



Dr hab. n. med. Agata Pastorczak  
Zakład Genetycznej Predyspozycji do Chorób Nowotworowych  
I Katedra Pediatrii UM w Łodzi  
ul. Czechosłowacka 4b  
92-216 Łódź

Łódź, 6.01.2025 r.

## Ocena

Rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych  
i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne lekarza Tadeusza Kałużewskiego

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

Rozwój nowotworu jest uwarunkowany somatycznymi defektami genomu, którym może towarzyszyć nosicielstwo predysponujących do nowotworzenia patogennych aberracji germinalnych. Zarówno obecność mutacji specyficznych protoonkogenów, genów supresorowych, jak i współistniejących zmian konstytucyjnych wpływa na dynamikę przebiegu choroby nowotworowej i jej odpowiedź na leczenie. Z tego powodu, ciągłe doskonalenie metod leczenia chorób onkologicznych musi uwzględniać obecność w tkance guza istotnych klinicznie zaburzeń molekularnych. Ułatwieniem w realizacji tego zadania jest szeroki dostęp do całogenomowych, wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania genów, które umożliwiają szybką i czułą identyfikację zarówno aberracji somatycznych jak i konstytucyjnych. Jednak z uwagi, iż metody te dostarczają wyników w postaci dużych zbiorów danych o wariatach wykrywanych w tkance guza oraz zmianach germinalnych, prawdziwym wyzwaniem staje się właściwa interpretacja wykrywanych aberracji i ocena ich klinicznego znaczenia, a także przeprowadzenie poradnictwa genetycznego w rodzinach nosicieli defektu. W tym świetle, badanie przydatności zastosowania poszczególnych metod diagnostyki genetycznej w optymalizacji postępowania onkologicznego oraz w wykrywaniu dziedzicznych predyspozycji do nowotworzenia, jest istotna oraz interesująca z naukowego i klinicznego punktu widzenia. I właśnie badaniu takiej zależności poświęcona jest niniejsza rozprawa doktorska.

Rada Naukowa Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi powierzyła mi rolę recenzentki rozprawy doktorskiej lekarza, Pana Tadeusza Kałużewskiego.

Rozprawę Pana Tadeusza Kałużewskiego otrzymałam w postaci cyklu trzech publikacji dotyczących zastosowania metod molekularnych w diagnostyce onkologicznej u osób dorosłych opatrzonych wstępem oraz podsumowanych postaci dyskusji zamykającej cykl. Dodatkowo, opisano udział Doktoranta w każdej z publikacji.

Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi numer 80/2017.

Dokumentację realizacji założonych celów rozprawy doktorskiej stanowi cykl prac (o łącznym wskaźniku Impact Factor: 8.408 oraz łącznej punktacji MNiSW: 230), na który składały się następujące publikacje:

- Kałużewski, T., Przybylski, G. K., Bednarek, M., Glazar, S., Grabiec, M., Jędrzejczyk, A., Kępczyński, Ł., Kubiak, I., Kucharska, D., Morel, A., Owczarek, M., Roźniecki, M., Sałamunia, J., Szewczyk, D., Szwalowski, 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)
- Kałużewski T, Kubiak I, Kępczyński Ł, Jędrzejczyk 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)
- Kałużewski, T., Kubiak, I., Bednarek, M., Sałamunia, J., Kucharska, D., Kępczyński, Ł., Stempień, M., Kubicki, T., Trzciński, R., Gordon-Sönmez, Z., Bartosińska-Dyc, A. 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* <https://doi.org/10.3390/ijms241713178>. (IF = 4.9, MNiSW = 140)

W cyklu prac, pierwsza i trzecia to publikacje o charakterze oryginalnych doniesień naukowych opublikowane w czasopiśmie anglojęzycznym, druga publikacja to przegląd literatury wraz z opisem przypadku, który został opublikowany w czasopiśmie polskojęzycznym. We wszystkich trzech manuskryptach Doktorant jest pierwszym autorem.

We wstępie Autor przedstawia etapy rozwoju technik molekularnych w kontekście ich klinicznej przydatności w onkologii. Następnie opisuje genetyczne testy przesiewowe mające współcześnie zastosowanie we wczesnym wykrywaniu raka jajnika i raka pęcherza moczowego. Kolejny rozdział jest poświęcony roli metod genetycznych w charakterystyce podtypu biologicznego nowotworu oraz identyfikacji pochodzenia tkankowego w nowotworach o nieznanym punkcie wyjścia. Na koniec doktorant opisuje możliwości nowoczesnego wykrywania dziedzicznej predyspozycji do nowotworzenia na przykładach: raka piersi i raka endometrium. Tak przygotowane wprowadzenie pozwala czytelnikowi zrozumieć założenia i cele rozprawy, które zostały umieszczone na kolejnych stronach pracy.

Grupę badaną stanowił w części poświęconej pogłębionej diagnostyce onkologicznej pojedynczy chory z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego, w części poświęconej badaniom przesiewowym 1097 pacjentów, u których wykonano badania molekularne w ramach programu profilaktycznego Narodowego Programu Zwalczania Chorób Nowotworowych.

Pierwsza z publikacji ma charakter publikacji oryginalnej. W tej pracy Doktorant założył sobie następujące cele: ocenę przydatności sekwencjonowania genomu komórek osadu moczu metodą

sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce raka pęcherza moczowego, opracowanie procedury określania charakteru somatycznego lub germinálního wykrytych wariantów z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych oraz ocenę wiarygodności testu metylacji Bladder EpiCheck w monitorowaniu raka pęcherza moczowego. Dokonując pogłębionej analizy wariantów sekwencji oraz zmian strukturalnych w sparowanych próbkach DNA pochodzącego z komórek guza pęcherza moczowego oraz z mononuklearów krwi pacjenta, doktorant wyodrębnił aberracje promujące proces onkogenezy u testowanego pacjenta oraz określił na ich podstawie najbardziej prawdopodobny podtyp molekularny nowotworu. Ponadto śledząc wyniki testu metylacji w odpowiednich interwałach czasowych od momentu rozpoznania choroby nowotworowej u pacjenta, przedstawił przydatność tej metody diagnostycznej w monitorowaniu remisji u chorego na raka pęcherza moczowego. W opinii recenzenta, powyższa praca była solidnym doświadczeniem edukacyjnym dla doktoranta w zakresie analizy i interpretacji danych genomicznych, wyniki tej analizy wskazują na możliwą przydatność diagnostyczną oraz walor poznawczy badania WGS w raku pęcherza moczowego. Rezultaty tej pracy wspierają tezę, iż spersonalizowane podejście do analizy całogenomowej w chorobach nowotworowych, może dostarczyć informacji będących cennymi wskazówkami terapeutycznymi.

W kolejnej publikacji, Autor przeprowadza bardzo zwięzły przegląd literatury dotyczący znaczenia klinicznego mutacji promotora genu *TERT* w rozrostach wywodzących się z nabłonka pęcherza moczowego. W publikacji doktorant opisuje występowanie poszczególnych typów mutacji promotora genu *TERT* w zależności od stopnia złośliwości nowotworu pęcherza moczowego oraz wskazuje na ich częstą obecność w komórkach osadu moczu w okresie poprzedzającym rozwój guza.

Ostatnia publikacja z cyklu jest podsumowaniem wyników badań molekularnych wykonanych w ramach programów profilaktycznych Narodowego Programu Zwalczenia Chorób Nowotworowych dotyczących wczesnego wykrywania i prewencji nowotworów złośliwych w rodzinach z dziedzicznie uwarunkowanym wysokim ryzykiem raka piersi i jajnika (Moduł I) lub raka jelita grubego i trzonu macicy (Moduł II). W tym szeroko zakrojonym badaniu przeprowadzonym na licznej grupie  $n=1097$  pacjentów, z których do badań molekularnych zakwalifikowano 953 osoby, Doktorant postawił sobie następujące cele: 1. ocena 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. Chociaż przedstawione cele były ambitne, doktorant przedstawił wyniki realizacji każdego z nich w wyselekcjonowanej grupie badanej. Szczególnie ciekawa jest wysoka skuteczność identyfikacji wariantów patogennych metodą badania panelowego NGS sięgająca 18.18% w grupie  $n=55$  chorych z negatywnymi wynikami badań

celowanych w ramach Modułu I. Podobnie wysoką częstość (17.36%) nosicielstwa wariantów patogennych lub prawdopodobnie patogennych obserwowano u n=144 pacjentów zakwalifikowanych do badania panelowego NGS w ramach Modułu II. Wnioski pochodzące z trzeciej publikacji w cyklu przedstawionym do recenzji są bardzo istotne w kontekście poradnictwa genetycznego rodzin z podejrzeniem zespołów dziedzicznej predyspozycji do nowotworów. Po pierwsze, wskazują na wysoką skuteczność zastosowania szerokich paneli NGS w diagnostyce genetycznej predyspozycji do nowotworzenia u osób dorosłych. Po drugie, konfrontują czytelnika z możliwymi trudnościami interpretacyjnymi patogenności identyfikowanych w badaniu NGS wariantów genowych, zwłaszcza jeśli nie są wprost powiązane z fenotypem pacjenta.

Ogólnie, tak pod względem merytorycznej zawartości, poprawności zaplanowania badań, ich przeprowadzenia, jak również pod względem ogólnej formy i organizacji treści cykl prac oceniam pozytywnie.

Chociaż w całości rozprawa nie budzi wątpliwości w zakresie oryginalności tematyki badawczej, zastosowanej metodyki badań czy interpretacji wyników tych badań, pragnę - z obowiązku recenzenta - przedstawić Doktorantowi moje sugestie i pytania:

- We wstępie rozprawy bardzo pomocne byłoby szersze wprowadzenie w ideę testu metylacyjnego Bladder EpiCheck. Wprowadź na stronie 20 rozprawy doktorant opisuje praktyczną stronę dotyczącą interpretacji wyników tej analizy. Z uwagi jednak na fakt, że wynikiem testu jest pewna wartość score w przedziale od 0 do 100, warto by było dokładnie doprecyzować, o metylację jakich biomarkerów jest ona oparta i jaka jest waga każdego pojedynczego wzorca metylacji w wyliczanej wartości score. Nasuwa się też pytanie jakie jest miejsce na zastosowanie kliniczne testu opartego wyłącznie o analizę mutacji promotora genu TERT w stosunku do aplikacji diagnostycznej testu metylacyjnego Bladder EpiCheck.
- W opisie wyników badań sekwencjonowania nowej generacji, zarówno WGS w publikacji pierwszej jak i panelowego NGS w trzeciej pracy, nie znalazłam informacji o podstawowych parametrach opisujących jakość techniczną uzyskanych danych po mapowaniu do genomu, a więc wartości dotyczącej minimalnego i średniego pokrycia w materiale somatycznym (publikacja 1) jak i germinalnym (publikacja 1 i 3). Głębokość pokrycia w przypadku sekwencjonowania zwłaszcza genomu nowotworowego ma decydujący wpływ limitujący przydatność kliniczną badania, dlatego jej raportowanie ma ogromne znaczenie w interpretacji wyniku NGS.
- W części rozprawy zatytułowanej – Wyniki i odnoszącej się do publikacji pierwszej z cyklu, na stronie 21, rozprawy Doktorant napisał ”analiza sekwencji wykazała obecność wariantu c.524G>T(p.(Arg175Leu) genu *TP53*, który z dużym prawdopodobieństwem może odpowiadać nadekspresji białka TP53 w badaniu immunocytochemicznym”. W jaki sposób Doktorant mógłby to wnioskowanie wyjaśnić, biorąc pod uwagę fakt, że patogene warianty *TP53* są aberracjami prowadzącymi do utraty funkcji, a dodatkowo na Figurze 4 załączonej oryginalnej publikacji autor pokazuje, że w genomie nowotworowym oprócz mutacji sekwencji *TP53* zidentyfikowano również delecję chromosomu 17p w obrębie locus genu *TP53*.
- W opisie zidentyfikowanych wariantów sekwencji w genomie raka pęcherza w publikacji pierwszej istotne byłoby podanie wyników klasyfikacji wariantów według ACMG oraz spełnionych przez nie kryteriów

patogenności. W tabeli 2 na stronie 43 Doktorant umieścił wprawdzie kolumnę zatytułowaną znaczenie kliniczne według [varsome.com](http://varsome.com), ale tylko 2 warianty spośród 11 wyraportowanych w tej tabeli są zaklasyfikowane jako patogenne lub prawdopodobnie patogenne, pozostałe to warianty VUS lub łagodne. Rozumiem, że Doktorant wyselekcjonował jednak te zmiany w toku analizy w oparciu o przesłanki o ich możliwym biologicznym znaczeniu, jednak na podstawie danych w tabeli nie zostały one jasno sformułowane.

- Praca druga jest bardzo zwięzłym przeglądem literatury odnoszącym się do znaczenia klinicznego mutacji promotora genu *TERT* w rozrostach wywodzących się z nabłonka pęcherza moczowego. Artykuł ten zyskałby gdyby uwzględniono całe spektrum patologiczne rozrostów dotyczących pęcherza moczowego w kontekście mutacji promotora genu *TERT*, dokładnie opisane w publikacji Cheng L i wsp. (PMID: 35700749). Nasuwa się też pytanie czy częstość występowania mutacji promotora genu *TERT* różni się w zależności od zdefiniowanego przez Weinsteina i wsp. podtypu molekularnego (A,B,C) raka pęcherza moczowego.

- W publikacji trzeciej w Tabeli 3 na stronie 62 przedstawiającej warianty patogenne zidentyfikowane u pacjentów zakwalifikowanych do Modułu II Doktorant słusznie nie umieszcza wykrytego heterozygotycznego wariantu w genie *MUTYH*, który w układzie recesywnym odpowiada za ryzyko polipowatości jelita. Jednak uważam, że umieszczenie w tej tabeli heterozygotycznej mutacji założycielskiej w genie *NBN* jest nieuzasadnione w kontekście ryzyka raka jelita grubego i raka trzonu macicy. Co więcej, jest one również nieuzasadnione w kontekście ryzyka raka piersi, co jasno pokazały wyniki pracy opublikowanej przez Chunling Hu i wsp. w czasopiśmie *New England Journal of Medicine* w 2021 roku, przeprowadzonej na grupie ponad 30 tys. pacjentek z rozpoznaniem raka piersi i podobnie licznej grupy kontrolnej (PMID:33471974). W kontekście populacji polskiej, charakteryzującej się jednym z najwyższych wskaźników częstości nosicielstwa tego wariantu w genie *NBN*, właściwa jego interpretacja jest istotna w poradnictwie genetycznym rodzin nosicieli.

- W oryginalnej wersji załączonej do rozprawy publikacji trzeciej, w sekcji dyskusja, na stronie 64 rozprawy Doktorant odnosi się do trudności interpretacyjnych, co do patogenności wyselekcjonowanych wariantów dotyczących genów *CDKN2A*, *CHEK2*, *NOD2* i *BRCA2*. Tylko częściowo mogę się zgodzić z opinią autora: wariant c.442G>A, p.(Ala148Thr) w genie *CDKN2A* (NM\_000077.5) jest częstym wariantem (f=0.02), o niskiej konserwacji ewolucyjnej, o jednoznacznie łagodnym efekcie na podstawie predyktorów bioinformatycznych. Podobnie częsty w populacji polskiej wariant c.470T>C w genie *CHEK2* (NM\_007194.4) p.(Ile157Thr), który na podstawie opublikowanych badań funkcjonalnych w niewielkim stopniu wpływa na ekspresję Chk2, a zupełnie nie modyfikuje fosorylacji kinazy Chk2 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA (PMID: 36468172), nie wydaje się szczególnie istotny w kontekście predyspozycji do nowotworzenia. Natomiast ciekawi mnie w jaki sposób Doktorant interpretuje nosicielstwo wariantów patogennych w genach *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM* u chorych zakwalifikowanych do badań w ramach Modułu II i w jaki sposób można by weryfikować ich ewentualny wpływ na rozwój nowotworu spoza spektrum przypisanej predyspozycji.

Przytoczone powyżej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i mojej pozytywnej opinii o pracy lekarza, Pana Tadeusza Kałużewskiego. Bardzo istotną zaletą tej rozprawy jest poszukiwanie wymiaru

aplikacyjnego przeprowadzanych badań genomicznych, a także dojrzała interpretacja możliwych ograniczeń ich zastosowania w praktyce klinicznej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona rozprawa jest świadectwem, iż Doktorant wykazał umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych i badawczych, wykazując potrzebną do tego wiedzę, jak i przygotowanie teoretyczne w zakresie zagadnień, których rozprawa dotyczy. Praca ta zawiera pewne elementy nowości naukowej, a przedstawione wyniki wskazują, że cele badawcze stawiane przez Doktoranta zostały zrealizowane. Wymiernym rezultatem badań są publikacje, z pewnością poddane już wcześniejszej wnikliwej ocenie przez recenzentów. Przedłożona rozprawa spełnia w pełni warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce t.j. Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.

Uwzględniając warsztat badawczy, wartości poznawcze i znaczenie praktyczne dociekań naukowych przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi wniosek o dopuszczenie lekarza, Pana Tadeusza Kałużewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Łódź, dnia 6 stycznia 2025 roku