



WARSZAWSKI  
UNIwersytet  
MEDYCZNY

ZAKŁAD BIOLOGII I GENETYKI NOWOTWORÓW  
KATEDRA PATOMORFOLOGII

Warszawa 10 sierpnia 2026

Prof. dr. n. med. Tomasz Stokłosa

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Stawiarz pod tytułem:  
„Analiza występowania mutacji u pacjentów z ostrą białaczką szpikową z  
zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji”**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Stawiarz dotyczy molekularnej charakterystyki ostrej białaczki szpikowej (acute myeloid leukemia, AML) z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji (next-generation sequencing, NGS). Badaniem objęto 109 pacjentów z AML leczonych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w latach 2020–2023. Autorka analizuje uzyskane wyniki w odniesieniu do dużych kohort badawczych, w tym TCGA i BEAT AML, a także aktualnych systemów klasyfikacyjnych WHO, ICC oraz stratyfikacji ryzyka ELN 2022. AML jest chorobą o dużej heterogenności molekularnej, a identyfikacja zmian genetycznych stanowi obecnie podstawę klasyfikacji części jej podtypów, stratyfikacji ryzyka oraz doboru postępowania terapeutycznego. Praca wpisuje się w nurt badań z zakresu medycyny precyzyjnej i biologii molekularnej nowotworów, a zgromadzony materiał pozwala na uzyskanie informacji mających zarówno wartość poznawczą, jak i potencjalne znaczenie praktyczne. Ostatnie lata i spektakularne przykłady sukcesów takiego spersonalizowanego podejścia w diagnostyce genetycznej podnoszą rangę badań podjętych przez Doktorantkę.

Głównym atutem pracy jest analiza rzeczywistej populacji chorych diagnozowanych i leczonych w jednym ośrodku klinicznym, przez co spełnia ona ostatnio modne i aktualne podejście „real-world data/evidence” będące w kontraście do danych z badań klinicznych, w których grupy podlegają wstępnej selekcji.

**Dlatego uważam, że wybór tematu rozprawy jest aktualny i dobrze przemyślany.**

## Uwagi ogólne i natury formalnej

Rozprawa liczy 123 strony (w tym bibliografia na 21 stronach) i ma klasyczny układ. Składa się ze wstępu, wprowadzającego dobrze w temat, celu pracy określonego w czterech punktach, szczegółowego opisu materiałów i metod, sekcji wyników oraz wyczerpującej dyskusji oraz podsumowania i wniosków, które są zawarte w 4 punktach oraz obszernej bibliografii. Z nieznanых przyczyn streszczenia w języku polskim i angielskim umieszczone są na końcu pracy zamiast na początku, to jednak nie jest uwaga krytyczna. Natomiast krytyczna uwaga odnosząca się do strony językowej rozprawy, którą chciałbym podnieść, dotyczy braku konsekwencji w nazewnictwie genów. Zgodnie z wytycznymi towarzystw naukowych, ludzkie geny powinny być pisane wielką czcionką i kursywą i większości przypadków Doktorantka stosuje prawidłowo tę regułę, ale np. w Tabelach 10, 11, czy 17, już niestety nie.

## Ocena merytoryczna rozprawy

**Wstęp** w sposób interesujący i uporządkowany wprowadza w tematykę rozprawy dotyczącą ostrej białaczki szpikowej jednak Doktorantka nie ustrzegła się w nim pewnych uproszczeń i błędów. Np. podrozdział 3.2 rozpoczyna się od stwierdzenia, iż ostra białaczka szpikowa to najczęstszy nowotwór złośliwy krwi u dorosłych, co nie jest prawdą, należy pamiętać iż w przypadku nowotworów układu krwiotwórczego termin złośliwy nie odnosi się wyłącznie do ostrych białaczek. W tym samym podrozdziale Doktorantka cytuje dane epidemiologiczne z lat 2009-2014, czy nie można było znaleźć bardziej aktualnych danych? W podrozdziale 3.6 poświęconym metodom diagnostycznym Doktorantka zaliczyła fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (z ang. FISH) do szybkich metod molekularnych co nie jest prawdą. Z kolei na rycinie 4 mającej obrazować badanie molekularne w ramach krótkiej ścieżki pokazane są wycinki z analizy wyników NGS w programie IGV co nie jest badaniem wykonywanym w trybie określanym jako krótka ścieżka wg Doktorantki (vide rycina 3). W opisie różnych technik sekwencjonowania NGS (podrozdział 3.91.) zabrakło mi wzmianki o sekwencjonowaniu nanoporowym.

Głównym **celem** rozprawy było określenie profilu mutacji z wykorzystaniem NGS u pacjentów z rozpoznaniem AML hospitalizowanych w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w latach 2020–2023. Doktorantka sformułowała cztery cele szczegółowe obejmujące:

- identyfikację zmian genetycznych oraz genów fuzyjnych i określenie częstości mutacji w badanej populacji;
- charakterystykę molekularną wykrytych wariantów, z uwzględnieniem ich klasyfikacji funkcjonalnej;
- analizę współwystępowania zmian molekularnych;
- ocenę możliwości wykorzystania NGS do stratyfikacji pacjentów w kontekście terapii ukierunkowanych molekularnie.

Cele zostały sformułowane logicznie i tworzą spójną sekwencję badawczą: od identyfikacji zmian, poprzez ich charakterystykę i analizę wzajemnych relacji, aż do interpretacji potencjalnego znaczenia klinicznego uzyskanego profilu molekularnego.

**Materiały i metody** są przedstawione w sposób rzetelny i wystarczający, po nich następuje przedstawienie w rozdziale 6 **wyników**.

Podstawowym wynikiem jest fakt, iż zmiany genetyczne wykryto u 95 spośród 109 badanych chorych, tj. u około 87% analizowanej kohorty. Do najczęściej zmienionych genów należały *FLT3*, *NPM1*, *TP53*, *DNMT3A*, *NRAS* oraz *TET2*, a uzyskany profil częstości mutacji był zasadniczo zgodny z obserwacjami pochodzącymi z większych badań międzynarodowych. Jest to istotne, gdyż wskazuje na zgodność uzyskanych wyników z dobrze scharakteryzowanymi populacjami AML, choć – co zaznaczam w dalszej części – nie powinno być utożsamiane z formalnym wykazaniem reprezentatywności badanej kohorty. Za istotną wartość pracy uważam kompleksowe podejście do charakterystyki molekularnej badanej grupy, na uwagę zasługuje także identyfikacja siedmiu typów rearanżacji genowych, obejmujących między innymi *RUNX1::RUNX1T1*, *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *ETV6::MN1*, *ETV6::NTRK3*, *ETV6::PDGFRB* oraz *KMT2A::ELL*. Szczególnie interesujące są przypadki rzadkich fuzji, ponieważ dobrze ilustrują jedną z głównych zalet szerszego profilowania molekularnego – możliwość identyfikacji zmian, które mogłyby nie zostać wykryte w diagnostyce ograniczonej wyłącznie do testów ukierunkowanych na najczęstsze aberracje.

Wartościową częścią pracy jest także analiza charakteru wykrywanych wariantów oraz ich lokalizacji w poszczególnych genach. Autorka prawidłowo odnosi uzyskane wyniki do biologii poszczególnych zmian, zwracając uwagę m.in. na typowe lokalizacje zmian w genie *FLT3*, charakterystyczny wariant *NPM1*, mutacje domeny wiążącej DNA w genie *TP53* oraz znaczenie lokalizacji mutacji *CEBPA*. Za wartościową należy także uznać analizę współwystępowania oraz wzajemnego wykluczania zmian molekularnych. Autorka wskazuje m.in. na częste współwystępowanie zmian w genach *NPM1* i *FLT3*, analizuje współobecność *PML::RARA* i *FLT3*, a także zmiany *FLT3* współistniejące z wariantami w genach szlaku RAS. Interesująca jest również obserwacja wzajemnego wykluczania zmian w *TP53* i *FLT3*, interpretowana jako możliwe odzwierciedlenie odmiennych mechanizmów molekularnych leukemogenezy.

Interesujący element analizy stanowi również wykorzystanie wartości VAF i próba odniesienia ich do architektury klonalnej AML. Zróżnicowanie wartości VAF dla poszczególnych genów Doktorantka interpretuje w kontekście zmian potencjalnie wcześniejszych, klonalnych oraz zmian powstających później w ewolucji nowotworu. Przedstawione obserwacje dotyczące m.in. *TP53*, *DNMT3A*, *TET2*, *NPM1*, *FLT3* i *NRAS* są biologicznie interesujące i dobrze wpisują się w obecne rozumienie klonalnej ewolucji AML.

Praktyczny wymiar rozprawy podkreśla analiza potencjalnego znaczenia wykrywanych aberracji dla leczenia. W badanej kohorcie, 50 spośród 109 pacjentów, czyli 46%, posiadało co najmniej jedną zmianę molekularną, którą Autorka uznała za potencjalnie predykcyjną, czyli istotną w kontekście leczenia. Dokonano także stratyfikacji według ELN 2022, uzyskując 22% chorych w grupie korzystnego, 30% pośredniego i 48% niekorzystnego ryzyka.

**Niestety to czego brakuje w wynikach i co wpływa na pełną analizę, to brak pełnych wyników badań cytogenetycznych dla analizowanej kohorty.** Jak sama Doktorantka opisuje we Wstępie, zaburzenia cytogenetyczne, aberracje chromosomalne, w tym w szczególności kariotyp złożony, mają kardynalne znaczenie dla określenia rokowania w AML. Wprawdzie zidentyfikowano i uwzględniono w analizie rearanżacje zrównoważone o charakterze fuzji genowych, jednak brak włączenia aberracji niezrównoważonych o typie dużej skali zmian liczby kopii (z ang. CNV) znacząco wpływa na interpretację całości wyników. Jest to o tyle niezrozumiałe dla recenzenta,

iz badanie cytogenetyczne jest badaniem obowiązkowym i rutynowym w diagnostyce AML, w związku z tym zakładam, że wszyscy chorzy, którzy byli włączeni do analizy mieli takie badanie wykonywane. Uważam, że wymaga to odniesienia do uzyskanych wyników, można założyć, że gdyby Doktorantka uwzględniła w swojej analizie również zmiany o charakterze dużych zmian typu CNV jak aberracje chromosomalne to statystyka wyniosłaby nie 87%, (chorzy, u których udało się wykryć przynajmniej jedną zmianę) a byłaby bliższa 100% (obserwacje własne recenzenta). A jednocześnie w wynikach jest uwzględniona klasyfikacja FAB dla poszczególnych chorych, która przez samą Doktorantkę jest określona jako mająca ograniczone znaczenie kliniczne (nie jest też omówiona we wstępie) i która niewiele wnosi.

**Dyskusja** jest obszerna, dobrze osadzona w aktualnym piśmiennictwie i w większości przypadków właściwie konfrontuje wyniki własne z rezultatami innych badań. Autorka wykazuje dobrą znajomość biologii molekularnej AML oraz klinicznych konsekwencji analizowanych zmian. **Wnioski** umieszczone po dyskusji, w liczbie czterech, potwierdzają zrealizowanie celów pracy, z jednym zastrzeżeniem o czym poniżej.

### **Uwagi krytyczne**

**Po pierwsze**, ze względu na brak pewnej ostrożności wymaga sformułowanie czwartego celu pracy jako „ocena skuteczności stratyfikacji pacjentów do terapii ukierunkowanych molekularnie”. Z przedstawionej dyskusji wynika, że analiza pozwoliła przede wszystkim określić odsetek chorych posiadających potencjalnie terapeutycznie istotne aberracje. Nie jest natomiast jasne, czy oceniano rzeczywistą kwalifikację do leczenia, zastosowane leczenie ani odpowiedź kliniczną. Należałoby tu postawić pytanie, czy określenie, że 46% chorych mogłoby potencjalnie odnieść korzyść z terapii celowanej, wynika wyłącznie z obecności odpowiednich biomarkerów molekularnych, czy dysponowano również informacjami o rzeczywistym leczeniu oraz odpowiedzi klinicznej tych pacjentów? Co więcej, jak już wspomniałem, brakuje pełnej analizy cytogenetycznej (nie zostały uwzględnione CNV o typie aberracji chromosomalnych) przez co tym bardziej należy ostrożniej wyciągać wnioski. Jeżeli takich danych nie analizowano, określenia „skuteczność stratyfikacji” czy potencjalna

„korzyść z leczenia” są zbyt daleko idące. Bardziej precyzyjne byłoby określenie potencjału NGS do identyfikacji zmian mogących mieć znaczenie terapeutyczne.

**Po drugie**, wnioski dotyczące reprezentatywności badanej kohorty powinny być również zdecydowanie ostrożniejsze. Zbieżność częstości najważniejszych mutacji z wynikami TCGA lub BEAT AML jest niewątpliwie argumentem na rzecz biologicznej wiarygodności wyników, jednak sama w sobie nie stanowi dowodu reprezentatywności populacji obejmującej pacjentów jednego ośrodka. Przykładowo, dziwi brak w badanej kohorcie aberracji w genie *DDX41* (wg metodyki genie pokrytym przez zastosowany panel, a nie wykryto zmiany u żadnego chorego) podczas gdy spodziewana częstość u nioselekcjonowanej grupy chorych z AML powinna wahać się między 3% a 5%.

**Po trzecie**, interesująca analiza VAF wymaga uwzględnienia ograniczeń interpretacyjnych. Korekta VAF względem odsetka blastów może zwiększać użyteczność tego parametru, jednak wysoka wartość VAF nie jest jednoznacznym dowodem klonalności czy utraty heterozygotyczności. Na wartość tę wpływają m.in. liczba kopii danego locus, LOH, czystość materiału, obecność prawidłowych komórek oraz struktura subklonalna. Szczególnie interpretacja wartości zbliżonych do 1 powinna więc być dokonywana z zachowaniem ostrożności.

**Po czwarte**, w rozprawie warto konsekwentnie oddzielić pojęcia wariantu somatycznego, wariantu konstytucyjnego oraz polimorfizmu. Sformułowanie, że dominujące zmiany typu missense „wynikały z polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP)” budzi wątpliwości terminologiczne. W kontekście profilu somatycznego AML, właściwszym określeniem jest zasadniczo SNV – single nucleotide variant, podczas gdy termin SNP jest zwykle odnoszony do wariantów populacyjnych.

Z tym zagadnieniem wiąże się także kwestia genów takich jak *DNMT3A*, *TET2* czy *ASXL1*. Zmiany w tych genach mogą występować również w ramach hematopoezy klonalnej o nieznanym potencjale (z ang. CHIP) i są związane z wiekiem. Z punktu widzenia biologicznej interpretacji wyników interesujące byłoby wyjaśnienie, w jaki sposób Doktorantka odróżniała zmiany bezpośrednio związane z klonem białaczkowym od zmian mogących poprzedzać rozwój AML.

**Po piąte**, przy przedstawianiu częstości zmian należałoby konsekwentnie stosować jednoznaczne mianowniki. Dotyczy to szczególnie rearanżacji, dla których w poszczególnych fragmentach dyskusji pojawia się odniesienie do odsetka „wszystkich

wykrytych zmian”. Klinicznie bardziej czytelne jest podawanie częstości przede wszystkim jako odsetka pacjentów posiadających daną aberrację.

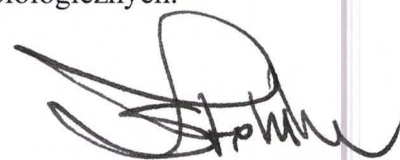
Przedstawione powyżej uwagi krytyczne nie podważają zasadniczej wartości przedstawionych badań i całej rozprawy, mam jednak nadzieję, iż w trakcie publicznej obrony Doktorantka będzie miał możliwość przedyskutowania i merytorycznego odniesienia się do nich.

### **Ocena końcowa**

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Stawiarz dotyczy ważnego i aktualnego problemu, a przeprowadzone badania mają wartość poznawczą. Autorka przeprowadziła wieloaspektową analizę profilu molekularnego grupy pacjentów z AML, uwzględniając częstość i charakter wykrywanych wariantów, rearanżacje genowe, wartości VAF, wzorce współwystępowania zmian oraz ich potencjalne znaczenie prognostyczne i terapeutyczne.

Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie materiału pochodzącego z rzeczywistej populacji chorych leczonych w ośrodku klinicznym o ugruntowanej renomie, wykazanie dużej heterogenności molekularnej AML, identyfikacja zarówno typowych, jak i rzadkich aberracji oraz odniesienie uzyskanych wyników do współczesnych klasyfikacji molekularnych i stratyfikacji ryzyka.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) w związku z czym chciałbym przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii, Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Stawiarz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk biologicznych.



Tomasz Stokłosa