



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Katedra Hematologii i Transplantacji Szpiku

KIEROWNIK: prof. zw. dr hab. Krzysztof Lewandowski

60-569 Poznań, ul. Szamarzewskiego 84 ; tel. 061 854 93 83/ fax : 0 61 854 93 56

e-mail: lewandowski@ump.edu.pl; sekretariat: e-mail: jadwiga.dworek@skpp.edu.poznan.pl

**Recenzja pracy na stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki
biologiczne mgr Iga Stukan pt. "Badania przedkliniczne związku BK124 jako potencjalnego
leku przeciwnowotworowego".**

Promotor pracy: prof. dr hab. Urszula Wojda

Praca jest wynikiem realizacji jednego z celów grantu Narodowego Centrum Nauki „Nowe leki przeciwbiałaczkowe – zaawansowane badania przedkliniczne.”: 2014/15/B/NZ7/00966; kierownik: prof. dr. hab. Urszula Wojda).

Głównym celem pracy było zbadanie potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej nowej pochodnej dikarboksyimidu, związku BK124 w badaniach przedklinicznych przeprowadzonych w warunkach in vitro oraz in vivo. Badania przeprowadzono stosując komórki przewlekłej białaczki szpikowej (ang. chronic myelogenous leukemia, CML) wyprowadzone z komórek kryzy erytroblastycznej pozyskanych od 56 letniej chorej (linia K562), w komórkach macierzystych i progenitorowych przewlekłej białaczki szpikowej pobranych od pacjentów oraz w mysim modelu CML po ksenotransplantacji komórek linii K562.

Omówienie wyników badań eksperymentalnych poprzedzone jest rozległym wstępem dotyczącym przedstawienia nowotworów jako schorzeń genetycznych cyklu komórkowego, skupiając także uwagę na danych epidemiologicznych dotyczących chorób nowotworowych, etapach rozwoju nowotworów, onkogenach, antyonkogenach i protoonkogenach, a także cechach charakterystycznych nowotworów. Ten rozdział przygotowanej przez Autorkę dysertacji potwierdza jej dużą znajomość poruszanej problematyki, także z uwzględnieniem aspektów historycznych. W kolejnym rozdziale Autorka przedstawiła charakterystykę białaczek u ludzi, ze szczególnym uwzględnieniem przewlekłej białaczki szpikowej, jej patogenezę, czynników prognostycznych oraz nowoczesnych metod terapii schorzenia z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej BCR::ABL. Szczegółowo omówiła znaczenie wysokiej konstytutywnej aktywności kinazy tyrozynowej BCR::ABL na funkcję zmienionych komórek macierzystych szpiku, w tym zakłócenie przekazywania sygnału komórkowego ścieżką JAK-STAT, PI3K/AKT/mTOR oraz RAS/RAF/MEK/ERK. Ich dokładna charakterystyka była wprowadzeniem do lepszego zrozumienia mechanizmu działania leku badanego - BK124. W kolejnym rozdziale wprowadzenia Autorka przedstawiła metody leczenia nowotworów, charakteryzując mechanizm działania wybranych leków cytostatycznych. W opinii Recenzenta, niezależnie od przedstawienia mechanizmu działania podstawowych leków cytostatycznych

stosowanych w terapii innych nowotworów, więcej uwagi należało poświęcić mechanizmom działania leków stosowanych uprzednio w terapii CML, w tym busulfanu oraz hydroksykarbamidu. Należałoby także podkreślić że w terapii CML stosowany jest także ponatynib i allosteryczny inhibitor kinazy BCR::ABL - asciminib.

Bardzo ważnym elementem wprowadzenia jest omówienie mechanizmów oporności pierwotnej oraz nabytej na leczenie, a także mechanizmów oporności na leczenie zależnych i niezależnych od kinazy BCR-ABL. Dane te są dobrą ilustracją złożonego mechanizmu potencjalnej oporności komórek przewlekłej białaczki szpikowej na dotychczas stosowane metody leczenia i potwierdzają potrzebę poszukiwania nowych substancji leczniczych.

W ostatniej części wstępu Autorka przedstawiła aktualny stan badań nad dikarboksyimidami, w tym pochodnymi naftalenoimidu (amonafid, mitonafid) interkalującymi do DNA oraz hamującymi działanie topoizomerazy II oraz talidomidem, lekiem immunomodulującym, hamującym angiogenezę powszechnie aktualnie stosowanym w terapii szpiczaka mnogiego. Właśnie jeden z dikarboksyimidów, opracowany i wyłoniony spośród ponad 80 potencjalnych cytotoksycznych substancji terapeutycznych przez polskie zespoły badawcze – BK124, posiadający w swojej budowie część heterocykliczną ftalimidu oraz rozgałęziony łańcuch acylowy, został oceniony w ramach badań przedklinicznych przez Autorkę przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jako potencjalny lek cytostatyczny przydatny w terapii CML.

Cele szczegółowe pracy obejmowały ocenę podstawowej cytotoksyczności indukowanej przez BK124 w komórkach ludzkiej CML, określenie zdolności BK124 do hamowania cyklu komórkowego, aktywacji apoptozy i modulacji szlaków sygnałowych związanych z proliferacją i przeżyciem komórki nowotworowej, wyznaczenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych BK124 w modelu zwierzęcym, ocenę skuteczności przeciwnowotworowej związku BK124 w mysim modelu ksenotransplantacyjnym, próbę indukcji oporności wielolekowej typu I (MDR1) przez BK124 oraz określenie wrażliwości komórek CML o fenotypie MDR1 na BK124, a także cytotoksyczności związku BK124 wobec komórek macierzystych białaczki CD34⁺ pozyskanych od nie leczonych chorych na CML w fazie przewlekłej.

Wymienione cele Doktorantka zrealizowała stosując nowoczesne techniki badawcze, w tym hodowle komórkowe, wielokolorową cytofluorymetrię przepływową z oceną immunofenotypu a także markerów potwierdzających wczesną i późną fazę apoptozy oraz śmierć komórek. W przeprowadzonych badaniach Doktorantka opanowała także inne trudne techniki badawcze w tym Western Blot oraz RT-PCR. Także analizowane i przedstawione przez Doktorantkę wyniki badań eksperymentalnych nad toksycznością BK124 na modelu mysim i szczurzym zasługują na wyróżnienie. Konkluzją przeprowadzonych badań jest 6 wniosków będących logicznym podsumowaniem przeprowadzonych analiz. Wszystkie z nich znajdują pełne uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych badań. Wartym podkreślenia jest fakt dużego prawdopodobieństwa praktycznego

zastosowania ocenianego związku BK124 w nieodległej przyszłości w terapii przewlekłej białaczki szpikowej.

Aktualnie bowiem, niezależnie od podejmowanych prób stosowania przerw w leczeniu inhibitorami kinazy tyrozynowej BCR::ABL u chorych w głębokiej i długotrwałej odpowiedzi molekularnej, prowadzone są badania kliniczne nad zastosowaniem terapii celowanej wymierzonej w komórki macierzyste CML. Przedstawiona do recenzji praca wpisuje się właśnie w ten nurt badań naukowych.

Szczegółowa analiza uzyskanych wyników zrodziła następujące pytania:

1. . Czy długotrwała hodowla komórek CML i linii komórkowej K562 nie prowadzi także do innych zmian czynnościowych mogących zmieniać wrażliwość komórek na lek badany?
2. Ocena toksyczności BK124 oparta była o ocenę makroskopową narządów i tkanek a także ocenę morfologii krwi. Taki model oceny uniemożliwia ocenę neurotoksyczności, kardiotoxyczności i toksyczności wobec komórek śródbłónka naczyniowego. Wymienione efekty są typowe dla talidomidu leku z tej samej grupy chemicznej co substancja badana. Czy Doktorantka dysponuje danymi na temat wywoływania przez BK124 wymienionych efektów niepożądanych?
3. W kontekście stwierdzenia przez Doktorantkę że *„komórki K562-MDR1, które mają wyindukowany mechanizm MDR1 oporności na leki przeciwnowotworowe, reagują zwiększoną ekspresją pompy na powierzchni komórki w odpowiedzi na stres wywołany związkiem BK124. Jednak, z informacji na temat odsetka komórek apoptotycznych oraz testu MTT wynika, że nie jest to wystarczające, żeby obronić komórkę przed indukcją apoptozy pod wpływem BK124”*: należy postawić pytanie: Czy obserwowane efekty cytotoksyczne są zależne od długo- czy krótkotrwałej ekspozycji komórek CML na substancję badaną?
4. Co było co było nośnikiem dla imatynibu i hydroksykarbamidu podawanych w modelu zwierzęcym drogą pokarmową?
5. Jaki był powód omawiania w dyskusji farmakokinetyki leków nie stosowanych w terapii przewlekłej białaczki szpikowej? Wydaje się, że bardziej zasadne byłoby omówienia farmakokinetyki inhibitorów kinazy tyrozynowej BCR::ABL?
6. W jaki sposób obliczono ekwiwalentność dawek substancji badanej stosowanych w badaniach hodowlanych i na modelu zwierzęcym?

Uwagi:

1. W pracy obecne są dość liczne błędy literowe (np. str. 81, 85, 93, 118, 126, 127), a także błędy wynikające z użycia błędnej terminologii (np. str. 112 – CML może ewoluować do fazy kryzy limfo-, mielo-, erytro- lub rzadziej megakarioblastycznej). Jak dotąd nie opisano transformacji choroby „w ostrą białaczkę limfocytarną”

2. W Tabeli 18. Kluczowe parametry farmakokinetyczne związku BK124 w modelu myszy Balb/c – dwukrotnie podano dane dotyczące drogi dootrzewnowej podania substancji badanej
3. W CML może dojść do zająćcia/nacieków narządowych. W tym przypadku słaba penetracja BK124 do przestrzeni pozanaczyniowej nie jest zaletą
4. Dokładna charakterystyka komórek macierzystych przewlekłej białaczki szpikowej to CD34+/CD38–/Lyn–
5. Co do stwierdzenia „Aktywność związku BK124 nie ogranicza się do komórek przewlekłej białaczki szpikowej. Charakteryzuje go również wysoka cytotoksyczność względem ostrej białaczki szpikowej (AML)” – należy stwierdzić że oba omawiane typy nowotworów wywodzą się z linii mieloidalnej, więc nie dziwi brak różnic
6. We wnioskach – „Związek BK124 jest cytotoksyczny dla ludzkich komórek przewlekłej białaczki szpikowej linii K562, pochodzącej z kryzy blastycznej”- powinno być erytroblastycznej
7. We wprowadzeniu: „W trzeciej fazie badań klinicznych (próba kliniczna IRIS), imatinib jako monoterapia spowodował wystąpienie całkowitej odpowiedzi cytogennej (ang. Complete cytogenic response, CCR)” – powinno być „W trzeciej fazie badań klinicznych (próba kliniczna IRIS), imatinib jako monoterapia spowodował wystąpienie całkowitej odpowiedzi cytogenetycznej (ang. Complete cytogenetic response, CCR)”
8. We wprowadzeniu: „Przeprowadzono wiele prób klinicznych, w których pod kontrolą lekarza, pacjenci przerywali leczenie imatinibem”. Przerwanie terapii w warunkach kontrolowanych można rozważyć jedynie w przypadku uzyskania uprzednio trwałej odpowiedzi głębokiej (minimum MR4.0), trwającej dłużej niż 3-5 lat. Poprawka także dotyczy stwierdzenia: „Jeżeli chory w fazie chronicznej przewlekłej białaczki szpikowej reaguje odpowiednio na pierwszą linię leczenia, to znaczy uzyskano u niego głęboką i długotrwałą większą odpowiedź molekularną (MMR), można wówczas rozważyć odstąpienie od dalszej terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej.” Co więcej w Polsce dopuszczone prawnie jest tylko odstawienie Nilotynibu (po spełnieniu w/w warunków) jeśli stosowany był w 1-linii terapii CML

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i nauce (Dz.U. z 2021r. poz. 478, 619, 1630).

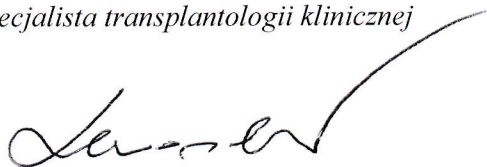
Wnikliwa analiza rezultatów badań przeprowadzonych przez innych członków zespołu badawczego przeprowadzona przez Doktorantkę w żaden sposób nie umniejsza wartości przeprowadzonych samodzielnie badań i analiz. Także zgłoszone uwagi mają jedynie charakter uzupełniający. Należy bowiem podkreślić, że przedstawiona do recenzji praca doktorska potwierdza duże zdolności Doktorantki w zakresie analizy danych w sposób kompleksowy.

Tym samym proszę wysoką Radę Naukową Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN o dalsze procedowanie pracy doktorskiej Pani magister Iga Stukan zgodnie z obowiązującym przepisami. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej do recenzji pracy.

Z wyrazami szacunku i poważania

prof. dr hab. med. Krzysztof Lewandowski
Specjalista chorób wewnętrznych
Specjalista hematolog
Specjalista transplantologii klinicznej

Poznań, 26 lipca 2023 roku



prof. dr hab. med. Krzysztof Lewandowski
HEMATOLOG
TRANSPLANTOLOG
specjalista chorób wewnętrznych



Wrocław, 2023-08-23

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Zakład Onkologii Doświadczalnej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Igi Stukan
pt. *Badania przedkliniczne związku BK124 jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego*
wykonanej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
pod opieką promotora prof. dr hab. Urszuli Wojdy

Poszukiwanie nowych, skuteczniejszych leków przeciwnowotworowych to wciąż niezwykle istotna część badań naukowych. Pomimo znaczących postępów dotyczących rozwoju wiedzy z zakresu biologii nowotworów, przyczyn ich powstawania, nowych metod diagnostyki i leczenia, wciąż pozostaje istotny odsetek pacjentów nie reagujących na współczesne terapie lub rozwijających lekooporność w trakcie leczenia. Dlatego tak ważne pozostają dobrze zaplanowane, multidyscyplinarne badania nad nowymi lekami przeciwnowotworowymi, które to właśnie stanowią przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej.

Oceniana rozprawa ma klasyczny układ typowy dla tego typu prac, zawiera wszystkie wymagane rozdziały, w tym streszczenie w języku angielskim i polskim. Pod względem edytorskim, praca ta przygotowana jest bardzo starannie. Napotkałam jedynie nieliczne błędy językowe czy literowe lub sporadyczne stosowanie żargonu laboratoryjnego.

Wstęp pracy to niezwykle ciekawa część tej rozprawy. Autorka poruszyła tutaj wszystkie zagadnienia, które stanowią tło naukowe jej badań, a więc opisała ogólne zagadnienia dotyczące choroby nowotworowej, jej rozwoju i cech charakterystycznych, skupiła się także na białaczkach i sposobach leczenia CML. Przybliżyła także zjawisko lekooporności oraz kierunki badań nad nowymi lekami. Na końcu przedstawiła grupę związków do której należy badany BK124. Czytając ten rozdział odnosiłam wrażenie, że Doktorantka podchodzi z wielką pasją do swej pracy naukowej. Muszę podkreślić, że sposób napisania wstępu po prostu mnie zachwycił. Autorka w płynny sposób przechodzi tutaj od zagadnień historycznych, dotyczących np. odkrywania różnych faktów powiązanych z molekularnymi mechanizmami rozwoju nowotworów, do opisu aktualnych danych z tego zakresu. Uważam, że wstęp, napisany w ten sposób nie jest po prostu nudnym zbiorem informacji, jest natomiast pięknym zobrazowaniem szerokiej wiedzy Autorki w tematyce jej pracy. Dodatkowo został on wzbogacony przygotowanymi przez Doktorantkę tabelami czy schematami. Tak więc wstęp w pełni wprowadza czytelnika do zagadnień związanych z celem pracy.

Sam cel pracy (i założenia pracy) został precyzyjnie sformułowany i uzupełniony o szczegółowe zagadnienia, które posłużyły do jego realizacji. Autorka ambitnie sformułowała cel pracy jako: „...przeprowadzenie badań przedklinicznych *in vitro* oraz *in vivo* i ocena BK124 jako potencjalnego nowego leku przeciwnowotworowego do leczenia przewlekłej białaczki szpikowej.” Cele szczegółowe zebrała w 6 punktach obejmujących zagadnienia związane z badaniami *in vitro* oraz *in vivo*.

W rozdziale opisującym metodykę prowadzonych badań, Autorka dość szczegółowo opisała część badawczą wykonywaną *in vitro*. Natomiast, jeśli chodzi o badania *in vivo*, opisano je bardzo pobieżnie, stąd mam kilka pytań do Doktorantki:

1. Pochodzenie zwierząt: podano tylko dane dotyczące 2 szczepów myszy z niedoborami odporności, natomiast nie podano pochodzenia szczurów Wistar, oraz myszy szczepu BALB/c użytych w badaniach farmakokinetycznych i toksyczności.

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, kontakt: 71 370 99 30, 71 370 99 38, www.hirszfeld.pl

Centrum Doskonałości IMMUNE



2. Nie wiadomo w których badaniach wykorzystano myszy BALB/c nude.
3. Nie opisano jaką drogą podano szczurom badany związek (informacja pojawiła się dopiero w opisie wyników).
4. W jaki sposób pobierano krew od zwierząt w poszczególnych eksperymentach, czy stosowano antykoagulanty, jeśli tak, to jakie?
5. Dlaczego w punkcie 7.10.3. wykorzystano aż ośmiomiesięczne myszy – takie myszy można uznać za raczej stare? W jakim wieku były szczury?
6. Dlaczego do badań farmakokinetyki mieszano krew pobraną od poszczególnych myszy? Taka informacja znajduje się w opisie metod, a jednocześnie w legendzie do wykresu 18 stwierdzono, że „Na wykresie B pojedynczy punkt oznacza pomiar pochodzący z jednej myszy”
7. Autorka w swoich badaniach z wykorzystaniem ksenoprzeszczepu ludzkiej białaczki opisuje „grupę intaktową” – rozumiem, że zwierzęta te nie miały przeszczepionych komórek nowotworowych, więc można je nazwać po prostu zwierzętami zdrowymi (zgodnie z tabelą 16)? Jednakże później w opisie wyników na str. 97 Autorka podaje, że nie znalazła różnic we wzroście guza między „kontrolą intaktową a kontrolą nośnika” więc już nie wiem czym jest ta kontrola „intaktowa”.
8. Jak analizowano morfologię krwi? Częściowo informację tą można znaleźć dopiero w opisie wyników.

Do opisu metodyki w zakresie badań *in vitro* nasunęły się następujące pytania:

1. Nie podano, jak uzyskano dane liczbowe z analizy densytometrycznej do zaprezentowania na wykresach – czy jest to wartość dla danego białka w odniesieniu do wartości dla aktywności albo laminy (w zasadzie nie opisano także jaką kontrolę ilości białka zastosowano w przypadku całych komórek, frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej – można się tego oczywiście domyślić).
2. W przypadku białek fosforylowanych – co przedstawiają wykresy? Aby oddać stopień fosforylacji danego białka, należy odnieść wartości uzyskane dla formy fosforylowanej danego białka do niefosforylowanej – czy takie wartości liczbowe zaprezentowano w wynikach?
3. W jaki sposób wybrano GAPDH, jako gen kontrolny do analiz qPCR – czy testowano inne geny?

Poza w/w uwagami dotyczącymi opisu metod, uważam, że rozdział ten przygotowano dobrze, podano niezbędne szczegóły dotyczące użytych odczynników czy aparatury, zaprezentowano także przebieg poszczególnych eksperymentów. Dobrze dobrano także metody stosowane w badaniach, w tym test MTT, analizy cytometryczne, western blot, qPCR oraz badania na zwierzętach.

Rozdział „Wyniki” Autorka rozpoczyna od opisu analizy cytotoksyczności związku BK124 wobec komórek białaczki K562. Ogólnie większość badań *in vitro*, a także badania *in vivo* wykonano używając tych komórek. Autorka oceniła także wpływ badanego związku na apoptozę, aktywność kaspazy 3, 8 i 9, ekspresję białek zaangażowanych w różne szlaki sygnałowe komórki. W badaniach tych wykorzystwała m.in. technikę cytometrii przepływowej oraz western blott. Badania potwierdziły aktywność cytotoksyczną związku BK124, jego aktywność proapoptotyczną, wraz z aktywacją badanych kaspaz (zależną od czasu). Autorka pokazała także zdolność badanego związku do modulowania ekspresji szeregu białek szlaków sygnałowych komórki, czy też białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. Warty podkreślenia i wartościowy jest prowadzenie większości tych analiz w zależności od czasu inkubacji z badanym związkiem, a także w jego różnych stężeniach. Następne rozdziały przedstawiają badania *in vivo*, w tym analizę farmakokinetyki oraz efektywność przeciwnowotworową wobec komórek K562 przeszczepionych myszom szczepu NSG. Jako kontrolę pozytywną mgr Iga Stukan zastosowała dwa leki: imatinib oraz hydroksymocznik. Autorka wykazała, że BK124 hamuje rozwój guzów K562 w stopniu podobnym do imatinibu, jednocześnie nie wykazano współdziałania w efekcie terapeutycznym tych 2 związków zastosowanych łącznie. Dalej Autorka przechodzi do zagadnień związanych z opornością wielolekową, włącznie z podjęciem próby uzyskania linii lekoopornej na ten związek (6-cio miesięczny cykl). Doktorantka uzyskała jednocześnie linię oporną na winkrystynę, dowodząc, że w przypadku BK124 oporność krzyżowa nie występuje wobec tej linii.



Ostatnim cennym etapem badań są te wykonane na komórkach pochodzących od pacjentów cierpiących na CML, w tym na komórkach o charakterze macierzystym. Recenzowana praca doktorska jest więc bardzo bogata w różnorodne, cenne wyniki, zatem Autorka musiała zapoznać się z szerokim wachlarzem technik biologii molekularnej, ale także z metodyką badań na zwierzętach. W tak szerokiej rozprawie łatwiej więc o niedopatrzienia, czy pominięcie informacji, które dla recenzenta wydają się istotne, a mianowicie:

1. W niektórych miejscach opisu wyników Autorka posługuje się nazwą BK124, a gdzie indziej BK124.1. Wcześniej Autorka wyjaśnia, że to ten sam związek. Dlaczego nie ujednolicono nazewnictwa w całej rozprawie?
2. Podawanie myszom badanych związków czy komórek Autorka określa terminem „*nastrzykiwanie*” – czyta się to niestety, jakby traktowano mysz jako próbkę, czy kolumnę w jakiejś aparaturze, a nie jak żywe zwierzę. Podobne wrażenie daje używanie terminu „*stężenie*” w odniesieniu do zastosowanej dawki leku.
3. Nie przeprowadzono analizy statystycznej danych dotyczących kinetyki wzrostu guza i innych parametrów dotyczących analizy eksperymentu terapeutycznego *in vivo*.
4. Czy efekt współdziałania imatinibu z BK124 oceniono *in vitro* zanim przystąpiono do badania *in vivo*?
5. Tabela 19 – dlaczego „kontrola intaktna” miała 5x cięższe serca od myszy z pozostałych grup?
6. Tabela 20 – widać duże różnice pomiędzy niektórymi grupami zwierząt w przypadku niektórych parametrów morfologii krwi – czy te różnice były istotne statystycznie? Autorka stwierdza, że wyniki nie odbiegały od „normy” – czy za tą normę przyjęła wartości określone dla myszy zdrowych tego samego szczepu? Dlaczego nie podała tych wartości referencyjnych?
7. Dlaczego nie przeprowadzono badań na prawidłowych PMBC – komórki śródbłonna są trochę odległe od tych nowotworowych, które były celem niniejszych badań?
8. Rozdział 10. „*Widząc, że związek wywołuje apoptozę w komórkach K562 zarówno w hodowli komórkowej, jak i w modelu mysim...*” – czy pobierano krew, tkanki od myszy i analizowano apoptozę aby udowodnić takie stwierdzenie?
9. Czy komórki hodowane 6-mcy z BK124 uodporniły się na inne leki przeciwnowotworowe?
10. Lamina B1 - użyto błędnego skrótu dla nazwy tego białka w opisie blotów.

Rozdział Dyskusja podzielono na podrozdziały, będące w zasadzie odpowiednikami poszczególnych etapów badań. Autorka sprawnie konfrontuje wyniki swoich badań z doniesieniami z piśmiennictwa naukowego. Zarówno tutaj, w dyskusji, jak i w całej pracy Autorka posługuje się dobrze dobranym merytorycznie i aktualnym piśmiennictwem naukowym. O dojrzałości Doktorantki świadczą także te fragmenty dyskusji, w których zwraca ona uwagę na to, co należałoby jeszcze zrobić, aby udowodnić proponowane mechanizmy działania związku BK124. Uważam, że dyskusja jest dobrze napisana, ale nasunęły mi się w trakcie jej czytania dodatkowe pytania do Doktorantki:

1. W komórkach opornych na winkrystynę traktowanych BK124 obserwowano wzrost ekspresji MDR1 – czy to mogłoby być niebezpieczne dla pacjenta leczonego takim preparatem?
2. Dyskusja str. 117 – „*nie obserwuje się morfologicznie nietypowych komórek*” – chodziło o brak cech charakterystycznych dla katastrofy mitotycznej – ale nie znalazłam w pracy analiz mikroskopowych czy innych opisujących tą formę śmierci komórki? Skąd więc to stwierdzenie? Ponadto, stosowane były wysokie stężenia badanego związku, może w mniejszych byłaby szansa na pojawienie się innych zjawisk?
3. W dyskusji dotyczącej farmakokinetyki: „*prawdopodobnie nie kumuluje się w ciele*” – skąd takie wnioski. Czy oceniono poziom BK124 w narządach w czasie analiz farmakokinetycznych?

Doceniam także ostatni rozdział dyskusji zatytułowany: „*Przyszłość rozwoju BK124 jako leku przeciwnowotworowego*”, w którym Autorka trafnie rozważa wady i zalety badanego związku, jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego, zwracając uwagę na fakt, iż nie jest on związkiem, którego mechanizm działania można by uznać za „celowany”.

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, kontakt: 71 370 99 30, 71 370 99 38, www.hirszfeld.pl

Centrum Doskonałości IMMUNE



Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW)
Wrocławskie Centrum Biotechnologii 2014-2018



W kolejnym rozdziale Autorka w punktach podsumowała wszystkie wyniki i przedstawiła płynące z nich wnioski. Chciałabym w tym miejscu podkreślić, że uważam za bardzo wartościowe wyniki dotyczące próby określenia mechanizmu działania badanego związku. Autorka wykonała tutaj szereg analiz, które sugerują mechanizm działania badanego związku i otwierają pole do dalszych badań w tym zakresie. Wykazała m.in., że BK124 obniża poziom białek szlaków komórkowych związanych z przeżyciem i proliferacją, takich jak STAT5, BCR-ABL1, AKT, mTOR czy NF- κ B; dodatkowo BK124 aktywuje kinazy p38MAPK oraz JNK oraz sprzyja wzrostowi poziomu białka p21 oraz czynnika transkrypcyjnego FOXO3A w jądrze komórkowym prowadząc do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Wykazała także, że bezpieczna dawka związku BK124, jest skuteczna terapeutycznie u myszy obarczonych białaczką K562. Bardzo interesujące są także dane dotyczące oporności wielolekowej, a właściwie jej braku po długotrwałej hodowli komórek K562 z BK124, przy jednoczesnym omijaniu lekooporności wyindukowanej na winkrystynę. Istotną cechą tego związku, odkrytą przez Autorkę, jest także jego cytotoksyczny wpływ na komórki CD34⁺CD38⁺. Przeprowadzone badania można więc uznać za szeroki panel badań przedklinicznych związku o działaniu przeciwnowotworowym, zatem Doktorantka w pełni zrealizowała założony cel badań. Badania te mogą znaleźć zastosowanie praktyczne, co podkreśla fakt opatentowania związku BK124; mgr Iga Stukan jest współautorką zgłoszenia patentowego.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska prezentuje szeroki zakres badań, których wyniki opisują właściwości związku BK124, jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego. Wyniki te są zatem oryginalnym wkładem Autorki w rozwiązanie tego problemu naukowego. Dodatkowo, należy podkreślić, że w przypadku niektórych badań, w których Autorka uczestniczyła, a nie wykonywała ich w całości samodzielnie, zostało to wyraźnie wyodrębnione przez Autorkę, wraz ze wskazaniem osób wykonujących poszczególne analizy czy ich części oraz rolą Autorki w opisywanych badaniach. Realizując te badania mgr Iga Stukan zastosowała szeroki wachlarz technik i modeli badawczych, co świadczy o Jej otwartości i wszechstronności i jednocześnie pokazuje dobre opanowanie tych technik. Jednocześnie doskonale przygotowany wstęp do rozprawy i dobrze przeprowadzona dyskusja ukazują dużą dojrzałość naukową oraz szeroką wiedzę teoretyczną Doktorantki, a także umiejętność wykorzystania tej wiedzy do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wobec tego stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Igi Stukan pt. *Badania przedkliniczne związku BK124 jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego* spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Zatem wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Igi Stukan do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu m.in. na wyróżniające się przygotowanie wstępu do ocenianej rozprawy doktorskiej, a także szeroki zakres wykonanych badań, wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz opublikowanie części z nich w 2 publikacjach naukowych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Kierownik Laboratorium

Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej



Kraków, 26 sierpnia 2023

**JAGIELLONIAN
UNIVERSITY
IN KRAKOW**

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Igi Stukan pt.:
„Badania przedkliniczne związku BK124 jako potencjalnego leku
przeciwnowotworowego”**

Mimo stałego postępu wiedzy na temat przyczyn, przebiegu i leczenia choroby nowotworowej, pozostaje ona jedną z głównych przyczyn śmierci w krajach rozwiniętych, a związane to może być w równym stopniu z postępującą „antropogenizacją” środowiska człowieka, jak i z rozwojem cywilizacyjnym i związanym z tym wzrostem średniej długości życia. Rozwój strategii profilaktyki i leczenia nowotworów to jedno z najpoważniejszych wyzwań stojących przed współczesną medycyną, a największym wyzwaniem dla współczesnej onkologii klinicznej pozostaje rozwój lekooporności nowotworów. Dotyczy to również tych nowotworów, dla których dysponujemy już stosunkowo skutecznymi lekami. Jednym z nich jest przewlekła białaczka szpikowa, która występuje głównie u dzieci, a związana jest z występowaniem translokacji między chromosomem 9 i 22. Nowotwór ten zdolny jest do wykształcania lekooporności na skądinąd bardzo skuteczny w jego leczeniu imatinib. Z tego względu konieczna jest intensyfikacja badań nad nowymi lekami przeciw tej chorobie, a do tego konieczne jest uniwersalne podejście doświadczalne w sposób maksymalnie uniwersalny testujące konsekwencje i mechanizmy działania konkretnych substancji na komórki konkretnego nowotworu zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

Rozprawa doktorska Pani mgr Igi Stukan stanowi próbę określenia aktywności, a co za tym idzie potencjalnej przydatności jednej z nowo zsyntetyzowanych substancji z grupy dikarboksyimidów w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej. Wykorzystując wszechstronny warsztat badawczy, oceniła ona potencjał cytotoksyczny, farmakokinetykę i skuteczność terapeutyczną BK124 w modelu komórkowym K562 *in vitro* i *in vivo*. Badania te uzupełniła o analizy indukcji lekooporności komórek nowotworowych i skuteczności związku względem komórek pochodzących od osób chorych na białaczkę. Zaproponowana tematyka wpisuje się w aktualnie rysujące się trendy w onkologii doświadczalnej i klinicznej, gdyż obejmuje ona zarówno aspekty podstawowe, jak i kwestie potencjalnie kluczowe dla rozwoju nowych terapii nowotworów krwi.

Praca ma rozkład typowy dla tego typu opracowań, mimo że wyniki w niej zamieszczone zostały już częściowo opublikowane. Składa się z dobrze skompilowanych Streszczeń w języku polskim i angielskim, tabeli skrótów, Wstępu, Celów Pracy, opisu Metod i Wyników, oraz ich Dyskusji, Literatury i Suplementu. Objętościowo jest ona dość obszerna, gdyż liczy 147 stron i zawiera 29 rycin oraz 21 tabel, a bibliografia liczy 259 pozycji literaturowych, w tym publikacji, które uznać można za klasyczne, jak i najnowszych prac dotyczących tematyki pracy. Strona redakcyjna rozprawy nie wzbudza większych zastrzeżeń: praca przygotowana jest starannie, ryciny są czytelne i wyraźne, a liczba błędów literowych i usterek redakcyjnych (np. angielski opis wykresów na Ryc. 28), które zauważyłem, jest na tyle znikoma, że nie wpływa na jednoznacznie pozytywny odbiór całości rozprawy.

Tło tematyczne badań stanowiących podstawę rozprawy zostało zarysowane w 44-stronnicowym Wstępie. Autorka wprowadza w nim czytelnika w podstawowe zagadnienia dotyczące znaczenia cywilizacyjnego nowotworów i podstawowych praw rządzących ich powstawaniem. W dalszej kolejności skoncentrowała się ona

Faculty of Biochemistry,
Biophysics and
Biotechnology

Department of Cell
Biology

Prof. Jarosław Czyż

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 6146

fax +48(12) 664 69 02

e-mail: jarek.czyz@uj.edu.pl

na białaczkach, ze szczególnym uwzględnieniem przewlekłej białaczki szpikowej, jej etiopatogenezy, obrazu klinicznego, podłoża genetycznego i biochemicznego oraz roli komórek macierzystych w jej rozwoju. Wreszcie na tle ogólnego opisu strategii chemioterapii nowotworów omówione zostały kwestie związane z terapią przewlekłej białaczki szpikowej i mechanizmami jej lekooporności, po czym Autorka płynnie przeszła do zagadnień związanych z poszukiwaniem nowych leków na tę chorobę.

Styl tego rozdziału, dobór faktów i rozłożenie akcentów wskazuje, że Autorka swobodnie porusza się w tematyce związanej z rozprawą. Mimo stosunkowo dużej objętości tej części rozprawy, czyta się ją dobrze, co wynika na równi z jej przejrzystej struktury, ilustratywnego języka rozprawy i epickiego talentu Autorki. W opis aktualnego stanu wiedzy umiejętnie wplotła ona bowiem ciekawe wątki historyczne. Sprawia to, że lektura wstępu pracy staje się podróżą zarówno w przestrzeni wiedzy dotyczącej wybranych aspektów choroby nowotworowej, jak i do czasów, gdy niektóre z obecnie aktualnych koncepcji dopiero się wykluwały. Diagramy i tabele ilustrujące niektóre z wątków omawianych w tej części rozprawy wspomagają czytelnika w nadążaniu za tokiem jej rozumowania i pomagają zachować orientację w poszczególnych zagadnieniach będących przedmiotem badań Autorki. Nieco brakowało mi syntetycznego choćby omówienia problematyki „złotego standardu” analiz przeciwnowotworowej aktywności nowych leków, co jest o tyle istotne, że istotą pracy jest próba (składną zakończoną sukcesem) wszechstronnej analizy konsekwencji podania konkretnej substancji dla dobrostanu komórek nowotworowych. Jednak rozdział ten skonstruowany jest w sposób logiczny, zawiera duży ładunek merytoryczny, a także dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy.

Założenia i cel pracy wyłożone zostały w sposób klarowny. Choć formalnie trudno uznać za takowy "przeprowadzenie badań", to jasnym pozostaje poczynione przez Autorkę założenie przeciwnowotworowej aktywności BK124. Szczegółowe cele wykonanych w ramach rozprawy badań zostały przedstawione w sposób kompletny; prowadzą one czytelnika przez część metodyczną i eksperymentalną rozprawy.

Metodyka to bardzo mocna strona recenzowanej pracy doktorskiej. Dobór i spektrum wykorzystanych technik doświadczalnych, których uszczegółowiony opis został zawarty w rozdziale Materiały i Metody, są wystarczające aby zweryfikować postawione hipotezy. Na uwagę zasługuje skojarzenie w jednej pracy technik *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Wśród tych pierwszych wykorzystano m.in. cytometryczne i kolorymetryczne techniki analiz wpływu badanego związku na żywotność komórek (ich aktywność metaboliczną i odpowiedź apoptotyczną), przebieg cyklu komórkowego i proliferację, a także analizy ekspresji genów na poziomie mRNA z wykorzystaniem techniki qRT-PCR i analizy poziomów białek z wykorzystaniem techniki immunoblot. Ważnym fragmentem całości metodyki była z natury rzeczy żmudna i czasochłonna próba wyprowadzenia szczepów lekoopornych, która dostarczyła istotnych danych na temat potencjału terapeutycznego badanego związku. Również opanowanie i efektywne wykorzystanie doświadczalnych modeli *ex vivo* (w tym analizy z wykorzystaniem komórek CD34⁺ pobranych od pacjentów) i *in vivo* (analizy aktywności BK124 w modelu mysim i szczurzym) bywa wyzwaniem samym w sobie. Na tyle, na ile byłem w stanie to ocenić, opis metodyki jest kompletny i szczegółowy. Stwarza on możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń przez osobę dysponującą odpowiednim sprzętem i wiedzą. Użycie urozmaiconych i wzajemnie komplementarnych metod bardzo dobrze świadczy o warsztacie badawczym Autorki rozprawy.

Równie wysoko oceniam treść i formę podrozdziałów, w których Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki. Opis wyników podzielony jest na cztery części, z których pierwsza dotyczy cytotoksyczności BK124 w modelu przewlekłej białaczki szpikowej K562, a kolejne opisują odpowiednio: wyniki badań farmakokinetyki tego związku *in vivo*, wpływu BK124 na mikroewolucję oporności wielolekowej i na funkcjonalność "białaczkowych komórek macierzystych". Taka konstrukcja jest przejrzysta w odbiorze; ponadto w poszczególnych sekcjach tekstu pracy nie brakuje krótkich wstępów i konkluzji, które ułatwiają zrozumienie ciągów logicznych, rządzących wykonywanymi przez Autorkę doświadczeniami.

Analizy aktywności BK124 w modelu K562 ponad wszelką wątpliwość wykazały cytostatyczną i pro-apoptotyczną aktywność tego związku. Konkluzja ta wsparta została wynikami analiz aktywności metabolicznej komórek, która spadała w sposób zależny od dawki leku, wynikami testów apoptozy (indukcja tego procesu), analiz dystrybucji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (indukowany przez BK124 blok G₂/M) oraz poziomów i wewnątrzkomórkowej lokalizacji niektórych białek regulatorowych (m.in. jądrowa akumulacja p21 i FOXO3a). Analizy mechanistyczne wykazały ponadto znaczące zmiany poziomów szeregu innych białek potencjalnie zaangażowanych w regulację apoptozy. Uzyskane wyniki tworzą ciąg logiczny i nie pozostawiają pola do wątpliwości, jednak niektóre wątki interpretacyjne takich wątpliwości dostarczają. Po pierwsze, testy metaboliczne, choć powszechnie stosowane, często zakłamują wyniki i generują trudności interpretacyjne. Dlatego proliferację komórek najlepiej badać bezpośrednio analizując zmiany liczby komórek po czasie. W tym przypadku nie wydaje się, aby zastosowanie testu MTT zasadniczo wpłynęło na jakość uzyskanych wyników, jednak interpretacja uzyskanych wyników w kategoriach liczby komórek (np. Ryc. 12 i 23) jest już zasadniczym nadużyciem konwencji. Po drugie, Autorka zanalizowała poziomy p-JNK i p-p38 po 24 godzinach od podania związku, kiedy znaczna część komórek weszła już w apoptozę, a na "polu walki" pozostały komórki o zwiększonej oporności na podany związek. Czy w związku z tym interpretacja wzrostu poziomów obu białek jako przejawu ich aktywności pro-apoptotycznej nie jest zbyt odważna?

Badania farmakokinetyki BK124 *in vivo* zostały zaprojektowane poprawnie i poprawnie wykonane, a liczba zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach wedle mojej oceny zapewnia minimum „komfortu statystycznego”. Na uwagę zasługuje rozbudowane spektrum parametrów farmakokinetycznych wykorzystanych do zaprojektowania procedur aplikacji związku zwierzętom doświadczalnym oraz fakt wykorzystania w tych doświadczeniach zarówno myszy, jak i szczurów. Generalnie analizy te wykazały wysoką aktywność cytostatyczną związku *in vivo* (podobną do imatinibu) przy jego stosunkowo niewielkiej toksyczności ustrojowej i potencjalnej retencji w obrębie układu krwionośnego. Wyniki są dobrze udokumentowane, ich opis jest konkluzyjny i nie budzi wątpliwości. Całość stanowi więc dobrą podstawę dla bardziej szczegółowych analiz długoterminowego wpływu BK124 na potencjał komórek białaczkowych.

W badaniach długotrwałej odpowiedzi komórek na działanie BK124 Autorka rozwinęła 2 podstawowe wątki badawcze. W pierwszym z nich skoncentrowała się ona na relacjach między lekoopornością komórek CML a aktywnością BK124. W drugim zaś określiła wpływ BK124 na funkcjonalność subpopulacji białaczkowych komórek macierzystych. Wyniki analiz wpływu BK124 na lekooporność komórek białaczkowych wykazały, że długotrwała inkubacja komórek K562 nie jest wystarczająca do indukcji mikroewolucji ich lekooporności. Zaobserwowano niewielki tylko wzrost poziomów błonowej lokalizacji P-gp w komórkach po 6-

miesięcznej ekspozycji komórek na lek, przy braku jego wpływu na wartość parametru IC_{50} . W drugim wątku zanalizowano reaktywność komórek uprzednio uodpornionych na winkrystynę (K562_MDR1) na podanie BK 124. Wykazano brak krzyżowej oporności tych komórek na BK124, mimo że wykazywały one zwiększoną oporność na paklitaksel i doksorubicynę. Z drugiej strony zaobserwowany wzrost liczby komórek $P-gp^+$ w tych populacjach po podaniu BK124 moim zdaniem świadczyć może o selekcji populacji komórek wykazujących wyższe poziomy tego białka. Należy zadać w tym miejscu pytanie, czy podobna populacja występuje w „natywnych” komórkach K562, czy uwidacznia się ona po podaniu BK124 w wyższych stężeniach i jakie mogą być konsekwencje kliniczne takiego stanu rzeczy?

Wreszcie potencjał terapeutyczny BK124 został potwierdzony wynikami analiz wpływu BK124 na funkcjonalność komórek $CD34^+$ oraz $CD34^+/CD38^-$ izolowanych z krwi obwodowej świeżo zdiagnozowanych pacjentów. Wykazały one stosunkowo niskie wartości parametru IC_{50} dla tych komórek oraz ich reakcję apoptotyczną na podanie związku. Mimo, że na Ryc. 27 brakuje danych dla komórek nietraktowanych związkiem, uzyskane wyniki pokazują potencjalną wrażliwość białaczkowych komórek macierzystych na BK124. Wpisują się one w ciąg interpretacyjny nakreślony w poprzedzających sekcjach.

Generalnie, sposób opisu wyników pracy świadczy o bardzo dobrej orientacji Autorki w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy. Podejście metodyczne oraz interpretacja, dobór strategii analitycznych nie budzą wątpliwości (poza zastrzeżeniami omówionymi powyżej). Wnioski z poczynionych analiz zostały zawarte w Dyskusji i w krótkim rozdziale podsumowującym przesłanie pracy. Zawierają one wszechstronną syntezę znaczenia uzyskanych przez Autorkę wyników, w tym dotyczących biochemicznego podłoża cytostatycznego i pro-apoptotycznego działania BK124, parametrów fizykochemicznych i farmakodynamicznych badanego związku, wszechstronności jego działania, w tym zdolności do pokonywania oporności wielolekowej nowotworowych komórek macierzystych. Mimo kilku niedociągnięć stylistycznych (np. „powrót komórki nowotworu do proliferacji i inhibicji apoptozy”), rozdział ten w sposób syntetyczny kompiluje znaczenie uzyskanych wyników na podstawie szczegółowego przeglądu danych literaturowych. Interpretacja ta jest wszechstronna, co pozwoliło również na rozbudowanie wniosków z pracy. Choć brakuje kilku kontroli (na przykład analiz wpływu BK124 na komórki hematopoetyczne, komórki linii mieloidalnej oraz podścieliska szpiku pobrane od zdrowych dawców), uzyskane wyniki jasno pokazują potencjał BK124 w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej a także jej lekoopornych wariantów. Trochę szkoda, że Autorka nie zdobyła się na odważniejsze dywagacje na temat zróżnicowania oporności komórek białaczki w zależności od ich fenotypu. Nie podważa to jednak wagi uzyskanych wyników ani nie kwestionuje wysokiej wartości merytorycznej i metodycznej rozprawy. Tym bardziej, że Autorka pokusiła się o sformułowanie perspektyw badawczych na przyszłość, w tym związanych z dalszymi analizami aktywności BK124 i ze sposobami jego podania pacjentom. Z drugiej strony lektura tej części rozprawy nasunęła mi kilka pytań:

- nowotwory charakteryzuje zwykle duża fenotypowa heterogenność budujących je komórek. Czy wiadomo coś na temat dywersyfikacji fenotypowej komórek K562, jej „regionalizacji” (np. szpik vs. krew obwodowa po przeszczepie do myszy)? Ciekaw jestem również przemyśleń Autorki na temat ewentualnego wpływu tego typu zróżnicowania fenotypowego na wydajność terapeutyczną BK124?

- Autorka wnioskuje o braku indukcji lekooporności komórek K562 przez BK124. Z drugiej strony udało się utrzymać hodowle tych komórek przez 6 miesięcy w obecności 2 μ M BK124. Jak wyglądała dynamika reakcji apoptotycznej komórek w zależności od czasu ekspozycji na ten związek?
- czy analizowano możliwość selekcji komórek K562 po „pulsowym” podaniu BK124 w wysokich (cytotoksycznych) stężeniach? Wzrost frakcji P-gp^{high} w populacjach K562 po podaniu BK124 (Ryc. 22A) może sugerować zasadność takiego podejścia;
 - może wiadomo już, jaka jest reaktywność komórek CD34⁺ i CD38⁺ pochodzących od zdrowych dawców na BK124?

Reasumując, podjęte przez Autorkę badania dotyczą bardzo ważnej kwestii pośrednio odnoszącej się do problemów klinicznych związanych z lekoopornością przewlekłej białaczki szpikowej. Wskazują one jednoznacznie na potencjał BK124 i na możliwe zastosowanie tego leku w leczeniu tej choroby, w tym jako czynnika podnoszącego wrażliwość komórek białaczki na imatinib. Niezależnie od poczynionych przeze mnie uwag, które mają charakter dyskusyjny i nie podważają merytorycznej wagi uzyskanych wyników uważam, że badania podjęte przez Autorkę mogą przyczynić się zarówno do głębszego poznania molekularnych mechanizmów rządzących rozwojem i progresją chronicznej białaczki szpikowej, jak i mogą pomóc wytyczyć nowe ścieżki terapii wspomagające leczenie tej choroby. Jest to szczególnie istotne w świetle danych pokazujących, że część pacjentów wykazuje oporność pierwotną na imatinib, a większość pacjentów nabywa oporność w trakcie kilkuletniej terapii. Podsumowując, rozprawa spełnia wszelkie ustawowe wymogi rozprawy doktorskiej określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.). Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN wniosek o dopuszczenie Pani mgr Igi Stukan do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę dużą wartość poznawczą pracy, jej rozmach metodologiczny i fakt opublikowania wyników pracy, a także dotychczasowy dorobek naukowy Autorki, wnoszę również o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

(Jarosław Czyż)