

Dr hab. Luiza Handschuh, prof. ICHB PAN
Pracownia Genomiki
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
luizahan@ibch.poznan.pl

Poznań, 6 lipca 2026 r.

Rada Naukowa Instytutu Biologii
Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Stawiarz pt.
„Analiza występowania mutacji u pacjentów z ostrą białaczką szpikową
z zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji”

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. Artura Kowalika, prof. UJK, w Zakładzie Biologii Medycznej Instytutu Biologii na Wydziale Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.

Praca porusza zagadnienia ważne nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale i praktycznego, znajdując zastosowanie w diagnostyce molekularnej nowotworów i stratyfikacji pacjentów do określonych ścieżek terapeutycznych. Technologia sekwencjonowania nowej generacji, umożliwiającą jednoczesną analizę setek do tysięcy genów w wielu próbkach na raz, coraz częściej zastępuje bowiem inne techniki wykrywania mutacji w praktyce klinicznej. Ma ona szczególne znaczenie w diagnostyce ostrej białaczki szpikowej, która jest nowotworem agresywnym i heterogennym, a dobór leczenia zależy jest m.in. od profilu mutacyjnego.

Rozprawa jest napisana zwięźle (mieści się na 123 stronach) i ma charakter klasycznego opracowania, składającego się ze spisu treści, wykazu skrótów, wstępu (26 stron), przedstawienia celu pracy, opisu materiałów i metod (18 stron), wyników (20 stron), dyskusji (14 stron), podsumowania i wniosków oraz streszczenia w j. polskim i angielskim. Na kilku stronach podsumowano także dorobek naukowy Doktorantki. Całość wieńczy bogata bibliografia (22 strony), świadcząca o solidnym przygotowaniu Doktorantki i znajomości tematyki podjętej w pracy. Do rozprawy dołączono oświadczenie Doktorantki potwierdzające, że praca została napisana samodzielnie i że nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Wstęp, napisany w sposób klarowny i syntetyczny, składa się z dwóch zasadniczych części. Pierwsza wprowadza czytelnika w tematykę AML, z uwzględnieniem zarówno aspektów klinicznych jak i molekularnych. Znajduje się w niej opis systemów klasyfikacyjnych i wytycznych stosowanych w

diagnostyce i terapii AML. Druga część wstępu stanowi wprowadzenie do tematu sekwencjonowania nowej generacji (NGS), omawia poszczególne etapy przygotowania próbek i analizy danych NGS. Chciałabym tylko zwrócić uwagę na fakt, że obie technologie przywołane w podpisie pod ryciną 5, nie tylko Ion Torrent, są oparte o sekwencjonowanie przez syntezę. Ponadto wspomniana we wstępie metoda sekwencjonowania przez hybrydyzację, podana jako jedna z dwóch podstawowych kategorii NGS, nie jest już w zasadzie używana, ma więc jedynie znaczenie historyczne.

Celem pracy była identyfikacja mutacji i genów fuzyjnych u pacjentów z ostrą białaczką szpikową hospitalizowanych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w latach 2020-2023, charakterystyka molekularna wykrytych wariantów, określenie ich współwystępowania oraz użyteczności w stratyfikacji pacjentów do ukierunkowanych terapii AML. Grupa badana, choć nie bardzo liczna (109 osób), jest reprezentatywna i zrównoważona pod względem płci i wieku. Nieco większy udział mężczyzn oraz przewaga osób powyżej 60. roku życia są typowe dla AML. Do analizy mutacji zastosowano sekwencjonowanie NGS z wykorzystaniem technologii Ion Torrent oraz panelu 40 genów i 29 genów fuzyjnych typowych dla nowotworów mieloidalnych (Oncomine Myeloid Research Assay). Na pochwałę zasługuje fakt zastosowania ośmiu różnych programów do interpretacji klinicznej wykrytych wariantów. Jest to istotne, ponieważ programy te używają różnych algorytmów do kategoryzacji wariantów i rezultaty mogą się różnić. Do analizy statystycznej i wizualizacji wyników użyto pakietów środowiska R i programu R Studio oraz platformy cBioPortal.

Mutacje patogenne lub prawdopodobnie patogenne wykryto w 33 genach łącznie, przy czym najczęściej obserwowano zmiany w genach *FLT3*, *NPM1*, *TP53*, *DNMT3A*, *NRAS* i *TET2*. U 87% chorych zidentyfikowano co najmniej jedną zmianę. Przeprowadzona charakterystyka molekularna uwidoczniała geny, w których występują tzw. gorące miejsca mutacji (ang. *hotspots*, np. *NPM1* i *FLT3*), jak i takie, w których mutacje były rozproszone w obrębie całej sekwencji genu (*TP53*, *CEBPA*). Uzyskane wyniki są w dużej mierze zbieżne z tymi opisanymi w literaturze i bazach danych nt. AML. O znaczeniu praktycznym przeprowadzonych analiz świadczy fakt, że u blisko połowy (48%) badanych pacjentów wykryto obecność zmian genetycznych stanowiących podstawę klasyfikacji do terapii celowanej. Podobny odsetek pacjentów posiadał mutacje związane z niekorzystnym rokowaniem, co także wpływa na decyzje lekarzy o wyborze schematu leczenia. Warto również podkreślić, że u 13% pacjentów nie zidentyfikowano żadnej istotnej mutacji w badanych genach, co nie wyklucza występowania u tych pacjentów innych zmian genetycznych, znajdujących się poza spektrum badania. Mimo, iż nie dysponowano porównawczymi próbkami pochodzącymi ze zdrowej tkanki, ustalono, że najprawdopodobniej 4 warianty w genie *CEBPA* są wariantami germinальnymi. Wartościowym aspektem badań jest analiza współwystępowania mutacji, z której można wnioskować nt. różnych mechanizmów rozwoju AML. Interesującym wynikiem analizy VAF jest obecność homozygotycznych mutacji genu *JAK2* u pacjentów z AML. Dyskusja jest prowadzona w sposób umiemy i swobodny, świadczący o dużej znajomości badanej tematyki.

Dorobek naukowy Doktorantki, wyszczególniony w końcowej części opracowania, składa się z 13 doniesień konferencyjnych (w tym jednego opublikowanego), trzech rozdziałów w monografiach naukowych w j. polskim (w tym jeden w trakcie publikacji) oraz jednego artykułu w j. angielskim, opublikowanego w *Melanoma Research*, którego Doktorantka jest pierwszą autorką. Nie jest to wprowadzie przedmiotem oceny, ale warto podkreślić dużą aktywność Doktorantki w zakresie zdobywania nowych kompetencji. Odzwierciedla to udział w licznych konferencjach, szkoleniach i kursach, a także ukończenie studiów dyplomowych z bioinformatyki i biostatystyki w biologii i medycynie na Uniwersytecie Jana Kochanowskiego w Kielcach w latach 2024/2025.

Praca jest napisana bardzo starannie, znalazłam w niej tylko nieliczne drobne uchybienia, np. brak indeksów dolnych w nazwach związków chemicznych i użycie kropek zamiast przecinków w liczbach (tabela 6) czy odwołanie do ryc. 20 (zamiast 21) w tekście na str. 75. W tabelach 10 i 11 nazwy genów powinny być napisane kursywą, tak jak to jest konsekwentnie stosowane w tekście. Uchybienia te nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Sugerowałabym jedynie w przyszłości rozważenie innych terminów niż zastosowane w pracy bezpośrednie tłumaczenia z j. angielskiego, takie jak „nawracające mutacje” (ang. *recurring mutations*), „pulowanie bibliotek” (ang. *library pooling*), „uliniowanie” (ang. *alignment*) czy „wywoływanie wariantów” (ang. *variant calling*). Proponuję takie zamienniki jak „mutacje powtarzające się”, „mieszanie/przygotowanie puli bibliotek”, „dopasowanie/przyrównanie sekwencji” czy „identyfikacja/detekcja wariantów”. Radziłabym także wystrzegać się skrótów myślowych typu „zmutowany enzym”, bowiem mutacja występuje w genie, a nie w kodowanym przez ten gen białku. Niefortunna wydaje mi się też definicja bioinformatycznej analizy danych, podana na str. 29 jako „analiza *in silico* w trakcie potoku analizy danych”.

W trakcie lektury nasunęły mi się następujące pytania, na które prosiłabym Doktorantkę o odpowiedź:

- 1) Czy wiadomo, z czego wynika większa częstość występowania AML u mężczyzn niż u kobiet?
- 2) Jakie są zalety i ograniczenia sekwencjonowania NGS z wykorzystaniem panelu genów względem sekwencjonowania całego eksomu i całego genomu?
- 3) Jakie są zalety i ograniczenia zastosowanej w pracy technologii sekwencjonowania Ion Torrent względem innych dostępnych na rynku platform, np. Illuminy?
- 4) Dlaczego do identyfikacji genów fuzyjnych zastosowano jako materiału wyjściowego cDNA a nie DNA genomowego?
- 5) Dlaczego jako referencji do mapowania użyto wersji genomu człowieka GRCh37, a nie GRCh38?
- 6) Jakie średnie pokrycie sekwencjonowania uzyskano dla badanych genów?
- 7) Czy w przypadku AML można z dużym prawdopodobieństwem wnioskować o germinalnym pochodzeniu mutacji na podstawie VAF w zakresie 40-60%?
- 8) Dlaczego w analizie mutacji nie uwzględniono w ogóle wariantów o nieokreślonym znaczeniu (VUS)? Choć tego rodzaju wariantów nie uwzględnia się zazwyczaj w raportach z badania

diagnostycznego, w pracy o charakterze naukowym można byłoby się spodziewać chociażby ich krótkiego omówienia.

Prosiłabym także o dodatkowy komentarz dotyczący następujących wyników:

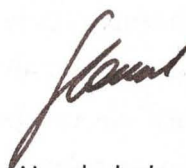
1) niska liczba (5, wg Ryc. 14) wykrytych fuzji *RUNX1::RUNX1T1* podczas gdy w badanej grupie pacjentów spory odsetek stanowili pacjenci z podtypem FAB M2, w którym ten konkretny gen fuzyjny występuje często (23 przypadki AML M2 i 19 przypadków AML M1/M2);

2) niski odsetek pacjentów z mutacją w genie *NPM1* (17%), niższy niż w wielu innych opisanych w literaturze badaniach jak i w dwóch porównywanych kohortach, BEAT AML i TCGA (>25%). Czy może to wynikać z faktu, że w badanej grupie było więcej pacjentów z nieprawidłowym kariotypem?

Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku genu *DNMT3A*, którego mutacje występują rzadziej w badanej grupie w porównaniu z dwoma innymi kohortami, a odwrotna w przypadku genu *TP53* (Ryc. 21). Żeby móc odnieść się do tych obserwacji rzetelnie, przydałaby się analiza statystyczna, na podstawie której można byłoby stwierdzić, czy różnice widoczne na wykresie są istotne statystycznie.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została opracowana poprawnie i starannie. Założone cele pracy zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki przedyskutowane w oparciu o dane literaturowe. Zastosowana w pracy metoda sekwencjonowania nowej generacji ma potencjał nie tylko naukowy, ale i praktyczny, stając się coraz częstszą alternatywą dla podejść opartych o analizy pojedynczych genów. **Potwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Stawiarz odpowiada wymaganiom stawianym osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora** określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668, z późn. zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.) oraz Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882 z późn. zm.), a także w Regulaminie określającym zasady i tryb postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach (Uchwała nr 27/2025 z dn. 24 kwietnia 2025). **W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie mgr Magdaleny Stawiarz do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**



dr hab. Luiza Handschuh, prof. ICHB PAN