

Łódź, 26.08.2023 r.

**Dr hab. n. med. prof. U.M. Joanna Sikora**

Kierownik Katedry Chemii Medycznej

i Zakładu Chemii Bionieorganicznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### Ocena

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Łukasza Szymona Biegały,  
pt.: „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”  
przedłożonej w postępowaniu doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie nauki biologiczne**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biofizyki Medycznej, Instytut Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Anety Rogalskiej, prof. UŁ, promotorem pomocniczym był dr Arkadiusz Gajek. Rozprawa doktorska składa się z cyklu czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych oraz manuskryptu przygotowanego do zgłoszenia do czasopisma (manuskrypt nieopublikowany).

Prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym, których łączny współczynnik oddziaływania (IF) wynosi 28,014, zaś sumaryczna liczba punktów ministerialnych 620. Część badań opisanych w oryginalnych artykułach oraz w niepublikowanym manuskrypcie przeprowadzono we współpracy z innymi jednostkami naukowymi, min. w Zakładzie Biochemii Kwasów Nukleinowych i Zakładzie Genomiki Funkcjonalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy (Zakład Genetyki, Zakład Immunoterapii Eksperymentalnej). Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane z projektu badawczego SONATA BIS 9 NCN (pt. „Wykorzystanie 1  
olaparibu i inhibitorów kinazy ATR/CHK1 jako celowanej terapii przeciwnowotworowej

opartej na syntetycznej letalności”. kierownik projektu: dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ; Doktorant był wykonawcą w projekcie) oraz działalności naukowej doktorantów Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego.

Do rozprawy doktorskiej zostały dołączone oświadczenia wszystkich współautorów z precyzyjnym określeniem zakresu działań wykonywanych w ramach danej pracy. Doktorant załączył również swoje oświadczenie, w którym określił własny wkład w powstanie poszczególnych prac, określając swój udział procentowy na poziomie od 60% do 70% oraz szczegółowo opisał czynności jakie wykonywał w poszczególnych badaniach i pracach. Oświadczenia wszystkich współautorów są zgodne i spójne z informacjami zawartymi w opublikowanych artykułach. Na podstawie powyższego można stwierdzić, że zaangażowanie mgr inż. Łukasza Biegały w przeprowadzenie badań doświadczalnych oraz analizę otrzymanych danych, jak i napisanie prac było wiodące i nie budzi wątpliwości, że była to samodzielna i wyodrębniona część pracy wykonana w kooperacji z innymi ośrodkami.

Rozprawa doktorska dotyczy niezwykle istotnego problemu nieskuteczności chemioterapii i rosnącej oporności nowotworów na leczenie, jak również skupia się na poszukiwaniu personalizowanych, ukierunkowanych molekularnie metod zwiększających efektywność terapii przeciwnowotworowej. Obiektem badań w niniejszej rozprawie doktorskiej stał się jeden z najczęstszych i najgorzej rokujących nowotworów występujących u kobiet, czyli nisko zróżnicowany surowiczy rak jajnika (HGSOC, ang. high-grade serous ovarian cancer). W leczeniu tego nowotworu znaczącą rolę odgrywają leki ukierunkowane molekularnie, w tym m.in. wykorzystany w badaniach Doktoranta – olaparib - niskocząsteczkowy inhibitor polimerazy poli(ADP)rybozy (PARPi, ang. poly(ADP)ribose polymerase inhibitor)

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej była ocena przeciwnowotworowego działania oraz potencjału terapeutycznego połączenia olaparibu z inhibitorem kinazy ATR (ATRi) lub kinazy CHK1 (CHK1i) odpowiednio w modelu *in vitro* oraz *in vivo* HGSOC z mutacjami w genach BRCA1 i/lub BRCA2 (BRCA1/2MUT) oraz nabytą opornością na olaparib. Porównano także skuteczność hamowania wzrostu i przeżycia opornych komórek HGSOC pod wpływem badanych kombinacji olaparibu oraz każdego z inhibitorów osobno.

Ponadto, Doktorant podjął próbę zidentyfikowania mechanizmów związanych z nabywaniem oporności na olaparib oraz jej przełamywaniem poprzez inhibicję szlaku ATR/CHK1.

Praca badawcza została podzielona na cztery rozbudowane etapy, z których każdy mógłby stanowić samodzielny projekt. Badania zaplanowano w logiczny i precyzyjny sposób oraz zostały szczegółowo opisane i zaprezentowane w trzech doświadczalnych publikacjach cyklu oraz manuskrypcie.

Zarówno „Wstęp teoretyczny” rozprawy jak i praca przeglądowa (Biegała Ł. i wsp. PARP inhibitor resistance in ovarian cancer: Underlying mechanisms and therapeutic approaches targeting the ATR/CHK1 pathway.) opublikowana w 2021 roku w prestiżowym czasopiśmie *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* (200 pkt. MNiSW, IF 11,414), stanowią wnikliwy przegląd i analizę dotychczasowej wiedzy na temat raka jajnika, metod jego leczenia, mechanizmów nabywania i przełamywania oporności na leczenie, ze szczególnym uwzględnieniem nisko zróżnicowanego surowiczego raka jajnika, będącego przedmiotem tej rozprawy. HGSOC charakteryzuje się znaczącą niestabilnością genetyczną, bardzo wysokim odsetkiem mutacji w genie TP53 oraz wysoką śmiertelnością ze względu na skłonność do nawrotów po leczeniu. W pracy przeglądowej Doktorant skupił się na dostępnych informacjach dotyczących mechanizmów nabywania oporności na PARPi, w szczególności olaparib oraz jej przełamywania w komórkach raka jajnika za pomocą kombinacji PARPi z cząsteczkami ukierunkowanymi na inne cele molekularne. Artykuł powstał w oparciu o przegląd 136 pozycji literaturowych, jest wzbogacony w przejrzyste schematy tłumaczące zawile mechanizmy biochemiczne dotyczące omawianych procesów rozwoju raka jajnika. Niewątpliwie praca jest interesującym kompendium wiedzy dotyczącym oporności na inhibitory PARP w raku jajnika, mechanizmów biochemicznych i strategii terapeutycznych ukierunkowanych na szlak ATR/CHK1. O wysokiej wartości merytorycznej pracy świadczy także wysoka jej cytowalność (w momencie sporządzania recenzji liczba cytowań pracy wg. bazy Web of Science wynosiła 25). Magister Łukasz Biegała podsumowując przegląd literatury podkreślił, że skuteczność PARPi doprowadziła do znaczących zmian w leczeniu pacjentów z rakiem jajnika, wraz z szybkim rozszerzeniem stosowania tych środków w klinice. Jednak problem oporność na stosowane metody leczenia nadal istnieje i pozostaje znacznym wyzwaniem klinicznym i wydaje się, że wraz ze wzrostem stosowania nowych

leków nastąpi również wzrost liczby przypadków oporności na PARPi, co tylko podkreśla konieczność opracowania nowych, skutecznych strategii pokonywania oporności.

Skuteczne leczenie raka jajnika wymaga wykorzystywania swoistych biomarkerów molekularnych, np. takich ocenianych za pomocą nieinwazyjnej biopsji płynnej. Czy od czasu opublikowania pracy przeglądowej zostały zidentyfikowane jakieś nowe biomarkery, które mogą przyczynić się do wdrożenia skutecznego monitorowania postępu choroby, jak i wdrożenia i oceny skuteczności nowych opcji leczenia?

Uważam, że oceniana rozprawa doktorska, doskonale wpisuje się w najnowsze trendy badań naukowych i niewątpliwie, prezentuje szeroką wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie nauk biologicznych, która dotyczy wielu aspektów rozwoju i diagnostyki raka jajnika oraz najnowszych strategii terapeutycznych stosowanych w leczeniu tego nowotworu.

Zastosowanie inhibitorów PARP w terapii przeciwnowotworowej przyniosło w ostatnim czasie zauważalne korzyści dla pacjentek z rakiem jajnika, jednak wciąż napotykaną są nowe problemy terapeutyczne związane z nabywaniem oporności i wznową choroby. Mgr Łukasz Biegała w prowadzonych przez siebie badaniach podjął próbę weryfikacji hipotezy badawczej twierdzącej, że zastosowanie kombinacji olaparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1 doprowadzi do zwiększenia śmiertelności komórek raka jajnika opornych na olaparib. Badania te zostały zaprojektowane do realizacji w czterech rozbudowanych etapach doświadczalnych przeprowadzonych, zarówno w badaniach *in vitro* (wyniki zostały opublikowane w czterech artykułach oryginalnych), jak i w eksperymentach *in vivo* (manuskrypt przygotowany do druku), które zostały przeprowadzone z zastosowaniem mysiego modelu heteroprzeszczepu tkanek nowotworowych pochodzących od pacjentki z rakiem jajnika (HGSOC).

Badania *in vitro* zostały zaprojektowane w trzech powiązanych ze sobą logicznie i tematycznie etapach. Pierwszy z nich polegał na wyprowadzeniu w hodowli komórkowej stabilnej linii raka jajnika o fenotypie opornym na olaparib z wrażliwej linii komórkowej z mutacją BRCA2 oraz określeniu mechanizmów związanych z rozwojem oporności na olaparib. Przeprowadzono również ocenę synergizmu działania olaparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1. Następnie, Doktorant wykonał analizę, przełamującą oporność na PARPi, synergistycznego potencjału połączenia olaparibu z inhibitorami szlaku TR/CHK1,

4

w wcześniej wyhodowanych niewrażliwych na olaparib komórkach raka jajnika. W ostatnim etapie oceniona została rola cząsteczek miRNA w nabywaniu oraz przełamaniu oporności komórek raka jajnika na badane związki.

Przeprowadzone w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej badania potwierdziły, że stosowanie inhibitorów szlaku ATR/CHK1 w przełamaniu oporności na olaparib ma znaczący potencjał, który może zostać wykorzystany w leczeniu pacjentek z niskozróżnicowanym surowiczym rakiem jajnika. Ponadto, pozwoliły zidentyfikować wiele współistniejących molekularnych mechanizmów związanych z obniżoną wrażliwością komórek raka jajnika na olaparib, w tym przede wszystkim rewersję mutacji w genie BRCA2 czy nadekspresję białek odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA oraz towarzyszącymi im zmianami w przebiegu cyklu komórkowego. Co więcej, zostało wykazane, że nabywanie oporności na olaparib przez komórki raka jajnika oraz ich uwrażliwienie poprzez inhibicję szlaku ATR/CHK1 wiąże się ze zmianami w regulacji ekspresji miRNA.

Niezwykle istotnym osiągnięciem tej pracy jest wykazanie, że łączne stosowanie olaparibu i inhibitorów szlaku ATR/CHK1 daje synergistyczny efekt cytotoksyczny w hodowlach komórek nowotworowych z nabytą opornością na ten lek, co daje nadzieję na opracowanie w przyszłości metody skutecznego przełamania nabytej oporności komórek raka jajnika na inhibitory PARP.

Dopełnieniem przeprowadzonych badań *in vitro* są eksperymenty *in vivo* wykonane z zastosowaniem modelu mysiego, które pozwoliły ocenić potencjał terapeutyczny łącznego podania olaparibu i inhibitorów szlaku ATR/CHK1 w kontekście uwrażliwiania komórek raka jajnika na badany inhibitor PARP. Do przeprowadzenia tej części badań konieczne było opracowanie oraz charakterystyka molekularna opornego na olaparib mysiego modelu heteroprzeszczepu tkanek nowotworowych pochodzących od pacjentki z rakiem jajnika. A dopiero w następnym etapie, przeprowadzenie eksperymentów w celu porównania skuteczności monoterapii i terapii skojarzonej łączącej olaparib z inhibitorami kinazy ATR lub CHK1 w odpowiednim modelu zwierzęcym raka jajnika. A na końcu ocena histologiczna i molekularna zmian zachodzących w heteroprzeszczepach uwrażliwionych na olaparib poprzez inhibicję szlaku ATR/CHK1. Eksperymenty na zwierzętach zostały przeprowadzone we współpracy z ośrodkiem warszawskim w oparciu o zgody właściwych Komisji Etycznych.

Numery zgód zostały zamieszczone w oryginalnej wersji manuskryptu, natomiast wydaje się, że dobrym zwyczajem jest także dołączanie kopii właściwej zgody do recenzowanej rozprawy doktorskiej. W oświadczeniu Doktoranta o zakresie wykonywanych w ramach rozprawy badań nie znalazłam informacji o udziale w eksperymentach w modelu *in vivo*, zatem jaki wpływ na opracowanie zastosowanego modelu badawczego miał Doktorant.

W załączonym manuskrypcie zostało opisanych szereg badań molekularnych i histologicznych wykonanych w pozyskanym, z modelu zwierzęcego, materiale biologicznym. Na podstawie tych licznych i kompleksowych wyników analiz, Doktorant wykazał, że nabywanie oraz przełamywanie oporności na olaparib w użytych modelu *in vivo* wiąże się ze zmianami ekspresji białek zaangażowanych w sygnalizację PARP, szlak ATR/CHK1, naprawę uszkodzeń DNA oraz proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Co ciekawe, nie zostało stwierdzone w guzach z nabytą opornością występowanie nadekspresji glikoproteiny P, która często jest wskazywana jako jeden z mechanizmów nabywania oporności komórek nowotworowych na leczenie. Sugeruje to, że w tym akurat przypadku, błonowe białko oporności wielolekowej (MDR1) nie ma istotnego udziału w obniżeniu wrażliwości na olaparib.

Mimo, że przedstawione w doktoracie wyniki i wnioski wymagają znaczącej ostrożności w interpretacji oraz bezpośrednim odnoszeniu do potencjalnych korzyści klinicznych, przede wszystkim dlatego, że opierają się one na modelu zwierzęcym, który został otrzymany z komórek nowotworowych jednej pacjentki, to niewątpliwie badania te poszerzyły aktualną wiedzę dotyczącą tego tematu. Zostało potwierdzone w modelu *in vivo*, że dodanie inhibitorów szlaku ATR/CHK1 synergistycznie wzmacnia zahamowanie wzrostu guza z mutacją BRCA1/2 opornego na olaparyb po ponownym zastosowaniu tego leku. Co ważne, badanie to dostarcza molekularnego uzasadnienia dla użycia kombinacji inhibitorów szlaku ATR/CHK1 oraz wykazuje, że w tym konkretnym modelu doświadczalnym, połączenie olaparybu przede wszystkim z inhibitorem ATR, a nie CHK1, ma większy potencjał terapeutyczny.

W pełni zgadzam się ze stwierdzeniem Doktoranta, że uzyskane wyniki badań mogą w przyszłości przyczynić się do opracowania biomarkerów, służących do przewidywania ryzyka nabywania oporności na olaparib oraz oceny skuteczności terapii łączących olaparib

z inhibitorami szlaku ATR/CHK1 u pacjentek z rakiem jajnika, co byłoby niewątpliwie znaczącym osiągnięciem w dziedzinie medycyny.

Po zapoznaniu się z całością przedłożonej do oceny dokumentacji, stwierdzam, że rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które w przyszłości może mieć znaczące implikacje kliniczne, zarówno diagnostyczne, jak i terapeutyczne.

### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

Reasumując, uważam, że recenzowana rozprawa doktorska zrealizowana i napisana przez mgr inż. Łukasza Szymona Biegałę, pt.: „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” przedłożona do oceny w postępowaniu doktorskim w dyscyplinie nauki biologiczne, spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 187.1, punkt 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zgodnie z zapisem przywołanego aktu prawnego oceniana dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz prezentuje ogólną wiedzę Doktoranta, jak również potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z tym wnoszę do wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr inż. Łukasza Szymona Biegały do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

### **Wniosek o wyróżnienie doktoratu**

Jednocześnie, po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej, załączonych kopii opublikowanych artykułów oraz przygotowanego do druku manuskryptu, które stanowią podstawę osiągnięcia, jak również ocenie dołączonych do przesłanej dokumentacji aktywności i dokonań naukowych Doktoranta wnoszę do uprawnionych Członków Komisji ds. Stopni Naukowych o wyróżnienie ocenianej pracy.

7

Uzasadnienie:

Niniejsza rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, zawiera elementy nowości naukowej oraz potencjał aplikacyjny, ponieważ wyniki przeprowadzonych przez Doktoranta badań, mogą przyczynić się do opracowania nowych narzędzi diagnostycznych i terapeutycznych istotnych dla pacjentek z rakiem jajnika. Zgodnie z przedstawioną dokumentacją, Doktorant posiada znaczący dorobek badawczy (760 pkt ministerialnych; IF=33,731) oraz wykazuje się istotną aktywnością naukową (udział w konferencjach, nagrody i stypendia, członkostwo w towarzystwach naukowych), jak i organizacyjną. Na podkreślenie zasługuje także fakt, że dysertacja została przygotowana z niezwykle dużą starannością i dbałością o stronę edytorską, redakcyjną i oprawę graficzną, dotyczy to zarówno części polskojęzycznej rozprawy, jak i załączonych anglojęzycznych artykułów.