

Wrocław, 10.06.2023

prof. dr hab. Rafał Bartoszewski

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Jessici Catapano

pt. „Wpływ nabytej lekooporności na wrażliwość komórek raka prostaty na działanie blokerów metabolicznych”

Ekspotencjalny rozwój nauk medycznych i opieki zdrowotnej znacząco wydłużył czas naszego życia, jednocześnie powiększając grupę pacjentów cierpiących na schorzenia wieku starczego takie jak cukrzyca typu drugiego, choroby miażdżycowe, neurodegeneracyjne oraz nowotwory. Nie można tym samym zlekceważyć znaczenia społeczno-ekonomicznego opracowania właściwych strategii terapeutycznych dedykowanych starzejącemu się społeczeństwu, których zadaniem będzie przedłużenie długości życia przy jednoczesnym zachowaniu jego jakości, w stopniu umożliwiającym zarówno aktywność społeczną jak i zawodową. To wyzwanie badawcze jest tym trudniejsze, że procesy starzenia, negatywny wpływ środowiska oraz nawyki cywilizacyjne deregulują homeostazę organizmu jako takiego, co prowadzi do równoległego rozwoju wielu jednostek chorobowych. Innymi słowy, skuteczne rozwiązania terapeutyczne dla poszczególnych schorzeń, w przypadku ich współwystępowania nie gwarantują powodzenia leczenia, a w sytuacjach skrajnych mogą zagrażać życiu pacjentów. Rodzi to potrzebę holistycznego zrozumienia zarówno mechanizmów molekularnych determinujących rozwój schorzeń współlistniejących jak i modulacji ich przebiegu przez stosowane terapie. Zdefiniowanie sieci wzajemnych oddziaływań między poszczególnymi aspektami patogenezy i terapii dla schorzeń współlistniejących stanowi więc ogromne wyzwanie dla współczesnych nauk biomedycznych, a jednocześnie jedyną drogę do efektywnego planowania bezpieczniejszych spersonalizowanych ścieżek terapeutycznych dla starzejącego się społeczeństwa. Dodatkowo, ewentualne racjonalne repozycjonowanie



leków wykorzystywanych w leczeniu tej grupy schorzeń, może prowadzić do implementacji skutecznych i relatywnie ekonomicznych terapii skojarzonych dedykowanych współistniejącym jednostkom chorobowym.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Jessici Catapano wykonana pod kierunkiem profesora Jarosława Czyża **skutecznie** podejmuje tematykę wyżej zarysowanego problemu.

Badania zebrane w rozprawie doktorskiej miały bowiem za cel zrozumienie jak najpowszechniej przepisywany terapeutyk na cukrzycę typu 2, metformina (będąca inhibitorem dehydrogenazy NADH), może wpłynąć na przebieg dość przyjętej chemioterapii raka prostaty z wykorzystaniem docetakselu. W świetle badań opublikowanych w 2005 roku (*Evans et al. MJ. 2005; 330:1304–1305*), które sugerowały obniżone ryzyko wystąpienia nowotworów u cukrzyków przyjmujących metforminę, jak i wysokiego prawdopodobieństwa współwystąpienia cukrzycy typu drugiego i raka prostaty, **tematyka rozprawy jest niezwykle aktualna**. Ponadto, mimo licznych kontrowersji związanych z prewencyjną rolą metforminy w kontekście ryzyka nowotworzenia wykazano, że zwiększa ona skuteczność radioterapii i chemioterapii z wykorzystaniem cisplatyny, paksitacelu czy doxorubicyny, w niektórych typach nowotworów, podczas gdy w innych (np. neuroblastoma czy białaczki) antagonizuje działanie chemioterapeutyków. Uniemożliwia to generalizację wniosków i wymusza konieczność charakterystyki tego leku pod kątem konkretnego typu nowotworu, co było przedmiotem badań rozprawy. Kandydatka postawiła bowiem hipotezę, że obecność metforminy podczas ekspozycji lekoopornych komórek raka prostaty na cytostatyk, zmieni ich wrażliwość na ten terapeutyk. Co warte podkreślenia, model badawczy poszerzono również o inny lek modyfikujący metabolizm komórkowy, fenofibrat.

Do recenzji dostarczono rozprawę doktorską liczącą 118 stron łącznie z wykazem piśmiennictwa. Przedstawiona praca zawiera wszystkie wymagane części i składa się z 5 głównych rozdziałów: wstępu teoretycznego, omówienia hipotezy i celów badawczych, przedstawienia warsztatu badacza (materiały i metody), wyników oraz dyskusji. W rozprawie ujęto



również podsumowanie aktywności naukowej Autorki, źródeł finansowania oraz listy skrótów i wykorzystanego piśmiennictwa.

Wstęp rozprawy obejmuje 18 stron a przytaczane i omówione tym rozdziale dane całkowicie uzasadniają aktualność podjętego tematu i założeń pracy doktorskiej. Doktorantka rozpoczyna ten rozdział od omówienia problematyki rozwoju nowotworów. Następnie, konsekwentnie ukierunkowuje czytelnika na problem heterogenności metabolicznej komórek nowotworowych, aby dokładnie omówić efekt Warburga i symbiozę metaboliczną. Dążąc do zdefiniowania właściwego pytania badawczego Autorka rzetelnie dyskutuje obecny stan wiedzy na temat epidemiologii, przebiegu, diagnostyki i terapii raka prostaty, jak i mechanizmów determinujących oporność wielolekową. Ostatnia część wstępu przybliża metaboliczne terapie skojarzone i szczegółowo omawia mechanizmy działania i zastosowania metforminy. Podsumowując, omawiany rozdział **rzetelnie i syntetycznie przedstawia problematykę badawczą rozprawy**, a Autorka sprostała trudnemu wyzwaniu doboru właściwych dla jej rozprawy informacji i przedstawieniu ich w sposób wyważony i ukierunkowany, co stanowi bardzo dobre wprowadzenie do omówienia i dyskusji uzyskanych rezultatów. Również wykorzystanie rozważnie dobranych i aktualnych. 229 pozycji piśmiennictwa, wskazuje na bardzo **dobre przygotowanie Doktorantki** i zrozumienie podjętej tematyki badawczej.

Rozdział Materiały i metody **rzetelnie** definiuje wykorzystany warsztat badawczy z zakresu technik hodowli komórkowych oraz bezpośrednich i pośrednich pomiarów metabolizmu komórek, co dostarcza wymaganych informacji umożliwiających niezależną weryfikację uzyskanych wyników.

Konsekwencją tego wyczerpującego omówienia tematyki badawczej i przedstawienia metodyki jest zdefiniowanie przez Autorkę założeń rozprawy, a więc hipotezy i szczegółowych celów badawczych, a następnie omówienie rezultatów stanowiących podstawę postępowania



w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora. Przedstawiając rezultaty swoich badań **Au-
torka weryfikuje hipotezę badawczą w kontekście uzyskanych wyników eksperymental-
nych oraz ich znaczenia dla chemioterapii raka prostaty.**

Kandydatka wykorzystując uzyskane dane eksperymentalne zaproponowała model ba-
dawczy, w którym za optymalne do analiz w warunkach hodowli komórkowej linii raka pro-
staty uznano stężenia 10 mM i 2,5 nM odpowiednio dla metforminy (MET) i doksetacelu
(DCX). Nasuwa się tu pytanie na ile dobór wspomnianych stężeń odzwierciedla biodostępność
wspomnianych terapeutyków u pacjentów (np. maksymalne stężenie metforminy w płazmie
pacjentów przyjmujących ten lek doustnie w wysokiej dawce tzn. 2,5 g/dzień to jedynie
18μM)? Bardzo bym prosił tu Kandydatkę o komentarz i ustosunkowanie się do powyższej
uwagi.

Autorka w oparciu o uzyskane wyniki wnioskuje, że obecność MET wzmacnia pro-apop-
totyczne i cytostatyczne i przeciw-migracyjne działanie DXC, czemu jednak niestety towarzy-
szą metaboliczne zmiany adaptacyjne (wzrost ilości ATP, NAD(P)H oraz mleczanu) w pewnej
subpopulacji komórek. Mając na względzie znaczenie tych obserwacji dla potencjalnego prze-
biegu terapii, nasuwa się pytanie jak duży odsetek komórek ulega adaptacji metabolicznej i jak
trwała jest to zmiana?

Dążąc do weryfikacji hipotezy, Kandydatka implementuje swój model badawczy dla
lekoopornych linii komórek raka prostaty wykazując, że obecność metforminy również uwraź-
liwia te linie na DXC, jednak w mniejszym stopniu. Co istotne, linie lekooporne były jedno-
cześnie zdolne do utrzymania wysokiego poziomu ATP i NAD(P)H, co może sugerować dużą
elastyczność metaboliczną tych komórek wskazując na ewentualną nieskuteczność tego typu
terapii. Mając na względzie lepsze zrozumienie konsekwencji i mechanizmów mogących leżeć
u podstaw obserwowanego fenomenu, **Kandydatka w szeregu eksperymentów weryfikuje
czy ekspozycja komórek nowotworowych na stres chemioterapeutyczny i metaboliczny
może być potencjalnym czynnikiem prowadzącym do selekcji populacji o szerszym zakre-
sie tolerancji metabolicznej i zwiększonej inwazyjności. Jest to niezwykle istotny rezultat,**



który studzi nadmierny optymizm odnośnie do prostej i skutecznej implementacji takich terapii skojarzonych.

Należy też podkreślić, że uzyskane przez Kandydatkę rezultaty są niezwykle istotne nie tylko dla zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw adaptacji komórek nowotworowych do stresu związanego z ekspozycją na terapeutyki, ale również dla rozwoju terapii spersonalizowanych.

Jednocześnie, badania Autorki nie uwzględniają komórek normalnych, co rodzi pytanie czy obecność metforminy będzie sprzyjać selektywności chemioterapeutyku czy też prowadzić do nasilenia efektów niepożądanych?

Należy również podkreślić bardzo dojrzałą i obszerną dyskusję, jaką Autorka prowadziła w omawianiu wyników eksperymentów, wskazując na istotne czynniki wpływające na końcowe efekty prowadzonych badań. Doktoranta krytycznie bowiem podchodziła do uzyskanych wyników, nie nadinterpretowała znaczenia poszczególnych obserwacji, rzeczowo i konsekwentnie przedstawiała przyjętą linię rozumowania.

Jednakże, dyskutując uzyskane wyniki Autorka zauważa heterogenność odpowiedzi komórek/linii komórkowych na badane terapeutyki, nasuwa to pytanie jak rezultaty (uzyskane w dość ograniczonym panelu linii raka prostaty) wpisują się w kontekst farmakogenetyczny, a



więc zróżnicowane osobnicze pacjentów? Jakie badania zdaniem Kandydatki należałoby przeprowadzić, aby realnie ocenić wpływ metforminy na przebieg chemioterapii nowotworu prostaty?

Rozprawa jest przygotowana starannie i czytelnie a strona edytorska nie budzi zastrzeżeń. Z obowiązku recenzenta napomknę jedynie, że:

- w przypadku „miR-200” i „miR-34” poprawnym określeniem jest „z rodziny miR-200 /miR-34”

- lepszym określeniem byłoby „mitochondria ulegające fuzji”

- w przypadku omawiania aktywności transkrypcyjnej czynników HIF, nie należy odnosić się do podjednostek alfa poszczególnych izoform, a powinno się stosować nazwy aktywnych transkrypcyjnie heterodimerów α/β , czyli HIF-1 lub HIF-2.

-geny i transkrypty zapisujemy kursywą

Powyższe drobne uwagi nie zmieniają jednak mojej wysokiej oceny staranności przygotowania pracy.

Omówione pokrótce rezultaty opublikowano po recenzjach, czasopiśmie naukowym, a co niezwykle istotnie Doktorantka jest pierwszą autorką tej pracy.

Za tym krótkim podsumowaniem pracy doktorskiej mgr Jessici Catapano kryje się wiele godzin żmudnej pracy eksperymentalnej, koniecznej dla rzetelnego wykonania różnorodnych i często unikalnych eksperymentów co świadczy nie tylko o bogatym warsztacie młodej badaczki, ale również o pasji i zaangażowaniu.

Rozprawa mgr **Jessici Catapano** spełnia więc wszystkie wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora i znakomicie dokumentuje opanowany przez Doktorantkę warsztat naukowy.

RB.

**Wnioski końcowe**

Recenzowaną rozprawę oceniam bardzo wysoko z uwagi na unikalny warsztat badawczy, duże walory naukowe i społeczne uzyskanych wyników i **wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego jej wyróżnienie.**

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że zostały spełnione wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w Art. 13 obowiązującej ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1265, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz.1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455)

Na tej podstawie wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o w Krakowie o dopuszczenie mgr Jessici Catapano do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

prof. dr hab. Rafał Bartoszewski

Wrocław, 10.06.2023