

Łódź, 10.03.2023 r.

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

Kierownik Katedry Chemii Medycznej

i Zakładu Chemii Bionieorganicznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Marty Gralewskiej

pt.: Terapia celowana oparta na zwiększeniu wrażliwości komórek raka jajnika na olaparib poprzez zastosowanie inhibitorów białek regulujących stres replikacyjny wywołany pęknięciami nici DNA

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Marty Gralewskiej została zrealizowana na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w Katedrze Biofizyki Medycznej Instytutu Biofizyki pod kierunkiem naukowym dr hab. Anety Rogalskiej, prof. UŁ. Funkcję promotora pomocniczego pełnił dr Arkadiusz Gajek.

Na recenzowaną rozprawę doktorską składa się cykl trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych – jedna praca przeglądowa oraz dwie prace doświadczalne:

1. Publikacja przeglądowa: **Gralewska P.**, Gajek A., Marczak A., Rogalska A. Participation of the ATR/CHK1 pathway in replicative stress targeted therapy of high-grade ovarian cancer. *J Hematol Oncol.* 2020, 13, 39. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00874-6>
140 pkt MEiN; IF = 14,414; IF 5-letni = 17,520
2. Publikacje doświadczalne:
 - I. **Gralewska P.**, Gajek A., Marczak M., Mikula M., Ostrowski J., Śliwińska A., Rogalska A. PARP inhibition increases the reliance on ATR/CHK1 checkpoint signaling leading to synthetic lethality - an alternative treatment strategy for

epithelial ovarian cancer cells independent from HR effectiveness. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(24), 9715; <https://doi.org/10.3390/ijms2124971> 140 pkt MEiN; IF = 5,924; IF 5-letni = 6,628

- II. **Gralewska P.**; Gajek A.; Rybaczek D.; Marczak A.; Rogalska A. The Influence of PARP, ATR, CHK1 Inhibitors on Premature Mitotic Entry and Genomic Instability in High-Grade Serous BRCA^{MUT} and BRCA^{WT} Ovarian Cancer Cells. *Cells* 2022, 11, 1889. <https://doi.org/10.3390/cells11121889> 140 pkt MEiN; IF = 7,666; IF 5-letni = 7,677

Całkowita suma punktów zgłoszonego cyklu wynosi 420 (według listy czasopism punktowanych MEiN), zaś sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) w roku opublikowania wynosi 28,004; IF 5-letni wynosi 31,825. Zgodnie z załączonymi do dokumentacji oświadczeniami wszystkich współautorów wynika, że Doktorantka we wszystkich trzech pracach miała wiodący wkład w ich powstanie, który został oszacowany na około 50%. W pierwszej pracy opublikowanej w *J Hematol Oncol* (2020) mgr inż. P. Gralewska deklaruje znaczący udział w napisaniu i zredagowaniu pracy przeglądowej oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. W kolejnej pracy opublikowanej w 2020 roku w *Int. J. Mol. Sci.* Doktorantka deklaruje, że jej wkład w powstanie pracy polegał na współdziałaniu w stworzeniu koncepcji badania, udziale w wykonaniu części doświadczeń – testu MTT, testu wzrostu klonalnego, metody western blot oraz testu kometowego, metody oznaczenia aktywności kaspazy 3/7, opracowaniu wyników oraz ich interpretacji, wykonaniu analizy statystycznej oraz współtworzeniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje. W trzeciej pracy cyklu Doktorantka zadeklarowała swój udział w tworzeniu koncepcji badań, wykonaniu testu MTT, określeniu proliferacji komórek, wykonaniu testu mikrojądrowego, określeniu eksternalizacji fosfatydoseryny, podwójnego barwienia (Hoechst/PI), metody western blot, opracowaniu oraz interpretacji i analizie statystycznej wyników badań. Doktorantka współuczestniczyła w wykonaniu metody płytki metafazowej, cyklu komórkowego, zmierzeniu kondensacji chromatyny. Aktywnie uczestniczyła w pisaniu publikacji oraz redagowaniu odpowiedzi na recenzje. Zadeklarowany przez Doktorantkę wkład w powstanie cyklu potwierdzają również załączone do dysertacji oświadczenia

Współautorów (deklarowany udział Współautorów był na poziomie od 5% do 15%), jak również umieszczone w publikacjach (w punkcie „Author Contributions”) informacje.

Poza recenzowanym cyklem publikacji składających się na rozprawę doktorską, Doktorantka jest współautorem czterech artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach międzynarodowych. Sumaryczna liczba punktów dla całkowitego dorobku naukowego mgr inż. Patrycji M. Gralewskiej według listy czasopism punktowanych MEiN wynosi 820, sumaryczny IF publikacji (w roku opublikowania) wynosi 45,378. Ponadto mgr inż. P. Gralewska jest współautorem 6 prezentacji ustnych przedstawianych na polskich i międzynarodowych konferencjach naukowych, z których w 5 przypadkach była osobą prezentującą; jest także współautorem 8 posterów. Przytoczony powyżej całkowity dorobek naukowy Doktorantki świadczy o dużej aktywności badawczej, co potwierdza także wykonana w bazie Web of Science analiza bibliometryczna, z której wynika, że 7 prac opublikowanych w latach 2019-2022, których Doktorantka jest współautorem, było cytowane 60 razy (56 bez autocytowań) co daje Autorce indeks Hirscha = 4. Jest to bardzo dobry wynik biorąc pod uwagę krótki staż pracy naukowej mgr inż. Patrycji Gralewskiej.

Zasadność podjęcia tematu oraz ocena formalna pracy

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Gralewskiej była ocena cytotoksycznego efektu działania inhibitorów kinazy ATR (AZD6738, ATRi, ceralasertib) i CHK1 (MK8776, CHK1i) w skojarzeniu z inhibitorem polimerazy poli(ADP-rybozy) (AZD2281, PARPi, olaparib) w trzech liniach komórkowych raka jajnika – SKOV-3, OV-90 oraz PEO-1 – ze sprawnym jak i uszkodzonym systemem rekombinacji homologicznej. Cele szczegółowe obejmowały analizę wpływu badanych związków na aktywację szlaku ATR/CHK1 oraz ocenę ich działania genotoksycznego i w konsekwencji określenie czy łączne stosowanie PARPi+ATRi i PARPi+CHK1i doprowadzi do śmierci komórek raka jajnika na drodze syntetycznej letalności.

Przedłożona do recenzji książkowa wersja rozprawy ma typowy układ dla opracowań o charakterze tzw. „zszywki” czyli zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie

artykułów naukowych. Dysertacja składa się z typowo sformatowanej strony tytułowej, podziękowań i spisu treści. Następnie Doktorantka zamieściła informację o źródle finansowania swoich badań (Grant Narodowego Centrum Nauki przyznany w ramach konkursu SONATA BIS9 nr 2019/34/E/NZ7/00056 pt. „Wykorzystanie olaparibu i inhibitorów kinazy ATR/CHK1 jako celowanej terapii przeciwnowotworowej opartej na syntetycznej letalności”; kierownik –dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ) oraz prezentację całkowitego dorobku naukowego, z wyszczególnieniem publikacji wchodzących w skład cyklu rozprawy doktorskiej, jak również obszerny spis pozostałych osiągnięć i aktywności. Kolejną część dysertacji stanowi syntetyczny opis badań, które zostały zawarte w trzech pracach stanowiących tzw. zszywkę. Opis został poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz angielsko-polskim wykazem stosowanych skrótów.

Opis badań ma klasyczny układ, typowy dla opracowań naukowych. Składa się z krótkiego wstępu, który stanowi, nie tylko interesujące wprowadzenie opisujące epidemiologię, patomechanizm oraz standardowe, jak i nowo opracowywane metody leczenia raka jajnika, ale także uzasadnia celowość przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Ta część pracy została wzbogacona dwoma rycinami poglądowymi oraz jedną przedstawiającą wyniki badań własnych Doktorantki, które nie zostały jeszcze opublikowane a stanowią kontynuację badań składających się na cykl. Zawierają one ocenę wpływu PARPi, ATRi, CHK1i oraz ich skojarzonego działania na potencjalny wzrost ekspresji glikoproteiny P, czyli białka związanego z występowaniem oporności wielolekowej.

Cel pracy i cele szczegółowe zostały jasno sformułowane i konsekwentnie zrealizowane w dalszej części pracy i opublikowane w recenzowanych trzech czasopismach.

Sekcja „Materiały i metody” oraz „Literatura” stanowią skrót informacji szczegółowo opisanych w załączonych artykułach. Literatura wykorzystana w tym opisie, jest prawidłowo dobrana do poruszanych tematów, w większości anglojęzyczna pochodząca z renomowanych czasopism o zasięgu światowym. Formatowanie piśmiennictwa jest jednolite, tylko w pojedynczych pozycjach odbiega od zastosowanego formatu, np. w pozycji 11, 12, 20, 28. W przypadku cytowania stron internetowych Autorka prawidłowo podała datę dostępu, jednak formatowanie tego cytowania wymaga korekty.

Opis badań kończy się krótkim, rzeczowym podsumowaniem otrzymanych wyników zawartych w pracach oryginalnych oraz czterema adekwatnymi wnioskami.

Do wersji papierowej rozprawy doktorskiej załączono również kopie publikacji oraz oświadczeń współautorów wchodzących w skład dysertacji.

Drobną uwagą dotyczącą tej części rozprawy, jest to, że Doktorantka opisując własne badania *in vitro* stosuje termin „terapii skojarzonej” i „monoterapii” dla przedstawienia wyników z wykorzystaniem hodowli komórkowych inkubowanych z różnymi stężeniami badanych związków lub ich mieszaninami. W mojej opinii, użycie w tym przypadku stwierdzenia „terapia” jest nieco na wyrost i powinno być zarezerwowane do opisywania badań *in vivo* z udziałem zwierząt lub ludzi u których zastosowano konkretne schematy terapeutyczne.

Ocena merytoryczna recenzowanego cyklu publikacji

Pierwsza praca składająca się na recenzowany cykl, pt.: „Participation of the ATR/CHK1 pathway in replicative stress targeted therapy of high-grade ovarian cancer” jest pracą przeglądową opublikowaną w Journal of Hematology & Oncology (wydawnictwo BMC). Czasopismo posiada wysoki współczynnik oddziaływania IF (14,414), jak również znajduje się w pierwszym kwartylu czasopism (Q1) dla kategorii ONCOLOGY zarówno wg. JCR, jak i JCI – gwarantuje to wysoką wartość publikowanych tam prac oraz duży zasięg ich wpływu. Publikacja jest dość obszernym (16 stron) przeglądem literatury oraz badań z ostatnich lat dotyczących roli mechanizmów naprawy DNA w leczeniu raka jajnika. Opracowanie zostało przygotowane w oparciu o 121 pozycji piśmiennictwa. Praca jest napisana poprawnym językiem, zgodnie z zasadami tworzenia prac przeglądowych.

Pewien niedosyt budzi jednak brak metodologii tworzenia przeglądu. Uważam, że zamieszczenie rodzajów baz danych, które zostały poddane przeglądowi, zastosowanych kryteriów wyszukiwania i słów kluczowych podniosło by atrakcyjność i użyteczność tego opracowania. Jednak jest to moje subiektywne odczucie, jako czytelnika i nie umniejsza wysokiej wartości poznawczej i merytorycznej pracy.

Artykuł rozpoczyna krótki wstęp podający ogólne informacje na temat raka jajnika oraz standardowych metod jego terapii. Następnie opisano szlaki odpowiedzi na uszkodzenia DNA uczestniczące w rozpoznaniu i naprawie wszystkich typów zaburzeń struktury DNA. Ponieważ regulacja tych odpowiedzi komórkowych poprzez liczne inhibitory kinaz może prowadzić do zwiększenia niestabilności genomowej i w konsekwencji śmierci komórkowej. Tą część podsumowuje przejrzysty schemat przygotowany przez Autorów. Ponieważ stres replikacyjny i zaburzenia cyklu komórkowego mogą być potencjalnym celem w terapii raka jajnika w dalszej części pracy omówiono rolę białka PARP w naprawie DNA oraz uzasadniono stosowanie jego inhibitorów w nowotworach BRCAmut, co także zostało zilustrowane odpowiednimi schematami. W tabeli przedstawione zostały aktualne badania kliniczne, w których stosowane są opisywane w pracy związki. Następnie scharakteryzowano działanie kinaz ATR, CHK1 oraz ich znaczenie jako celów terapeutycznych w terapii raka jajnika. W kolejnym rozdziale skupiono się na potencjalnym synergizmie skojarzonego działania PARPi+ATRi oraz PARPi+CHK1i. Ostatni rozdział pracy przeglądowej opisuje nowe modele badawcze wykorzystywane do optymalizacji terapii raka jajnika w warunkach przedklinicznych. Praca wskazuje na znaczącą rolę szlaków naprawy DNA jako cel nowatorskich terapii. Autorzy wyraźnie podkreślili koncepcję umożliwiającą zwiększenie efektywności terapeutycznej olaparibu poprzez połączenie go z ATRi lub CHK1i, co może stanowić nowy schemat leczenia raka jajnika.

Podsumowując, recenzowana praca przeglądowa w sposób przystępny i wyczerpujący przedstawia aktualną wiedzę na temat roli mechanizmów naprawy DNA w leczeniu raka jajnika oraz potencjalnych nowych strategii leczenia tego nowotworu. Na podkreślenie zasługuje także fakt, że od czasu opublikowania praca została zacytowana 27 razy przez innych badaczy, co również potwierdza wysoką wartość poznawczą tego artykułu.

Kolejną pracę cyklu stanowi opracowanie oryginalne pt. „PARP inhibition increases the reliance on ATR/CHK1 checkpoint signaling leading to synthetic lethality- an alternative treatment strategy for epithelial ovarian cancer cells independent from HR effectiveness”, które zostało opublikowane w 2020 roku w *Int. J. Mol. Sci* (wydawnictwo mdpi). Jest to również wysoko punktowane (IF=5,924; 140 pkt. MEiN) czasopismo, które plasuje się odpowiednio w pierwszym (Q1 wg. ICR) lub drugim (Q2 CI) kwartylu czasopism w kategorii

BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, co również świadczy o istotnym wpływie publikowanych tu prac. Praca do czasu powstania recenzji została zacytowana 13 razy.

W niniejszym badaniu Doktorantka postawiła hipotezę badawczą mówiącą, że cytotoksyczne działanie inhibitora PARP można zwiększyć poprzez równoczesną inhibicję białek zaangażowanych w regulację punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Hipotezę weryfikowała stosując zróżnicowane metody badawcze, m.in. oceniono potencjał cyto- i genotoksyczny inhibitorów PARP, ATRi CHK1 w trzech liniach komórkowych raka jajnika; wyznaczono wartości IC_{50} dla pojedynczych związków, jak i w ich kombinacjach; oszacowano wartości współczynnika interakcji leków (CDI, ang. coefficient of drug interaction), co pozwoliło określić rodzaj oddziaływań stosowanych łącznie związków; wykonano test wzrostu klonalnego, który pozwala określić przeżywalność komórek na podstawie zdolności do tworzenia kolonii; zbadano poziom białka PARP1; oceniono uszkodzenia DNA testem kometowym w wersji alkalicznej (wykrywającej zarówno SSB jak i DSB) i neutralnej (wykrywającej bezpośrednio DSB). Metody te zostały w wyczerpujący sposób opisane w sekcji „Materials and Methods” artykułu. Z przeprowadzonego szeregu doświadczeń wynika, że stosowanie samego PARPi zwiększa ekspresję białek szlaku ATR/CHK1 w linii BRCAMUT, co może sugerować istnienie zależności skuteczności terapii olaparibem od sprawności tego szlaku. Ponadto wykazano, że traktowanie linii komórkowych w badaniach *in vitro* mieszaniną PARP+ATRi lub PARPi+CHK1i jest bardziej cytotoksyczne dla komórek raka jajnika niż pojedynczymi związkami w dawkach subletalnych po dłuższym czasie inkubacji (5 dni). Łączne stosowanie badanych związków działa synergistycznie cytotoksycznie na komórki raka jajnika, a najefektywniejszym połączeniem jest to, w którym stosunek molowy stężeń związków wynosi 1:1.4. Łączenie badanych związków indukuje wzrost poziomu uszkodzeń DNA, zaś kombinacja PARP+ATRi oraz PARPi+CHK1i jest cytotoksyczna i genotoksyczna dla komórek raka jajnika niezależnie od obecności mutacji genu BRCA.

Praca jest obszerna (20 stron; 64 pozycje piśmiennictwa, plus suplement), napisana w sposób zrozumiały a wyniki zostały przedstawione na zróżnicowanych wykresach, rycinach i zdjęciach. Przeprowadzona została merytoryczna dyskusja odnosząca się również do doświadczeń innych badaczy z zakresu różnych metod leczenia raka jajnika.

W drugiej pracy doświadczalnej, wchodzącej w skład cyklu, pt.: „The Influence of PARP, ATR, CHK1 Inhibitors on Premature Mitotic Entry and Genomic Instability in High-Grade Serous BRCAMUT and BRCAWT Ovarian Cancer Cells” celem badań było poznanie mechanizmu śmierci komórkowej indukowanej przez badane związki, w początkowej fazie odpowiedzi komórek na olaparib oraz inhibitory szlaku ATR/CHK. Artykuł został opublikowany w czasopiśmie Cells w 2022 roku (140 pkt MEiN; IF = 7,666).

Podobnie jak w poprzedniej pracy w badaniach została zastosowana bogata metodyka – oceniono wczesną cytotoksyczność związków (24 i 48 godzin) przy zwiększonych stężeniach; potwierdzono uszkodzające działanie związków na DNA także poprzez ocenę ekspresji markera uszkodzeń DNA (γ H2AX); zbadano właściwości proapoptotyczne poprzez oszacowanie liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą podwójnego barwienia (Hoechst 33258/jodek propidyny), zbadano eksternalizację fosfatydyloseryny (wczesnego markera związanego z procesem apoptozy), mierząc kondensację chromatyny oraz ekspresję aktywnej formy efektorowej kaspazy; zbadano także rozkład faz cyklu komórkowego, ze szczególnym uwzględnieniem odsetka komórek znajdujących się w fazie G2/M.

Otrzymane wyniki wykazały, że 48. godzinna inkubacja komórek raka jajnika z mieszaniną PARPi z ATRi/CHK1i nie jest bardziej cytotoksyczna w porównaniu do inkubacji komórek z każdym związkiem z osobna. Natomiast olaparib w krótkich czasach wykazał działanie cytostatyczne dla komórek raka jajnika, a nie jak w przypadku dłuższej inkubacji, dla której wykazywał działanie cytotoksyczne. Zarówno ATRi jak i CHK1i oraz ich kombinacje z olaparibem powodują wejście komórek raka jajnika w mitozę z uszkodzonym DNA, niezależnie od statusu BRCAMUT, prowadząc do akumulacji aberracji chromosomowych, niestabilności genomu i apoptozy.

Praca jest bardzo staranna z wręcz wzorową prezentacją wyników (różnego typu wykresy, histogramy zdjęcia mikroskopowe oraz schematy, co ze względu na liczbę zastosowanych metod i ich różnorodność było niewątpliwie dużym wyzwaniem. Dyskusja zawiera odniesienia do badań własnych i innych autorów. Podsumowanie wyników przeprowadzonych przez Doktorantkę badań jest prawidłowe i nie budzące zastrzeżeń.

Na uwagę zasługuje krytyczne podejście Doktorantki do własnych badań i określenie, że otrzymane wyniki *in vitro*, chociaż mogą mieć istotne znaczenie dla rozwoju

i badania nowych metod leczenia raka jajnika, powinny być zweryfikowane w badaniach *in vivo* dla wyjaśnienia wpływu PARPi:ATRi i PARPi:CHK1i na stabilność genomu i przeżycie komórek nowotworowych w organizmie, a także jak ten proces zależy od genetyki guza.

Uważam, że przedłożone do recenzji osiągnięcie mgr. inż. Patrycji Gralewskiej składające się z trzech opublikowanych w renomowanych czasopismach prac, wymagało znacznego nakładu pracy, opanowania warsztatu badawczego umożliwiającego prowadzenie doświadczeń z zastosowaniem różnych technik analitycznych oraz głębokiego poznania podstaw biochemicznych i molekularnych mechanizmów związanych z procesem nowotworzenia oraz możliwych metod ich modyfikacji, co może w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych terapii celowanych wykorzystywanych w leczeniu raka jajnika.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Reasumując, uważam, że recenzowana rozprawa doktorska składająca się z cyklu trzech publikacji mgr inż. Patrycji Gralewskiej spełnia wymogi 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 Kandydatki oraz 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. Patrycji Gralewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

Wniosek o wyróżnienie doktoratu

Jednocześnie, po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej, załączonych kopii publikacji stanowiących podstawę osiągnięcia oraz ocenie dołączonych do przesłanej dokumentacji dokonań naukowych Doktorantki **wnoszę do uprawnionych Członków Komisji ds. Stopni Naukowych o wyróżnienie recenzowanej pracy.**

Uzasadnienie:

Niniejsza rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy, posiada elementy nowości naukowej oraz potencjał do kontynuacji podjętej tematyki badawczej. Doktorantka ma swój wkład w budowanie wiedzy dotyczącej poszukiwania nowych, skutecznych terapii celowanych mogących mieć zastosowanie w leczeniu raka jajnika. Ponadto, Doktorantka - biorąc pod uwagę jej stosunkowo krótką karierę naukową - posiada bardzo dobry dorobek publikacyjny – jest współautorką 7 publikacji naukowych z lat 2019-2022, opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym, oraz współautorką licznych doniesień zjazdowych.

