

Rzeszów 27 października 2022 r.

**Ocena dorobku naukowego mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych**

Wstęp

Mgr Katarzyna Bazydło-Guzenda zaczęła studia w Uniwersytecie Warszawskim na kierunku Biotechnologia w 2004 r. Tytuł licencjata uzyskała roku 2007 r., a tytuł magistra w 2009 r. W roku 2017 rozpoczęła studia podyplomowe w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Karierę zawodową związała z firmą badawczo-rozwojową Celon Pharma S.A., w której przechodziła kolejne szczeble awansu zawodowego zostając w 2020 r. liderem działu rozwoju klinicznego. Główną dziedziną jej zainteresowań badawczych są drobnocząsteczkowi agoniści receptora GPR40, które mogą potencjalnie stać się nowymi lekami do zastosowania w leczeniu cukrzycy typu 2. Owocem prac badawczych zespołu, którego członkiem jest kandydatka do tytułu dr n. med., mgr Katarzyna Bazydło-Guzenda, są trzy publikacje. W dwóch przypadkach mgr Katarzyna Bazydło-Guzenda jest pierwszym, a w jednym przypadku drugim autorem. Cykl tych trzech prac oryginalnych stał się podstawą postępowania o nadanie tytułu doktora nauk medycznych.

I. Ocena merytoryczna pracy

Cykl prac „Rozwój innowacyjnych agonistów GPR40 jako potencjalnych leków w terapii cukrzycy typu 2”, dwóch z których mgr Katarzyna Bazydło-Guzenda była pierwszym autorem, będący podstawą postępowania o nadanie tytułu doktora nauk medycznych, stanowi spójną całość tematyczną. Tematem tych prac jest historia rozwoju cząsteczki CPL207280, agonisty receptora GPR40/FFA1, od jej odkrycia, poprzez badania efektywności *in vitro* i *in vivo* na zwierzętach, aż po badania bezpieczeństwa, a w szczególności hepatotoksyczności, na modelu zwierzęcym.

Tematem pierwszej z przedstawionych prac, której kandydatka do tytułu doktora nauk medycznych była drugim autorem, było przedstawienie historii odkrycia i rozwoju cząsteczki CPL207280 jako potencjalnego leku do zastosowania w terapii cukrzycy typu 2. Cząsteczka ta wiąże się z receptorem dla wolnych kwasów tłuszczowych GPR40/FFA1, który jest obecny na powierzchni komórek β wysp Langerhansa trzustki. Jego aktywacja stymuluje zależną od

glukozy sekrecję insuliny. Częsteczką referencyjną w tych badaniach był związek TAK-875, badany we wcześniejszych latach przez firmę Takeda. Badania te zostały jednak przerwane ze względu na istotną hepatotoksyczność tej cząsteczki. Związek CPL207280, jak też pozostałe trzy cząsteczki porównywane z TAK-875, zostały przebadane *in vivo* na modelu zwierzęcym (szczury WT – *wild type*) dla oceny ich farmakokinetyki. Wszystkie badane związki szybciej osiągały T_{max} , w którym uzyskiwały podobne C_{max} , miały też krótszy czas półtrwania, który może okazać się zaletą, biorąc pod uwagę dane z badań klinicznych dla TAK-875, w których długi $T_{1/2}$ mógł być jedną z przyczyn akumulacji w wątrobie, co ostatecznie mogło prowadzić do uszkodzenia hepatocytów. Zdolność analizowanych związków do stymulacji wydzielania insuliny, w porównaniu ze związkami referencyjnymi, oceniano w teście obciążenia glukozą u szczurów WT. Wszystkie badane cząsteczki silnie indukowały zależną od glukozy sekrecję insuliny, a w przypadku związku CPL207280 jednokrotne podanie okazało się wystarczające do redukcji glikemii nie tylko bezpośrednio po podaniu, ale także po 6 godzinach. W oparciu o analizę tych badań, przy wzięciu pod uwagę równowagi pomiędzy właściwościami farmakokinetycznymi i fizykochemicznymi oraz aktywnością badanych cząsteczek, związek CPL207280 został wytypowany jako struktura wiodąca do dalszych badań efektywności oraz bezpieczeństwa.

Druga z prac, w której mgr Katarzyna Bazydło-Guzenda jest pierwszym autorem, była poświęcona analizie efektywności i profilu bezpieczeństwa związku CPL207280. Aktywność i selektywność tego związku oceniano metodą *in vitro*. Nie wykazano przy tym interakcji z różnymi niespecyficznymi białkami, które mogłyby wpłynąć na niepowodzenie rozwoju leku. Nie stwierdzono też cytotoksycznego wpływu CPL207280 na badane komórki. W badaniach *in vivo*, zarówno u zwierząt zdrowych jak też u różnych szczepów zwierząt cukrzycowych, wykazano efekt hipoglikemizujący wynikający ze stymulacji wydzielania insuliny, przy czym nie obserwowano hipoglikemii nawet w wysokich dawkach, co potwierdziło, że CPL207280 jest dobrym kandydatem na nowy hipoglikemizujący lek, który może potencjalnie być użyty w celu leczenia pacjentów z cukrzycą typu 2.

Trzecia praca w cyklu została poświęcona analizie bezpieczeństwa badanej cząsteczki, którą przeprowadzono zarówno w badaniach *in vitro*, jak też *in vivo* na modelu zwierzęcym (szczury i małpy). Ten drugi gatunek został wybrany ze względu na to, że profil metaboliczny CPL207280 uzyskany w hepatocytach ludzkich był najbardziej zbliżony do profilu, który uzyskano u małp, co było podstawą wyboru małp, oprócz szczurów, jako drugiego gatunku w badaniach toksykologicznych. W badaniach *in vivo* zarówno pojedyncze jak i wielokrotne

podanie CPL207280 szczurom i małpom potwierdziło szybki metabolizm związku (krótki $T_{1/2}$) i wysoki klirens oraz wykazały brak jego akumulacji w organizmie po 14 dniach podawania. Aktywność enzymów wątrobowych: ALT, AST, fosfatazy alkalicznej i poziom całkowitych kwasów żółciowych (TBA, total bile acids) nie zmieniły się u zwierząt otrzymujących badany związek przez 56 dni, nawet w najwyższych dawkach (małpa 250 mg/kg, szczur 600 mg/kg), co świadczy o dużym marginesie bezpieczeństwa wątrobowego badanej cząsteczki.

Trafność problematyki badawczej i jej oryginalność

Cukrzyca, zwłaszcza typu 2, stała się w ostatnich dekadach olbrzymim i narastającym problemem epidemiologicznym (wg WHO jest to pierwsza epidemia choroby niezakaźnej), a także wciąż rosnącym obciążeniem dla budżetów ochrony zdrowia. Pomimo, że portfolio leków przeciwcukrzycowych wciąż się poszerza (szczególnie ostatnie lata przyniosły szereg zmian w tym zakresie), to wciąż istnieje potrzeba poszukiwania nowych cząsteczek, które w sposób jak najbardziej zbliżony do fizjologii stymulowałyby produkcję endogennej insuliny w odpowiedzi na bodziec glikemiczny, a jednocześnie nie zwiększałyby znacząco ryzyka hipoglikemii.

Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Wyniki uzyskane w przedstawionych pracach wykazały, że CPL207280 jest dobrym kandydatem do dalszego rozwoju – efektywnie, w sposób zależny od dawki obniża glikemię, nie wykazuje przy tym efektów cyto- ani hepatotoksycznych.

W pierwszej z wymienionych prac, oprócz przedstawienia historii wyboru i rozwoju cząsteczki CPL207280 wykazano, że u szczurów Wistar w teście obciążenia glukozą związek ten efektywniej hamuje przyrost glikemii niż TAK-875, czy inhibitor dipeptydylopeptydazy-4 (DPP-4) – sitagliptyna, która jest obecna na rynku od 2006 r. (CPL207280 charakteryzował się najmniejszym polem pod krzywą glikemii w czasie 9 h (jak też w dwóch przedziałach: 0-6 i 6-9 h), oraz najwyższym przyrostem insulinemii w ciągu pierwszych 3 godzin. Świadomie przytaczam w tym miejscu badanie porównawcze CPL207280 z sitagliptyną, gdyż jest to lek działający w nieco zbliżonym, zależnym od insuliny mechanizmie, stosowany od wielu lat, w związku z czym wydaje się być najodpowiedniejszym komparatorem dla badanego związku.

W drugiej pracy podanie CPL207280 u szczurów Zucker diabetic Sprague-Dawley wiązało się z lepszym efektem w zakresie glikemii (ocenianej wielkością pola pod krzywą) w

porównaniu z glibenklamidem (jednej z najstarszych pochodnych sulfonylomocznika). Co ciekawe, efekt ten uzyskano pomimo porównywalnego pola pod krzywą insulinemii (co może przemawiać za pewnym efektem pozatrzustkowym cząsteczki CPL207280).

Trzecia z prac wchodzących w skład cyklu jest wartościowym uzupełnieniem dwóch poprzednich, gdyż ocenia cząsteczkę CPL207280 w aspekcie jej bezpieczeństwa dla wątroby. Z uwagi na to, że najbardziej zaawansowany agonista receptora GPR40, TAK-875 wykazał się hepatotoksycznością w badaniach III fazy, głównym pytaniem badawczym było to, czy efekt ten jest typowy dla wszystkich agonistów receptora GPR40, czy też jest różny dla różnych agonistów. Badania *in vitro* oceniające wpływ na wątrobowy transporter żółciowy, funkcję mitochondriów i profilowanie metaboliczne przeprowadzono na hepatocytach różnych gatunków. Toksyczność długoterminową CPL207280 badano *in vivo* na szczurach i małpach. Aktywność CPL207280 w hamowaniu transporterów kwasów żółciowych była o jeden rząd wielkości mniejsza niż TAK-875. CPL207280 miał też znikomy wpływ na mitochondria w wątrobie. W odróżnieniu od TAK-875, który był metabolizowany poprzez toksyczne glukuronidowanie, CPL207280 był metabolizowany głównie poprzez utlenianie. U przewlekle leczonych zwierząt, zarówno zdrowych, jak również chorujących na cukrzycę, nie zaobserwowano szkodliwego wpływu badanej cząsteczki na wątrobę. Przemawia to za tym, że uszkodzenie wątroby nie jest cechą charakterystyczną dla wszystkich agonistów GPR40, ale wiąże się z wewnętrznymi właściwościami indywidualnej cząsteczki.

Podsumowując, przedstawione wyniki badań cząsteczki CPL207280 wskazują, że jest ona dobrym potencjalnym kandydatem do dalszych badań jej skuteczności, bezpieczeństwa i tolerancji już w dedykowanej populacji osób chorujących na cukrzycę typu 2. Ze względu na efekt insulinotropowy w odpowiedzi na bodziec glikemiczny, trochę zbliżony do inhibitorów DPP-4 (aczkolwiek CPL207280 był efektywniejszy od sitagliptyny – przedstawiciela tej klasy leków) agoniści receptora GPR40 mogą znaleźć swoje miejsce w terapii cukrzycy. Z tego punktu widzenia, wyniki przedstawione w tej rozprawie przez kandydatkę do tytułu doktora nauk medycznych, mgr Katarzynę Bazydło-Guzendę są bardzo wartościowe, mają duże znaczenie dla nauki, a być może także dla przyszłej praktyki lekarskiej.

Rozprawa doktorska jest napisana poprawnym językiem, bez błędów stylistycznych, czy interpunkcyjnych, obecne są jedynie drobne, nieistotne błędy literowe, ale pod wszystkimi innymi względami formalnymi napisana jest bardzo dobrze, w związku z tym nie mam żadnych istotnych zastrzeżeń do strony formalno-lingwistycznej pracy.

II. Ocena metodologiczna pracy

Jak napisałem we wstępie, prace będące podstawą postępowania o nadanie tytułu doktora nauk medycznych tworzą spójną całość prezentując kolejne etapy badań począwszy od identyfikacji odpowiedniej cząsteczki, poprzez kolejne etapy jej rozwoju w badaniach przedklinicznych, aż po ocenę jej efektywności i braku istotnej toksyczności. Wykaz tych prac jest umieszczony na stronie 4 rozprawy. Ich łączny impact factor (IF) wynosi 14,190, a ilość punktów MEiN 380. Procentowy wkład pracy kandydatki do tytułu doktora nauk medycznych wyniósł odpowiednio 10%, 50% i 50%.

Po wykazie prac stanowiących cykl publikacji umieszczony jest wykaz skrótów (strony 7-9) oraz streszczenia w języku polskim (strona 10) i angielskim (strona 11).

Rozdział I stanowi wprowadzenie w tematykę Rozprawy. Pierwszy podrozdział jest zwięzłym opisem etiologii i patofizjologii cukrzycy. Znalazło się w tej części kilka drobnych nieścisłości, które mogą wynikać przede wszystkim z braku doświadczenia lekarskiego i *stricte* klinicznej wiedzy Kandydatki. Niemniej nie są one na tyle istotne, aby rzutowały na ogólnie bardzo wysoką jakość Rozprawy. Drugi podrozdział poświęcony jest opisowi receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) dla wolnych kwasów tłuszczowych. Podrozdział trzeci odnosi się już do receptora będącego przedmiotem badań – receptora 1 dla wolnych kwasów tłuszczowych (FFAR1/GPR40). Kandydatka opisuje w nim różne związki będące ligandami tego receptora, szlaki postreceptorowe aktywowane po związaniu się liganda z receptorem oraz przedstawia graficznie mechanizm glukozozależnej sekrecji insuliny po aktywacji receptora GPR40 przy udziale bramkowanych napięciem kanałów wapniowych. W dalszej części omawia szczegółowo w jaki sposób zweryfikowano rolę receptora GPR40 w regulacji stężenia glukozy u zwierząt i drogę rozwoju badań nad drobnocząsteczkowymi związkami, które mogłyby pełnić rolę aktywatora receptora GPR40. Omawia przy tym najbardziej zaawansowany w badaniach związek TAK-875, który dotarł do III fazy badań klinicznych, jednak – ze względu na stwierdzoną jego hepatotoksyczność – dalsze prace badawcze nad tą cząsteczką zostały wstrzymane. Czwarty podrozdział poświęcony jest nowemu związkowi, CPL207280. Kandydatka przedstawia w nim historię identyfikacji kilku agonistów receptora GPR40, selekcji cząsteczki o największym potencjale rozwojowym, badań *in vitro* i *in vivo* nad tą cząsteczką włącznie z uzasadnieniem doboru odpowiedniej metodologii badawczej na poszczególnych etapach rozwoju cząsteczki.

Rozdział 2. zwięźle prezentuje założenia i cel pracy, którym było wyselekcjonowanie efektywnego, małowiązącego agonisty receptora GPR40, który można by wykorzystać do dalszego rozwoju jako innowacyjnego leku do stosowania w leczeniu chorych cierpiących na cukrzycę typu 2.

W Rozdziale 3. przedstawiona jest ogólna metodologia pracy, używane odczynniki, metodologia badań *in vitro* i *in vivo* oraz analizy statystycznej. Szczegółowe informacje są przedstawione w poszczególnych publikacjach.

Rozdział 4. Zaczyna się od szczegółowego opisu testów przesiewowych biblioteki związków z wykorzystaniem komórek z nadekspresją receptora GPR40, co doprowadziło do identyfikacji cząsteczek charakteryzujących się zblizoną lub większą aktywnością względem tego receptora w porównaniu ze związkiem referencyjnym – TAK-875. Metodologia, jak też uzyskane wyniki zaprezentowane są opisowo, jak też w formie rycin i tabeli. Kolejne podrozdziały zawierają omówienie poszczególnych prac składających się na cykl publikacji.

Rozdział 5. jest podsumowaniem założeń procesu badawczego agonistów receptora GPR40, identyfikacji cząsteczki CPL207280 jako kandydata do dalszych badań, uzyskanych wyników, zarówno w zakresie efektywności, jak też bezpieczeństwa i dalszych perspektyw rozwoju – zakończone zostało z sukcesem badanie pierwszej fazy na zdrowych ochotnikach zarówno po jednokrotnym jak i wielokrotnym podaniu CPL207280 (identyfikator w bazie badań klinicznych: NCT04622111), trwa też obecnie badanie II fazy na pacjentach z cukrzycą typu 2 (NCT05248776), które pozwoli na wstępną ocenę efektywności jak też tolerancji leku w docelowej grupie pacjentów.

Rozdział 6. zawiera wnioski podsumowujące uzyskane wyniki. Są one sformułowane zwięźle, zrozumiale i są zgodne z wynikami przedstawionych opublikowanych prac będących składowymi cyklu, jak też danych niepublikowanych, a przedstawionych w Rozprawie.

Kolejne rozdziały zawierają: wykaz literatury odnoszącej się do tematyki cyklu prac (60 pozycji) oraz spis załączników, którymi są przedstawione na kolejnych stronach kopie artykułów wchodzących w skład cyklu prac. Do dokumentacji dołączone są też pisemne oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie w poszczególne publikacje.

Podsumowując, układ pracy i struktura podziału treści są prawidłowe, sformułowane cele badawcze, dobór metod i narzędzi badawczych, jak też ich zastosowanie nie budzi

zastrzeżeń, wyniki są przedstawione i omówione w sposób logiczny i spójny, i podsumowane są wnioskami zgodnymi z uzyskanymi wynikami.

III. Ocena dorobku

Mgr Katarzyna Bazydło-Guzenda wykazuje się dużą dociekliwością i aktywnością badawczą. Jej głównym polem zainteresowań jest identyfikacja nowych, potencjalnych leków do zastosowania w terapii cukrzycy typu 2, opartych na agonizmie do receptora GPR40. Trzy prace opublikowane w oparciu o badania nad nową cząsteczką CPL207280 są bardzo interesującym wkładem w naukę w tej dziedzinie, a łączny IF 14,190 i punktacja MEiN 380 są najlepszą rekomendacją wartości naukowej.

Ponieważ Kandydatka do tytułu doktora nauk medycznych jest wciąż zaangażowana w prace badawcze, należy spodziewać się w przewidywalnej przyszłości kolejnych publikacji związanych z tymi badaniami, zapewne – podobnie jak dotychczasowe – opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych.

IV. Wniosek końcowy

Wartość naukową Rozprawy na stopień doktora n. med. i n o zdr. mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy oceniam bardzo wysoko, ponieważ wszystkie prace nie budzą wątpliwości co do ich wartości naukowej o czym świadczą między innymi czasopisma, w których te prace opublikowano, jak też ich łączny IF 14,190 i punktacja MEiN 380 pkt.

Doktorantka wykazała się przy tym wysokimi umiejętnościami w prezentacji tematyki Rozprawy. W sposób jasny i precyzyjny nakreśliła tło, zakres tematyczny, hipotezy badawcze i cele przeprowadzonych badań. Prawidłowo też przeprowadziła omówienie ich wyników w nawiązaniu do innych pozycji piśmiennictwa, podsumowując swoje prace i uzyskane wyniki krytyczną ich analizą.

W podsumowaniu stwierdzam, że **Rozprawa doktorska** pt: „Rozwój innowacyjnych agonistów GPR40 jako potencjalnych leków w terapii cukrzycy typu 2” **spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)**. Doktorantka opanowała metody badawcze wykorzystane w przedstawionych pracach i wykazała, że posiada wiedzę teoretyczną i specjalistyczną w wymaganym zakresie, a praca stanowi oryginalne podejście do problemu naukowego. W

związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Doceniając bardzo wysoką jakość przedstawionej Rozprawy oraz jej innowacyjność (prace nad nową cząsteczką mogącą mieć zastosowanie w terapii cukrzycy typu 2, działającą w odmiennym mechanizmie niż dotychczas stosowane leki) wnioskuję jednocześnie o jej wyróżnienie.

Dr hab. n. med. lek. Mariusz Dąbrowski

profesor UR

Specjalista chorób wewnętrznych i diabetologii

Nr PIWZ 2282228 tel. +48 604 211 824

Dr hab. n. med. Mariusz Dąbrowski, prof. UR