnych w postaci dwóch okręgów: zewnętrznego ideogramu chromosomów i wewnętrznego ilustrującego różnicę w pokryciu między próbkami krwi pacjenta a próbkami moczu. Oznaczono stopnie amplifikacji zmiennym natężeniem kolorów oraz zmiany liczby kopii (str. 22). W podobny sposób przedstawiono SNV (str. 23). Wizualizacje przedstawione przez Doktoranta stanowią z jednej strony pełną prezentację otrzymanych wyników badań wysokoprzepustowych a z drugiej strony doskonale pokazują zależności w bardzo przystępny sposób.

Na podkreślenie zasługują wysokiej jakości zdjęcia mikroskopowe osadu moczu oraz skrawków histopatologicznych – kolorowe zdjęcia są wysokiej jakości i bardzo dobrze ilustrują wyniki przeprowadzonych badań.

Doktorant wykazał się dużą „intuicją” diagnostyczną, proponując zastosowanie testu metylacji *Bladder EpiCheck*, na etapie rozpoznania i monitorowania raka pęcherza moczowego – rok po ukazaniu się tej publikacji, test *Bladder EpiCheck* został włączony w wytyczne postępowania z pacjentami z nienaciekającymi mięśniówkami rakami pęcherza moczowego Europejskiego Towarzystwa Urologicznego.

W publikacji nr 2 (poglądowej) przeprowadzono przegląd piśmiennictwa na temat wykrywalności wariantów promotora genu *TERT* w próbkach osadu moczu pacjentów z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego oraz ocena skuteczności sekwencjonowania

całogenomowego w wykrywaniu wariantów promotora genu *TERT* w próbce DNA uzyskanej z osadu moczu.

Artykuł stanowi przegląd wiedzy na temat potencjalnej roli wariantów promotora genu *TERT* jako markerów molekularnych w diagnostyce przesiewowej raka pęcherza moczowego. Ponadto w ramach publikacji przeprowadzono analizę retrospektywną danych uzyskanych w pierwszej publikacji niniejszego cyklu oraz przedstawiono wyniki w formie opisu przypadku.

Doktorant podaje pod rozagę możliwość zastosowania testu oznaczenia mutacji promotora genu *TERT* na początku procesu diagnostycznego, szczególnie w przypadkach raka pęcherza moczowego *in situ*. Wniosek ten jest bardzo ważny w związku z niską czułością badania cystoskopowego w przypadku rozpoznania *carcinoma in situ*.

W publikacji nr 3 (oryginalnej) dokonano analizy wyników badań molekularnych wykonanych w ramach programów profilaktycznych Narodowego Programu Zwalczenia Chorób Nowotworowych: Moduł I – wczesne wykrywanie nowotworów złośliwych w rodzinach wysokiego, dziedzicznie uwarunkowanego ryzyka zachorowania na raka piersi i raka jajnika oraz Moduł II – wczesne wykrywanie i prewencja nowotworów złośliwych w rodzinach wysokiego, dziedzicznie uwarunkowanego ryzyka zachorowania na raka jelita grubego i błony śluzowej trzonu macicy.

Prezentowano następujące cele badawcze:

1. Określenie częstości występowania patogennych wariantów założycielskich w genach *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* i *PALB2* badanych testami celowanymi u pacjentek i pacjentów zakwalifikowanych do Programu.
2. Oceny przydatności klinicznej panelu genów badanych metodą NGS u pacjentek i pacjentów zakwalifikowanych do Modułu I z negatywnymi wynikami badań celowanych.
3. Ocena przydatności klinicznej panelu genów badanych metodą NGS w diagnostyce rodzinnych predyspozycji do nowotworów złośliwych układu pokarmowego oraz raków endometrium.
4. Ocena częstości występowania delecji i duplikacji w grupie osób z podejrzeniem zespołów dziedzicznej predyspozycji do nowotworów, których badanie nie było przewidziane w Programie

Niezależnie od grupy ryzyka do testów molekularnych zakwalifikowano 953 osoby w Module I i 144 pacjentki w Module II (łącznie 1097 pacjentów).

Metodyka obejmowała wykonanie testów przesiewowych w kierunku najczęściej występujących w populacji polskiej wariantów genów *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* i *PALB2*. Badanie wariantów w genach *BRCA1* i *BRCA2* przeprowadzono przy użyciu panelu *Oncogenetics BRCA R-27/P-48FRT* opartego na reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR). Do badania najczęstszych wariantów w genach *CHEK2* i *PALB2* zastosowano tradycyjną technikę sekwencjonowania metodą Sanger. W pracy wykorzystano również sekwencjonowanie genów *BRCA1* i *BRCA2* wg technologii NGS i analizę dużych delecji i duplikacji w genach *BRCA1* i *BRCA2*, przy użyciu metody MLPA z zestawami *SALSA MLPA Probemix P002-D1-0918* i *SALSA MLPA Probemix P045 D1-0519*.

W publikacji scharakteryzowano częstość występowania mutacji dziedzicznych w raku piersi, jajników, jelita grubego i endometrium, podkreślono znaczenie badań molekularnych i konsultacji genetycznych w odniesieniu do tych nowotworów złośliwych.

Warto podkreślić, że badanie przeprowadzono na reprezentatywnej dużej grupie 1097 osób. Zidentyfikowano znaczny odsetek nosicieli mutacji patogennych, co podkreśla korzyści z badań przesiewowych, szczególnie w przypadku mutacji założycielskich *BRCA1*. Podkreślono, że uproszczone kryteria kwalifikacyjne tego programu umożliwiają specjalistom z różnych dziedzin inicjowanie badań genetycznych, co zwiększyło dostępność diagnostyki. Z drugiej strony, kierowanie pacjentów przez różnych specjalistów utrudniało spójność przepływu prac diagnostycznych i powodowało umieszczanie konsultacji genetycznych na różnych etapach procesu terapeutycznego. W konkluzji stwierdzono, że rozszerzenie zakresu diagnostycznego ujawniło wiele mutacji, które mogły zostać pominięte zgodnie z kryteriami stosowanego programu – wskazano na zmianę założeń Programu. Wyzwania w interpretacji danych o dużej przepustowości podkreślają potrzebę wysoko wykwalifikowanego doradztwa genetycznego.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorant na str. 32 przedstawił interesujące wnioski, opracowane na podstawie uzyskanych wyników w cyklu trzech publikacji – uważam, że są ważnym głosem w dyskusji na temat zastosowanych wybranych metod diagnostyki molekularnej w optymalizacji postępowania onkologicznego.

Stwierdzam, że wszystkie założenia badań zostały w pełni wykonane.

Doktorant przedstawił spis 108 wykorzystanych pozycji piśmiennictwa, które są dobrze dobrane w kontekście tematyki pracy.

W podsumowaniu podkreślam, że Doktorant zrealizował badania zgodnie z wytyczonymi celami, z zastosowaniem właściwych metod badawczych a uzyskane wyniki poprawnie zinterpretował na podstawie wykonanych analiz i danych literaturowych.

Przedstawione przez Doktoranta wyniki badań są znaczącym wkładem w rozwój reprezentowanej dyscypliny naukowej. Jest zrozumiałe, że wykonanie badań interdyscyplinarnych przedstawionych w cyklu trzech publikacji, wymagało pracy w zespole i udziału wielu osób, co podkreśla dojrzałość naukową Doktoranta.

Rozprawa jest znaczącym osiągnięciem Doktoranta i Promatora. Spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w stosownej *Ustawie* - cykl publikacji spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20.07.2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zmianami - obowiązujące w postępowaniu o nadanie stopnia doktora. Została przygotowywana pod opieką promotora i stanowi oryginalne rozwiązanie przez Autora problemu naukowego. Doktorant wykazał się dużą, ogólną wiedzę teoretyczną w określonej dyscyplinie naukowej oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, staranność i dbałość w przygotowaniu manuskryptu rozprawy oraz potencjalne znaczenie dla przyszłych praktycznych aplikacji klinicznych, rozprawę oceniam pozytywnie i bardzo wysoko.

Stwierdzam, że projekt rozprawy doktorskiej został właściwie zaplanowany a właściwy dobór metod badawczych pozwolił na właściwą realizację założeń pracy. Świadczy też o bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia badań naukowych na odpowiednio wysokim poziomie.

Biorąc pod uwagę powyższe podsumowanie, zgłaszam również wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. Tadeusza Kałużewskiego.



Prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki