



prof. dr hab. n. med. Joanna Jurewicz
Kierownik
Zakład Bezpieczeństwa Chemicznego
91-348 Łódź, ul. Św. Teresy 8
tel.: +48 42 63 14 702
e-mail: bezpieczenstwo.chemiczne@imp.lodz.pl

Łódź, dn. 05.02.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Marty Gralewskiej pt.:

**„Terapia celowana oparta na zwiększeniu wrażliwości komórek raka jajnika na olaparib
poprzez zastosowanie inhibitorów białek regulujących stres replikacyjny
wywołanych pęknięciami nici DNA”**

Promotor: dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki Narodowy

Promotor pomocniczy: dr Arkadiusz Gajek
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki Narodowy

TEMATYKA I ZAKRES ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawa doktorska Pani Patrycji Gralewskiej dotyczy tematyki terapii celowanej opartej na zwiększeniu wrażliwości komórek na olaparib poprzez zastosowanie inhibitorów białek regulujących stres replikacyjny wywołany pęknięciami nici DNA. Jest to bardzo ważne i aktualne zagadnienie z uwagi na to, że rak jajnika jest najgorzej rokującym nowotworem ginekologicznym, notującym najniższy poziom wskaźnika przeżycia 5-letniego. Wynika to przede wszystkim z trudności wczesnego rozpoznania choroby oraz niekorzystnej lokalizacji anatomicznej. Wykrycie raka jajnika we wczesnych stadiach, kiedy szanse na przeżycie pięcioletnie wynoszą aż 90%, nadal dotyczy niewielkiego odsetka pacjentek (20–30%), prawie w 70% przypadków nowotwór ten rozpoznaje się w wyższym stopniu zaawansowania (III i IV), w którym 5-letnie przeżycie obniża się do 25%. Przyczyny raka jajnika wciąż nie są dokładnie poznane. Za czynniki ryzyka uważa się wczesną pierwszą miesiączkę i późną menopauzę, bezdzietność, nieskuteczne stymulowanie owulacji u kobiet, które mają

problemy z zejściem w ciążę oraz niekarmienie piersią. Są to, więc czynniki związane z wydłużonym okresem pracy jajników.

Wysoka śmiertelność wymusza potrzebę poszukiwania nowych strategii leczenia.

Podjęcie tego rodzaju badań mających na celu poznanie potencjalnych korzyści terapeutycznych olaparib (PARPi) poprzez ocenę cytotoksycznego działania inhibitorów kinazy ATR (AZD6738, ATRi, ceralasertib) i CHK1 (MK8776, CHK1i) w skojarzeniu z inhibitorem PARPi (AZD2281, PARPi, olaparib) w trzech liniach komórkowych raka jajnika o zróżnicowanym profilu genetycznym uważam za niezwykle cenną inicjatywę badawczą, mogącą mieć istotne walory naukowo-poznawcze oraz jeszcze większą wartość praktyczną.

Wybór tematu rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Gralewskiej uważam za w pełni zasadny i wychodzący naprzeciw aktualnym problemom wynikającym z trudności w leczeniu raka jajnika.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska składa się ze spójnego tematycznie cyklu trzech prac: jedna praca przeglądowa i dwie prace oryginalne. Wszystkie prace zostały opublikowane w recenzowanych, anglojęzycznych czasopismach naukowych: Journal of Hematology & Oncology, International Journal of Molecular Sciences, Cells. We wszystkich trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, co oznacza, że jej wkład w wykonanie poszczególnych elementów pracy jest dominujący. Udział Doktorantki w przygotowaniu wszystkich publikacji został potwierdzony stosownymi oświadczeniami współautorów, zamieszczonymi na końcu pracy.

Cykl obejmuje trzy publikacje z IF, a łączna wartość cyklu to IF=28,004; 420 pkt. MNiSW.

Składowe cyklu

Publikacja przeglądowa

1. 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

Prezentowana publikacja dotyczy przeglądu najnowszych doniesień literaturowych związanych z tematyką pracy doktorskiej. Publikacja ta skupia się na wyjaśnieniu roli mechanizmów naprawy DNA w leczeniu raka jajnika. W pracy przeglądowej omówiono rolę

białka PARP w naprawie DNA oraz uzasadniono stosowanie jego inhibitorów w nowotworach BRCAMUT. Wymieniono także aktualne badania kliniczne, w których stosowane są wymienione w pracy inhibitory. Następnie przedstawiono działanie kinaz ATR, CHK1 oraz ich znaczenie jako celów terapeutycznych w terapii raka jajnika. Dodatkowo zawarto informacje o potencjalnym synergizmie skojarzonego działania PARPi+ATRi i PARPi+CHK1i oraz opisano nowe modele badawcze wykorzystywane do optymalizacji terapii raka jajnika w warunkach przedklinicznych. W pracy podkreślona została koncepcja umożliwiającą zwiększenie efektywności terapeutycznej olaparibu poprzez połączenie go z ATRi lub CHK1i.

Publikacje oryginalne

1. Gralewska P., Gajek A., Marczak M., Mikuła 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

W pracy oceniono potencjał cyto- i genotoksyczny inhibitorów PARP, ATR i CHK1 w trzech liniach komórkowych raka jajnika – SKOV-3, OV-90 i PEO-1. Ocena przeżywalności komórek po 5-dniowej inkubacji ze związkami pozwoliła wyznaczyć efektywne stężenia związków pod kątem ich cytotoksycznego działania w kombinacjach (PARPi+ATRi i PARPi+CHK1i) oraz określenia rodzaju oddziaływań między związkami.

Autorzy wykazali, że monoterapia PARPi zwiększyła ekspresję białek szlaku ATR/CHK1 w linii BRCAMUT, co może sugerować zależność skuteczności terapii olaparibem od sprawności tego szlaku; terapia skojarzona PARP+ATRi lub PARPi+CHK1i jest bardziej cytotoksyczna niż monoterapia w komórkach raka jajnika w dawkach subletalnych po dłuższym czasie inkubacji (5 dni); terapia skojarzona działa synergistycznie w komórkach raka jajnika, a najefektywniejszym połączeniem jest to, w którym stosunek molowy stężeń związków wynosi 1:1; terapia skojarzona indukuje wzrost poziomu uszkodzeń DNA; kombinacja PARP+ATRi oraz PARPi+CHK1i jest cytotoksyczna i genotoksyczna dla komórek raka jajnika niezależnie od obecności mutacji genu BRCA.

2. 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 BRCAMUT and BRCAWT Ovarian Cancer Cells. *Cells* 2022, 11, 1889. <https://doi.org/10.3390/cells11121889>; 140 pkt MEiN; IF = 7,666; IF 5-letni = 7,677

Drugi artykuł oryginalny dotyczy poznania mechanizmu śmierci komórkowej indukowanej przez badane związki, w początkowej fazie odpowiedzi komórek na olaparib oraz inhibitory szlaku ATR/CHK. W badaniu wykazano, że terapie skojarzone PARPi z ATRi/CHK1i nie są bardziej cytotoksyczne w porównaniu do odpowiednich monoterapii w badaniach prowadzonych do 48 godzin. Olaparib w krótkich czasach wykazuje działanie cytostatyczne w komórkach raka jajnika. Ponadto zaobserwowano, że 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.

Zestaw przedstawionych prac jest interesujący ze względu na ich uzupełniający się charakter w kontekście szerokiego przedstawienia tematu pracy doktorskiej. Dodatkowo w pracy opisano jeszcze nie opublikowane badania, które stanowią ostatni etap prac nad oceną skuteczności nowych czynników terapeutycznych w leczeniu raka jajnika.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania w ramach pracy doktorskiej były możliwe dzięki grantowi uzyskanemu z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu SONATA BIS 9 nr 2019/34/E/NZ7/00056 pt. „Wykorzystanie olaparibu i inhibitorów kinazy ATR/CHK1 jako celowanej terapii przeciwnowotworowej opartej na syntetycznej letalności”, którego kierownikiem jest Promotor pracy.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk biologicznych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne składa się z opisu pracy doktorskiej podzielonego na następujące sekcje: Spis treści, Źródło finansowania, Dorobek naukowy Doktorantki (publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz pozostały dorobek naukowy), Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiał i metody badawcze, Omówienie wyników (zawierający szczegółowy opis każdej z publikacji oraz wniosków z badania), Podsumowanie uzyskanych wyników oraz wnioski i Piśmiennictwo. Praca zawiera ponadto kopie publikacji stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

We wprowadzeniu, które poprzedza spis skrótów Autorka szczegółowo przedstawiła teoretyczne podstawy zagadnień, którymi zajęła się w swojej pracy badawczej. Wstęp stanowi szczegółowe i rzetelne omówienie poruszanych zagadnień, w oparciu o szeroką i aktualną literaturę i pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problemami, na których Doktorantka skupia się w swojej pracy badawczej. Wstęp w sposób ciekawy wprowadza

w zagadnienia pracy. Jedyna uwaga dotyczy tego, że we wprowadzeniu Doktorantka napisała, że "rak jajnika jest najczęstszą przyczyną śmierci spośród nowotworów ginekologicznych" jest to niewątpliwie prawda. Jednak to zdanie wymaga doprecyzowania. Czy zdanie dotyczy tylko Polski? Według danych z Krajowego Rejestru Nowotworów wynika, że z roku na rok liczba zgonów z powodu tego rodzaju nowotworu systematycznie spada (2018 r. – 6,1%; 2019 r. – 6,0%; 2020 r. – 5,9%). Oczywiście nie jest to gwałtowny spadek, ale należałoby taką informację we wstępie wprowadzić. Również słowo „śmierć” powinno być zastąpione wyrazem „zgony”. Umieralność, a śmiertelność to dwa odrębne pojęcia, które nie mogą być wymiennie stosowane. Niewątpliwie tutaj aby zobrazować problem raka jajnika powinniśmy skupić się na śmiertelności, czyli ile osób umiera na 100 chorych na ten nowotwór. Informacja o śmiertelności została zamieszczona w streszczeniu, ale bez podania odpowiedniego piśmiennictwa, które w przypadku danych statystycznych są istotne. Poza tym we Wstępie brakuje opisu co może być przyczyną raka jajnika, a dopiero następnie skupienie się na opisywanym temacie stanowiącego postawę rozprawy doktorskiej.

Aktualne dane literaturowe, na które powołuje się Doktorantka we Wprowadzeniu stały się przesłanką do podjęcia badań dotyczących oceny 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. Główne oraz szczegółowe cele pracy zostały opisane w sposób prawidłowy i precyzyjny.

W rozdziale „Materiał i metody badawcze” Doktorantka opisuje jakich metod użyła, aby odpowiedzieć na zadane w pracy pytania badawcze i zrealizować zakładane cele pracy. Doktorantka przedstawia metodykę badań: materiał badawczy stanowiący trzy linie komórkowe raka jajnika, informacje o badanych związkach oraz zastosowanych metodach badawczych. Materiał i metody badawcze zostały przedstawione w sposób bardzo skrótowy (właściwie jednozdaniowy) moim zdaniem powinny być one opisane bardziej szczegółowo. Rozumiem, że praca stanowi zbiór publikacji, gdzie te elementy tam się znalazły, niemniej jednak opisując prace powinniśmy szczegółowo przedstawić wszystkie jej elementy, zwłaszcza metody badawcze, które są kluczowe do oceny pracy. Informacja na temat przeprowadzenia analizy statystycznej wyników niewiele wnosi bez opisu.

W rozdziale „Omówienie wyników” Doktorantka omówiła szczegółowo wyniki poszczególnych kolejnych etapów pracy badawczej. Przedstawione zostały wyniki zaprezentowane w cyklu publikacyjnym. Wyniki zostały dobrze udokumentowane i poprawnie zaprezentowane. Wysoko oceniam kompleksowe podejście do tematu oraz unikalny i bardzo cenny aspekt z punktu widzenia dalszego rozwoju terapii w raku jajnika.

W opisie przeprowadzonych badań brakuje porównania ich z innymi tego typu badaniami, oprócz opisu publikacji powinna się znaleźć również Dyskusja w prezentowanej pracy.

Kolejny rozdział dotyczy „Podsumowania uzyskanych wyników i wnioski”. Wnioski zostały przedstawione w sposób precyzyjny i wynikają z przeprowadzonych badań. Jedynie czego mi brakuje to wniosków z pracy, które mogłyby mieć bezpośrednie przełożenie na aspekty szeroko rozumianego zdrowia publicznego i potencjalnych korzyści dla populacji, przecież stanowi to główny element pracy – jak poprawić leczenie. Zalecenia odnośnie wykorzystania wyników również powinny zostać przedstawione. Zabrakło przedstawienia mocnych stron i ograniczeń badania. Brak jest informacji o elementach nowotarskich w pracy, które niewątpliwie istnieją, jednak powinny być opisane z uwagi na to, że tego rodzaju prace lub z podobnego zakresu tematycznego zostały wcześniej już przeprowadzone, a PARPi stanowi już znany element w leczeniu raka jajnika.

Autorka powołuje się na 64 pozycje literaturowe. Jest to aktualna literatura (w większości opublikowana w ostatnich 10 latach) i dotyczy poruszanych zagadnień. Lista publikacji dowodzi znajomości przez Doktorantkę literatury przedmiotu oraz umiejętności krytycznej oceny źródeł.

PODSUMOWANIE

Doktorantka wykazała bardzo dobre przygotowanie, znajomość piśmiennictwa dotyczącego omawianego zagadnienia oraz umiejętność samodzielnej analizy danych. Ogólna redakcja pracy, sposób wykorzystania źródeł i opis przeprowadzonych badań oraz otrzymanych rezultatów nie budzą zastrzeżeń. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Największym osiągnięciem pracy jest jej wartość praktyczna, dotycząca nowych możliwości w leczeniu raka jajnika.

Rozprawę mgr Patrycji Gralewskiej oceniam wysoko. O jakości publikacji wchodzących w skład cyklu świadczy opublikowanie ich w renomowanych, recenzowanych czasopismach naukowych z wysokim wskaźnikiem IF. Doktorantka sprawnie posługuje się terminologią naukową oraz wykorzystuje dane z piśmiennictwa. Praca dowodzi wysokich kompetencji Doktorantki oraz dobrego przygotowania. Doktorantka wykazała umiejętność realizacji pracy naukowo-badawczej: sformułowała precyzyjne i ambitne cele pracy, zastosowała właściwe metody umożliwiające ich realizację oraz wykazała umiejętność wszechstronnej analizy uzyskanych wyników i właściwego wnioskowania.

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Patrycji Gralewskiej w pełni odpowiada wymogom Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) stawianym pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Patrycji Gralewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jana Jemle'.

