

Gliwice, 29.05.2020

Dr hab. n. med. Jolanta Krajewska
Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej
Narodowy Instytut Onkologii im. M.Sklodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Gliwicach

Recenzja rozprawy doktorskiej lek.med. Martynty Borowczyk

Poszukiwanie genetycznych determinantów złośliwości zmian pęcherzykowych tarczycy metodą screeningu genomowego

Rozprawa przygotowana przez lek. med. Martynę Borowczyk powstała pod kierunkiem Prof. dr hab. Eweliny Szczepanek-Parulskiej w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych w Poznaniu, jednym z wiodących ośrodków tyreologicznych w kraju.

Rozprawę doktorską stanowi cykl czterech prac oryginalnych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływania IF 16.101:

1. Borowczyk M, Szczepanek-Parulska, Olejarz M, Więckowska B, Verburg FA, Dębicki Sz, Budny B, Janicka-Jedyńska M, Ziemnicka K, Ruchała M. *Evaluation of 167 Gene Expression Classifier (GEC) and Thyroseg v2 diagnostic accuracy in the preoperative assessment of indeterminate thyroid nodules: bivariate/HROC meta-analysis*. Endocrine Pathology. 2019;30:8-15.
2. Borowczyk M, Szczepanek-Parulska, Dębicki Sz, Budny B, Verburg FA, Filipowicz D, Więckowska B, Janicka-Jedyńska M, Gil L, Ziemnicka K, Ruchała M. *Differences in Mutational Profile between Follicular Thyroid Carcinoma and Follicular Thyroid Adenoma Identified Using Next Generation Sequencing*. Int J Mol Sci. 2019;20(13):3126.
3. Borowczyk M, Szczepanek-Parulska, Dębicki Sz, Budny B, Verburg FA, Filipowicz D, Wrotkowska E, Więckowska B, Gil L, Ziemnicka K, Ruchała M. *Genetic heterogeneity of indeterminate thyroid nodules assessed preoperatively with next generation*

sequencing reflects the diversity of the final histopathologic diagnosis. Pol Arch Intern Med. 2019;129(11):761-769.

4. Borowczyk M, Szczepanek-Parulska, Dębicki Sz, Budny B, Janicka-Jedyńska M, Gil L, Verburg FA, Filipowicz D, Wrotkowska E, Majchrzycka B, Marszałek A, Ziemnicka K, Ruchała M. *High incidence of FLT3 mutations in follicular thyroid cancer: potential therapeutic target in patients with advanced disease stage.* Ther Adv Med. Oncol. 2020;12:1758835920907534.

Celem przedstawionego w rozprawie cyklu prac, zaprezentowanych powyżej, była ocena dostępnych komercyjnych metod opartych o badania molekularne w diagnostyce przedoperacyjnej guzków tarczycy, optymalizacja procedury pozyskiwania materiału DNA z tkanek gruczolaków i raków pęcherzykowych tarczycy utrwalonych w formalinie oraz z materiału pobranego drogą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, przeprowadzenie analiz molekularnych w oparciu o sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) z zastosowaniem poszerzonego panelu mutacji, identyfikację nowych, dotychczas nieopisywanych molekularnych markerów złośliwości zmian pęcherzykowych tarczycy oraz porównanie profilu molekularnego gruczolaka i raka pęcherzykowego tarczycy w celu poszukiwania zależności pomiędzy cechami choroby, danymi z USG i badań molekularnych.

Pierwsza z publikacji to metaanaliza, która ocenia dostępne komercyjnie testy molekularne stosowane w uzupełnieniu przedoperacyjnej diagnostyki tzw. guzków nieokreślonych tarczycy (ang. *indeterminate thyroid nodules*), w których badanie cytologiczne nie pozwala na jednoznaczne różnicowanie zmian łagodnych i złośliwych. Klasyfikator ekspresyjny Afirma (ang. *gene expression classifier*, GEC) jako pierwszy na świecie został wprowadzony do rutynowej diagnostyki w USA. Test ten ocenia ekspresję 167 genów i na tej podstawie klasyfikuje badany guzek jako łagodny lub podejrzany. Natomiast Thyroseq v2 oparty jest o analizę najczęstszych mutacji metodą sekwencjonowania i w ten sposób różnicuje zmiany łagodne i złośliwe. Metaanaliza objęła łącznie 1086 guzków tarczycy poddanych badaniu molekularnemu z zastosowaniem GEC oraz 459 guzków badanych przy pomocy testu Thyroseq. Oszacowane zbiorcze (ang. *pooled*) wartości czułości, swoistości, PPV i NPV dla GEC i Thyroseq wynosiły odpowiednio 98%, 12%, 45% i 93% oraz 84%, 78%, 58% i 93%. Porównując oba testy Doktorantka podkreśla wyższą czułość GEC oraz wyższą swoistość i dokładność testu Thyroseq, a wyniki oceny jakości diagnostycznej obydwu testów uznaje za niewystarczające.

Chciałabym zwrócić uwagę, że obydwie testy molekularne mają różny mechanizm działania. GEC Afirma jest testem mającym na celu wykluczenie złośliwości (ang. *rule out*), natomiast Thyroseq jest testem nacelowanym na potwierdzenie nowotworu złośliwego (ang. *rule in*). Różnice te należy uwzględnić w porównaniu obydwu metod.

Zgadzam się z Doktorantką, że obydwie testy nie rozstrzygają jednoznacznie wszystkich wątpliwości klinicznych i w dalszym ciągu konieczne są badania, których zadaniem jest poszukiwanie bardziej wiarygodnych narzędzi diagnostycznych. Należy jednak podkreślić, że zastosowanie dostępnych testów molekularnych w znaczącym stopniu zmniejszyło liczbę guzków tarczycy, wymagających operacji diagnostycznych dla ostatecznego postawienia rozpoznania. Testy te są nie tylko powszechnie stosowane w USA, ale również refundowane przez tamtejszy system ubezpieczeń. Brak doświadczeń europejskich wynika przede wszystkim z ich wysokiej ceny.

Pragnę dodać, że omówiona powyżej metaanaliza spotkała się z pozytywną oceną Prof. Laury Fugazzoli z Mediolanu, wybitnego tyreologa, która przedstawiała jej wyniki w trakcie wykładu podczas zjazdu Europejskiego Towarzystwa Endokrynologicznego w Lyonie w 2019 roku.

Celem kolejnej publikacji była identyfikacja różnic w profilu mutacji gruczolaków (FTA) i raków pęcherzykowych tarczycy (FTC). Do analizy włączono 35 próbek FTA i 35 próbek FTC pozyskanych z materiału pooperacyjnego utrwalonego w parafinie. Analizę porównawczą przeprowadzono przy pomocy sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Potencjalnie patogenne mutacje stwierdzono w 40% FTA i 69% FTC. Liczba mutacji w FTA była znamienne wyższa niż w FTC. Somatyczne mutacje genów *SMAD4* i *STK11* stwierdzono jedynie w komórkach FTA, natomiast mutacje w genach *FBXW7*, *JAK3*, *KIT*, *NRAS*, *PIK3CA*, *SMARCB1* i *TP53* tylko w komórkach FTC. Obecność mutacji w genie *TP53* wiązała się z prawie 30-krotnie większym ryzykiem FTC. Mutację *FLT3* w komórkach guza znamienne częściej stwierdzano w FTC niż w FTA. Natomiast obecność mutacji w genach *FLT3* i *TP53*, bez mutacji *RET* zwiększała wykrywalność FTC o ponad 17%, natomiast brak mutacji *FLT3* i *TP53* przy obecności mutacji *RET* zwiększała wykrywalność FTA o 5,7%. Na podstawie powyższych wyników Doktorantka proponuje model do oszacowania ryzyka FTA i FTC oparty o analizę mutacji somatycznych w genach *FLT3*, *TP53* i *RET*.

Rozpoznanie raka pęcherzykowego tarczycy jest stawiane jedynie w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym, które umożliwia dokładną ocenę torebki guza i obecność nacieku nowotworowego w jej obrębie. Jednak, nawet wtedy, w wielu przypadkach

ostateczna diagnoza nie jest jednoznaczna a rozgraniczenie między rakiem a gruczolakiem wątpliwe lub niemożliwe, między innymi ze względu na zmiany po biopsji, które mogą sugerować obecność nacieku torebki. Dlatego uzupełnienie diagnostyki histopatologicznej o badania molekularne jest uzasadnione. Stanowi to obecnie bardzo aktualny obszar badań o czym świadczy liczba publikacji pojawiających się w ciągu ostatnich lat. Mimo to dotychczas nie udało się znaleźć markerów molekularnych, które pozwoliłyby na jednoznaczne różnicowanie gruczolaków i raków pęcherzykowych. Interpretacja wyników badań molekularnych jest trudna z uwagi na występowanie szlaków wspólnych dla gruczolaków i raków pęcherzykowych oraz ze względu na rzadkość występowania raka pęcherzykowego tarczycy, co znacznie utrudnia zebranie liczby próbek odpowiedniej do przeprowadzenia badań molekularnych.

Wobec powyższego należy podkreślić duże znaczenie prowadzonych przez Doktorantkę badań. Ciekawa i jednocześnie zaskakująca jest obecność mutacji *RET*, obserwowana w znaczącym odsetku zarówno w FTA jak i FTC (w obu grupach po 31,4%). Nasuwa się pytanie, gdzie są one zlokalizowane (kodon/ekson) i czy mamy tu do czynienia z mutacją, czy polimorfizmem pojedynczego nukleotydu? Ponieważ w praktyce przyjęta jest walidacja uzyskanych wyników na niezależnym zbiorze próbek, chciałabym zapytać, czy Doktorantka planuje taką analizę?

Chciałabym również zwrócić uwagę na pewne nieprawidłowości w stosowanej przez Doktorantkę terminologii. Badania genetyczne, czy tło genetyczne dotyczą chorób o podłożu dziedzicznym, a DNA uzyskiwane jest z leukocytów krwi obwodowej. Natomiast w odniesieniu do analizy mutacji somatycznych w komórkach guza używa się sformułowań „badania molekularne”, „diagnostyka molekularna”, „markery molekularne” itp. Podobnie, sformułowanie „mutacje stwierdzono u xx% pacjentów” jest nieprecyzyjne i może być zinterpretowane jako mutacje germinalne. Proponuję używać „mutacje stwierdzono w xx% gruczolaków / raków”.

Trzecia publikacja z cyklu miała na celu ocenę podłoża molekularnego tzw. nieokreślonych guzków tarczycy dla identyfikacji szlaków molekularnych włączonych w patogenezę raka pęcherzykowego tarczycy. DNA izolowano z rozmazu cytologicznego 16 zmian określonych jako Bethesda III i 9 zmian Bethesda IV, a badania molekularne prowadzono z zastosowaniem NGS. Stwierdzono, że najczęściej obserwowane mutacje w zmianach ogniskowych BIII i BIV, w których pooperacyjnie postawiono rozpoznanie raka tarczycy, dotyczyły genów *KDR*, *RET* i *TP53*. Natomiast w guzkach, w których badanie

pooperacyjne potwierdziło zmiany łagodne, mutacje najczęściej dotyczyły genów: *RET*, *TP53*, *FLT3*, *APC* i *PDGFRA*. Mutacja genu *KDR* była częściej obecna w rakach, ale różnice pomiędzy rakami i zmianami łagodnymi nie były znamienne statystycznie, co może wynikać z małej liczebności analizowanych zmian. Całkowita liczba zmutowanych genów była znamienne wyższa w zmianach łagodnych niż złośliwych. Doktorantka wnioskuje, że zróżnicowanie molekularne nieokreślonych guzków tarczycy odpowiada ich różnorodności histopatologicznej.

Przeglądając tabelę 3 w załączonej kserokopii tej publikacji, zwrócił moją uwagę fakt, iż zmiany w genie *RET*, stwierdzane przez Doktorantkę jako mutacje, są polimorfizmami pojedynczego nukleotydu (SNP), które w bazie ClinVar określone są jako niepatogenne (benign). Podobnie, opisywana zmiana w genie *TP53* wg ClinVar nie ma związku z występowaniem nowotworów złośliwych (benign). Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób wiąże się ona z opornością na leczenie?

Ostatnia z cyklu publikacji omawia wyniki analizy, której celem była identyfikacja markerów molekularnych raka pęcherzykowego tarczycy, także o znaczeniu prognostycznym, u chorych z zaawansowaną postacią choroby oraz poszukiwanie potencjalnych molekularnych celów terapeutycznych. W pierwszym etapie zdiagnozowano mutację genu *FLT3* w komórkach raka pęcherzykowego tarczycy u 29-letniej kobiety rasy kaukaskiej, odpornej na leczenie. W dalszej kolejności poddano sekwencjonowaniu (NGS) DNA wyizolowane materiału histopatologicznego 35 raków pęcherzykowych tarczycy. Mutacje (łącznie 26) w genie *FLT3* stwierdzono w 69% próbek FTC. Mutacje w domenie kinazy tyrozynowej (TKD) genu *FLT3* obserwowano w 58% próbkach *FLT3*(+). Ich obecność wiązała się z wyższym zaawansowaniem choroby.

Przedstawione przez Doktorantkę wyniki w tej publikacji są niezwykle ciekawe. Zgadzam się z Doktorantką, że precyzyjna ocena roli mutacji genu *FLT3* w patogenezie raka pęcherzykowego tarczycy, jak i jako potencjalnego celu terapeutycznego wymaga dalszych badań. Obecność dwóch mutacji genu *FLT3*: D835H i D835Y wiązała się z opornością na sorafenib u chorych, którzy otrzymywali ten lek z powodu ostrej białaczki limfatycznej. Uważam, że zagadnienie, czy te mutacje prowadzą do oporności na sorafenib u chorych na raka pęcherzykowego tarczycy wymaga potwierdzenia w badaniach klinicznych. Proszę o informację, jaka była odpowiedź (best response) na leczenie sorafenibem u pacjentki, przedstawionej w tej publikacji. Pragnę zwrócić uwagę, że w badaniu rejestracyjnym

sorafenibu najczęstszym efektem leczenia była stabilizacja choroby, sporadycznie częściowa regresja. Nie opisano przypadków całkowitej remisji choroby.

Podsumowanie wyników i sformułowane przez Doktorantkę wnioski znajdują uzasadnienie w przedstawionych wynikach opublikowanych badań. Chciałabym jedynie poprosić o doprecyzowanie na czym polega udoskonalenie metody pozyskiwania materiału do badań molekularnych.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych lek.med. Martynty Borowczyk została przedstawiona do recenzji jako 117 stronicowy zeszyt zawierający wykaz i kserokopie publikacji stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej, informacje o projektach badawczych, w ramach których te prace powstały, krótkie omówienie podsumowujące założenia i cele pracy, wyniki badań i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, kserokopie zgód komisji bioetycznej oraz oświadczenia współautorów.

Podsumowując, przedstawiony mi do oceny cykl prac stanowi wartościowy dorobek naukowy, potwierdzający, iż Doktorantka potrafi formułować i realizować założone cele badawcze. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka, lekarz, za cel pracy obrała sobie nie analizę kliniczną, a poszukiwanie markerów molekularnych różnicujących raki i gruczolaki pęcherzykowe tarczycy oraz przedoperacyjnie zmiany łagodne i złośliwe, dla których biopsja cienkoigłowa dała wynik nieokreślony. Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich omówionych powyżej prac. Każda z nich została opublikowana w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania. Uwagi, przedstawione powyżej, nie umniejszają wartości recenzowanej pracy. Dlatego wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. Martynty Borowczyk.

Przedstawiona do oceny 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 późn. Zm.). Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Doktorantki Martynty Borowczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

