



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Dr hab. Dorota Bonarska-Kujawa, prof. uczelni
Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 9.08.2024

Ocena

pracy doktorskiej mgr Łukasza Biegały na temat: „Wykorzystanie szlaku kinazy ATR/CHK1 w celu zwiększenia efektywności terapii olaparibem. Porównanie efektów terapeutycznych w modelu *in vitro* oraz *in vivo* raka jajnika opornego na leczenie inhibitorem PARP”.

Rozprawa doktorska pana mgr Łukasza Biegały dotyczy bardzo istotnego problemu naukowego związanego z poszukiwaniem nowych i skutecznych metod terapii raka jajnika. Choroba ta pod względem zapadalności i umieralności wśród kobiet zajmuje czołowe miejsce na całym świecie. Ze względu na trudną diagnozę i skuteczność dostępnych terapii nowotwory jajnika stanowią dla współczesnej medycyny poważne wyzwanie. Mimo intensywnego postępu wiedzy w dziedzinie medycyny onkologicznej, aktualnie wciąż nie można zaproponować skuteczniejszej i bezpiecznej terapii w leczeniu tych nowotworów.

Stosowane do tej pory terapie są ściśle zależne od typu histologicznego nowotworów jajnika, wśród których 90% wszystkich przypadków stanowi nabłonkowy rak jajnika (EOC). Według klasyfikacji WHO z 2020 roku EOC można podzielić na pięć typów histologicznych, z których każdy jest uważany za osobną jednostkę chorobową i wymaga osobnej ścieżki terapeutycznej. Najczęściej występującym typem jest niskozróżnicowany surowiczny rak jajnika (HGSOC) o dużej niestabilności genetycznej, bezobjawowym przebiegu w I i II stadium choroby, późną wykrywalnością w III lub IV stadium, wysoką śmiertelnością i skłonnością do nawrotów po leczeniu. Mutacje genów zaangażowanych w naprawę DNA, w szczególności genów *BRCA 1/2*, są ważnym czynnikiem diagnostycznym w rozwoju i terapii tej choroby. Pęknięcia i uszkodzenia DNA są także sygnalizowane przez białka z grupy polimeraz m.in polimeraza PARP1, uruchamiające kaskadę działań naprawczych w DNA komórek. Proponowane dzisiaj terapie w przypadku zdiagnozowania HGSOC mają ograniczoną skuteczność i wysoką toksyczność ogólnoustrojową. Opierają się głównie na terapii skojarzonej łączącej operację cytoredukcyjną z pooperacyjną chemioterapią związkami platyny. Niezadowalająca skuteczność tej terapii jest dużym problemem, który wyraża się głównie w częstych nawrotach choroby oraz rozwijającej się w trakcie leczenia oporności wielolekowej (MDR). Zgodnie z najnowszymi wytycznymi pacjentki z nawrotem choroby mogą być poddane terapii lekami zawierającymi inhibitory PARPi. Lek olaparib jest inhibitorem PARPi, dopuszczonym do terapii przez Europejską Agencję Leków i w Polsce. Zastosowanie tego leku z jednoczesną utratą funkcji genów *BRCA 1/2* może doprowadzić do indukowanej śmierci komórek rakowych poprzez zahamowanie szlaku naprawy DNA. Problemem jest jednak występująca u wielu pacjentek oporność na działanie olaparibu. Podejmowane są zatem nowe badania nad usunięciem oporności na leki z grupy inhibitorów szlaku naprawczego DNA poprzez łączenie związków ukierunkowanych na różne cele molekularne, aby poprzez mechanizm synergizmu uzyskać lepsze efekty terapeutyczne. Badania prowadzone są również w kierunku innego szlaku naprawczego DNA - szlaku ATR/CHK1, który decyduje o przeżyciu lub śmierci komórki poprzez kontrolowanie cyklu komórkowego oraz stabilności i dynamiki replikacji. Powiązanie inhibitorów szlaku ATR/CHK1 z olaparibem u części pacjentek przełamuje oporność na leczenie w terapii skojarzonej. Liczne eksperymenty wskazują również na rolę miRNA w diagnostyce i leczeniu raka jajnika. Ekspresja



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

miRNA wpływa na proliferację, angiogenezę, przerzutowanie czy oporność na leczenie w tym również na cisplatynę oraz oliparib. Stopień skomplikowania mechanizmów na poziomie genowym i molekularnym stymulujących powstawanie nowotworów, jak również odpowiedzi organizmu na ich leczenie, jest wysoki. Konieczność podjęcia badań w tym kierunku jest jednak istotna i pilna, a także wymagająca nowatorskich i interdyscyplinarnych metod działania m.in. molekularnych metod diagnostycznych i bioinformatycznych.

Pan mgr Łukasz Biegała w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej podjął się szeregu bardzo istotnych dla medycyny onkologicznej badań, dotyczących sprawdzenia zastosowania terapii skojarzonej oliparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1 wobec komórek raka jajnika HGSOc w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Doktorant podjął się także próby określenia mechanizmów leżących u podstaw rozwoju oporności na oliparib w komórkach rakowych oraz oceny potencjału działania synergistycznego oliparibu i inhibitorów szlaku ATR/CHK1. Oceniał również rolę cząsteczek miRNA w nabywaniu oporności na oliparib w komórkach rakowych oraz jej przełamania w obecności inhibitorów szlaku ATR/CHK1. W badaniach *in vivo* mgr Biegała ocenił potencjał terapeutyczny skojarzonego działania oliparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1. Takie badania o charakterze interdyscyplinarnym zostały przeprowadzone po raz pierwszy.

Praca doktorska została wykonana w Instytucie Biofizyki w Katedrze Biofizyki Medycznej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem pani profesor uczelni dr hab. Anety Rogalskiej oraz dr Arkadiusza Gajka, w charakterze promotora pomocniczego. Badania zaprezentowane w pracy zostały przeprowadzone także we współpracy z Uniwersytem Medycznym w Łodzi (Zakładem Biochemii Kwasów Nukleinowych oraz Zakładem Genomiki Funkcjonalnej) oraz z Narodowym Instytutem Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytutem Badawczym (Zakładem Genetyki oraz Zakładem Immunoterapii Eksperymentalnej). Badania zrealizowane w ramach pracy doktorskiej były współfinansowane z dwóch źródeł: projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki SONATA BIS 9 oraz w ramach dofinansowania działalności naukowej doktorantów Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UŁ w latach 2021-2024.

Rozprawę doktorską stanowi cykl prac spójnych tematycznie, w skład których wchodzi: cztery opublikowane prace w czasopismach z bazy *Journal Citation Reports* o zasięgu międzynarodowym, w tym 3 publikacje doświadczalne i jedna praca przeglądowa oraz jeden nieopublikowany manuskrypt pracy doświadczalnej. Wszystkie prace dotyczą zagadnienia zastosowania kombinacji oliparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1 w celu zwiększenia śmiertelności komórek raka jajnika opornych na oliparib w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące prace:

1. Biegała Ł., Gajek A., Marczak A., Rogalska A. PARP inhibitor resistance in ovarian cancer: Underlying mechanisms and therapeutic approaches targeting the ATR/CHK1 pathway. *BiochimBiophys Acta Rev Cancer*. 2021. 1876(2):188633,
2. Biegała Ł., Gajek A., Marczak A., Rogalska A. Olaparib-resistant BRCA2MUT ovarian cancer cells with restored BRCA2 abrogate olaparib-induced DNA damage and G2/M arrest controlled by the ATR/CHK1 pathway for survival. *Cells*. 2023. 12(7):1038,
3. Biegała Ł., Gajek A., Szymczak-Pajor I., Marczak A., Śliwińska A., Rogalska A. Targeted inhibition of the ATR/CHK1 pathway overcomes resistance to olaparib and dysregulates DNA damage response protein expression in BRCA2MUT ovarian cancer cells. *Sci Rep*. 2023. 13(1):22659,



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

4. Biegała Ł., Kołat D., Gajek A., Płuciennik E., Marczak A., Śliwińska A., Mikula M., Rogalska A. Uncovering miRNA–mRNA Regulatory Networks Related to Olaparib Resistance and Resensitization of BRCA2MUT Ovarian Cancer PEO1-OR Cells with the ATR/CHK1 Pathway Inhibitors. *Cells*. 2024.13(10):857,
5. Biegała Ł., Statkiewicz M., Gajek A., Szymczak-Pajor I., Rusetska N., Śliwińska A., Marczak A., Mikula M., Rogalska A. Olaparib rechallenge combined with the ATR/CHK1 pathway inhibitors in olaparib-resistant PDX models of ovarian cancer: Mechanisms behind synergistic tumor growth inhibition (manuskrypt nieopublikowany).

Warto podkreślić, że sumaryczna wartość IF opublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi zgodnie z rokiem opublikowania 28.014 oraz 620 punktów MNiSW.

Do rozprawy doktorskiej zostały dołączone pisemne oświadczenia współautorów wyżej wymienionych prac o ich udziale procentowym w poszczególnych publikacjach. We wszystkich pracach mgr Biegała jest pierwszym autorem. Zgodnie z oświadczeniami współautorów procentowy udział Doktoranta we wszystkich pracach jest dominujący i stanowi odpowiednio 75, 70, 65, 70 i 60%. Ponadto z oświadczeń współautorów prac wynika, że pan mgr Biegała uczestniczył aktywnie na etapie opracowywania koncepcji, planowania i wykonywania znakomitej większości badań, które następnie potrafił opracować i przygotować w formie manuskryptu. Świadczy to nie tylko o dużym zaangażowaniu Doktoranta w przeprowadzone badania i oznaczenia na każdym etapie ich realizacji, ale również o godnej uwagi dojrzałości naukowej pana mgr Biegały. W przedstawionych do oceny pracach Doktorant nie pełnił roli autora korespondencyjnego.

O dużej aktywności naukowej Doktoranta świadczy również Jego dorobek naukowy, który zgromadził poza pracami stanowiącymi rozprawę doktorską, a na który składają się:

1. Artykuł opublikowany w czasopiśmie *Nutrients* (140 pkt MNiSW oraz IF 5,717)
2. 7 komunikatów konferencyjnych (prezentacji ustnych/posterów), przedstawionych na 7 konferencjach naukowych, w tym 6 międzynarodowych.
3. I nagroda w konkursie „Nagroda Naukowa Rektora Uniwersytetu Łódzkiego” dla doktorantek i doktorantów za aktywność publikacyjną i umiędzynarodowienie kształcenia oraz pracę naukową.
4. Wyróżnienie za plakat w konkursie „Best Poster Distinction” podczas międzynarodowej konferencji „8th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH”.
5. Stypendium konferencyjne dla młodych naukowców finansowane przez Federation of European Biochemical Societies (FEBS) na dofinansowanie uczestnictwa w kongresie międzynarodowym „The Biochemistry Global Submit – the 25th IUBMB, 46th FEBS and 15th PABMB Congresses” w Lizbonie.
6. Uczestnictwo w 8 szkoleniach stacjonarnych i online dotyczących hodowli komórkowych oraz genetycznych i molekularnych metod badawczych.
7. Członkostwo w komitecie naukowym Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen.
8. Wykład i pokaz sprzętu laboratoryjnego w trakcie seminariów „Optymalizacja technik pracy z białkami”.
9. Prowadzenie warsztatów popularyzujących naukę „Jak hodować komórki w warunkach *in vitro*?” w ramach Festiwalu Nauki.
10. Współpraca z firmą Merck Sp. z o.o. przy testowaniu urządzenia do pracy z białkami.
11. Członkostwo w EUROPEJSKIM Towarzystwie Onkologii Medycznej i PTBiochem.
12. Opieka nad eksperymentalną częścią pracy magisterskiej.



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Dorobek naukowy pana mgr Łukasza Biegały jest imponujący i świadczy o dużym i wszechstronnym potencjale naukowym Doktoranta. Oceniam go bardzo wysoko.

Rozprawa doktorska pana mgr Biegały ma klasyczny układ. Poza spisem i kopiami publikacji do rozprawy doktorskiej Doktorant dołączył również następujące rozdziały: wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz bibliografia. Rozprawa została poprzedzona wskazaniem: źródła finansowania, współpracy naukowej, dorobku naukowego, streszczeniem rozprawy w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów.

W szczegółowym i interesującym rozdziale „Wstęp teoretyczny” Pan mgr Łukasz Biegała w sposób syntetyczny zarysował problematykę związaną z trudnościami występującymi w leczeniu nowotworów jajnika oraz kierunkami poszukiwań nowych, skutecznych terapii celowanych opartych o niskocząsteczkowe inhibitory szlaków naprawczych DNA i terapię genową. Doktorant wskazał na skomplikowane mechanizmy molekularne i genetyczne, oparte o naprawcze szlaki sygnałowe białek mających znaczenie w procesie powstawania nowotworów. Pan mgr Biegała w sposób przejrzysty napisał także o wyzwaniach i problemach występujących na etapie poszukiwania skutecznych leków opartych o genetyczne terapie celowane, dobrane do indywidualnego przypadku danego typu nowotworu HGSOc. Zarówno procesy prowadzące do powstawania nowotworów, jak i te, które zmierzają do zahamowania rozwoju choroby, charakteryzują się dużym stopniem skomplikowania mechanizmów działania na poziomie molekularnym i genetycznym. Złożoność zaprezentowanych w pracy procesów powoduje, że do tej części pracy rodzą się pytania wynikające z ciekawości naukowej.

1. Na stronie 17 rozprawy Doktorant napisał: „Mutacje w genach BRCA1/2 są ważnymi czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi w raku jajnika na podstawie, których można częściowo przewidzieć przebieg choroby oraz skuteczność podjętego leczenia.” Czy w rozpoznaniu choroby wykonuje się rutynowo/przesiewowo badania genetyczne pacjentkom z podejrzeniem raka jajnika, czy na późniejszym etapie choroby, kiedy podstawowe leczenie w tym zakresie nie daje odpowiednich rezultatów?
2. Czy leki takie jak oliparib (inhibitory białek PARPi) będą również działały hamująco na szlaki naprawcze w komórkach prawidłowych jajnika?
3. Jakie mogą być skutki uboczne stosowania oliparibu wobec innych komórek prawidłowych w organizmie?
4. Dlaczego istotne jest przywracanie wrażliwości komórek nowotworowych na oliparib?
5. Nie jest też dla mnie jasne, czy do dnia dzisiejszego zostały już podjęte próby zastosowania terapii łączy z równoczesnym zastosowaniem inhibitorów genów *BRCA 1/2* i inhibitorów białek PARPi?
6. Do niskocząsteczkowych związków należą także hormony, tj. progesteron czy estrogeny produkowane przez jajniki w różnych stężeniach w zależności od fazy cyklu i życia kobiety. Czy są znane doniesienia o wpływie tych hormonów, ich produkcji lub jej braku na procesy powstawania nowotworów i ewentualnym współdziałaniu z lekami takimi jak oliparib?

Celem badawczym pracy doktorskiej, poprawnie sformułowanym przez Doktoranta, w rozdziale „Cel pracy”, była ocena czy zastosowana kombinacja oliparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1 będzie prowadziła do zwiększenia śmiertelności komórek raka jajnika opornych na oliparib w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Szczegółowe cele badawcze Doktorant sformułował także na każdym z 4 etapów wykonanych badań. W 1 etapie badań *in vitro* głównym celem było określenie mechanizmów powodujących oporność na oliparib w komórkach raka jajnika. Na tym etapie badań zaplanowano, a następnie z powodzeniem zrealizowano wyprowadzenie linii komórkowej PEO1-OR oporną na oliparib, co uważam za duże



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

osiągnięcie Doktoranta. Drugi etap miał na celu analizę mechanizmu działania przeciwnowotworowego połączenia oliparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1 w komórkach rakowych niewrażliwych na oliparib, jako kombinacji przełamującej oporność komórek na PARPi. Celem 3 etapu badań była ocena roli cząsteczek miRNA w nabywaniu i przełamaniu oporności komórek rakowych w obecności inhibitorów szlaków ATR/CHK1. Na ostatnim etapie w badaniach wykonanych *in vivo* celem była ocena potencjału terapeutycznego połączenia oliparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1.

W rozdziale „Materiały i metody” zostały szczegółowo opisane kolejne metody badawcze wraz oznaczeniami, które zostały wykonane w badaniach *in vivo* i *in vitro*. W tej części pracy zwraca szczególną uwagę niezwykle bogaty i precyzyjnie zaplanowany, pod kątem realizacji celu pracy, warsztat badawczy Doktoranta. Pan mgr Łukasz Biegała wykonał różnymi i umiejętnie dobranymi, nowoczesnymi metodami fizycznymi i analitycznymi szereg badań i oznaczeń na liniach komórkowych indukowanych badanymi inhibitorami. Doktorant wykonał m.in. następujące badania: cytotoksyczności badanych związków (test MTT), elektroforetycznej oceny DNA, określenia poziomu ekspresji białek (metoda Western-Blott), analizy cytometrycznej cyklu komórkowego, apoptozy i integralności błony, analizy parametrów wnikania związków do komórek, morfologii komórek, potencjału mitochondrialnego, izolacji DNA (test TUNEL) oraz izolacji RNA, ekspresji genów (metoda RT PCR), analizy bioinformatycznej danych ekspresji miRNA oraz danych klinicznych. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły Doktorantowi w pełni zrealizować cel badań.

W rozdziale „Wyniki i dyskusja” Doktorant omówił szczegółowo kolejne etapy badawcze na podstawie prac wchodzących w skład rozprawy. W tym rozdziale na szczególne uznanie zasługują niezwykle staranne i czytelne rysunki schematów mechanizmów działania badanych związków oraz prezentacji wyników, które bardzo ułatwiają czytanie tekstu i rozumienie mechanizmów molekularnych omawianych szlaków działania. Warto też dodać, że przedstawiona do oceny w ramach rozprawy seria publikacji, stanowi spójny tematycznie i szczegółowo zaplanowany oraz zrealizowany cykl ciekawych badań. W tej części rozprawy moje zainteresowanie wzbudziły metody wyznaczania synergistycznego działania oliparibu i inhibitorów ATR/CHK1.

1. Na stronie 38, na 2 etapie badań, słuszność koncepcji podania skojarzonego inhibitorów szlaku ATR/CHK1 oraz oliparibu została potwierdzona na podstawie wartości współczynnika interakcji leków CDI (coefficient of drug interaction) dla każdej użytej kombinacji związków. Czy Doktorant mógłby przybliżyć sposób wyznaczania tego współczynnika? Czy był on wyznaczany dla wszystkich możliwych kombinacji oliparibu oraz odpowiednio inhibitorów ATR i CHK1?
2. Bardzo ciekawe i obiecujące wyniki uzyskano w badaniu *in vivo* wykonanych na myszach wykazując efekty synergistyczne dla oliparibu i inhibitorów szlaku ATR/CHK1. Wyznaczano je korzystając z wartości współczynnika kombinacji CI. Czy ten współczynnik był tożsamy do współczynnika interakcji leków CDI wyznaczanego *in vitro* i dla jakich kombinacji został wyznaczony?

Na podstawie uzyskanych wyników Pan mgr Biegała w rozdziale „Podsumowanie i wnioski”, syntetycznie posumował wykonane badania oraz sformułował interesujące wnioski. Stanowią one w mojej ocenie oryginalne osiągnięcie Doktoranta, gdyż zawierają szereg ważnych i nowych aspektów poznawczych dotyczących aktywności inhibitorów szlaku ATR/CHK1 w przełamaniu oporności komórek raka HGSOc jajnika na lek oliparib oraz o poszerzeniu wrażliwości komórek na zaproponowane inhibitory szlaków naprawczych DNA. Kluczowe wnioski, sformułowane na końcu rozdziału stanowią



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

bardzo istotne z punktu widzenia terapii celowej informacje, które dają nadzieję na korzyści terapeutyczne płynące z synergistycznego działania inhibitorów i otwierają możliwości skuteczniejszych terapii przeciwnowotworowych opartych o syntetyczną letalność.

Spis publikacji do rozprawy doktorskiej zgromadzony w rozdziale „Bibliografia” stanowią publikacje angielskojęzyczne, głównie z ostatniego dziesięciolecia, poprawnie zacytowane we wszystkich rozdziałach rozprawy doktorskiej.

Podsumowanie

Rozprawę doktorską pana mgr Łukasza Biegały oceniam jako wyróżniającą. Na jej wysoką wartość merytoryczną składają się umiejętnie zaplanowane i przeprowadzone badania opublikowane w renomowanych czasopismach, które dotyczą aktualnego i bardzo ważnego problemu, jakim jest skuteczna terapia nowotworów lekami nowej generacji, wykorzystującymi celowaną terapię genową i molekularną. Doktorant wykazał się przy tym dużymi umiejętnościami samodzielnego prowadzenia zaawansowanych badań eksperymentalnych oraz znajomością problematyki z zakresu technik prowadzenia hodowli komórkowych, biofizycznych technik pomiarowych, a także farmakologii, cytobiologii, biochemii, genetyki i onkologii. W swojej rozprawie przedstawił oryginalne i interesujące badania, które mają charakter nowatorski i poznawczy z dużym potencjałem aplikacyjnym dla nowych terapii w rakach jajnika typu HGSOc.

Uważam, że przedłożona mi do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i jest podstawą do nadania panu mgr Łukaszowi Biegale stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Rozprawa doktorska pana mgr Biegały spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określonym w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku. Zwracam się, więc z prośbą do Komisji do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Łukasza Biegały do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wyróżniający się dorobek naukowy Doktoranta, zakres i jakość przeprowadzonych przez niego badań o terapeutycznym potencjale klinicznym, złożoność stosowanych metod badawczych i zaprezentowaną wiedzę merytoryczną oraz dojrzałość naukową wnosząc do Wysokiej Komisji o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana mgr Łukasza Biegały.

Dr hab. inż. Dorota Bonarska-Kujawa, prof. uczelni