

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Pani mgr Pauliny Szeliskiej

pt. *„Ocena efektywności wybranego modelu farmakoterapii glikoków na podstawie profilowania metabolomicznego i lipidomicznego linii komórkowych tych nowotworów wyprowadzonych od pacjentów jako krok w stronę personalizacji terapii”*

Zakład Chemii
Analitycznej Katedry
Chemii Ogólnej i
Analitycznej

41-200, Sosnowiec

ul. Jagiellońska 4

www.sum.edu.pl

dr hab. n. farm.

Małgorzata Dołowy

mdolowy@sum.edu.pl

tel.: (+48 32) 364 16 92

Recenzja pracy doktorskiej została sporządzona w oparciu o pismo (znak FADF.5201.1.25.2025(A)) oraz materiały przesłane przez Pana Profesora UMK dr hab. Marka Foksińskiego, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne w Collegium Medicum im. L. Rydgia w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) w Toruniu. Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Pauliny Szeliskiej została wykonana w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Barbary Bojko. Badania wykonane przez Panią mgr Paulinę Szeliską wpisują się w tematykę badawczą prac prowadzonych w zespole przez Panią Promotor związanych z opracowaniem nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych skutecznych w leczeniu różnych schorzeń, w tym również nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Rozprawa doktorska zawiera wyniki zaprezentowane w (3) publikacjach, w tym (2) pracach, które ukazały się w czasopiśmie o wysokim wskaźniku oddziaływania (IF), takich jak *Metabolites* i *Green Analytical Chemistry* i (1) pracy opublikowanej w postaci preprintu na łamach repozytorium preprintów z zakresu nauk biologicznych pt. BioRxiv. Należy podkreślić, że na całkowity dorobek Doktorantki składa się (10) publikacji naukowych, (2) rozdziały w monografii naukowej oraz (9) wystąpień konferencyjnych na zjazdach krajowych i międzynarodowych. Łączna punktacja ww. prac wg danych



bibliometrycznych wynosi: punkty MNiSW – 935. Natomiast sumaryczny wskaźnik Impact Factor – 31,827. Parametry te są bardzo wysokie biorąc pod uwagę ten etap kariery naukowej Pani mgr Pauliny Szeliskiej. Warto również zaznaczyć, że Doktorantka czynnie uczestniczyła jako wykonawca w realizacji dwóch projektów badawczych tj. projektu NCBiR 4 oraz projektu NAWA mających na celu wzmocnienie i rozwój współpracy naukowo-badawczej pomiędzy Polską a Turcją oraz odpowiednio pomiędzy Polską a Republiką Austrii.

Przedstawiona do recenzji dysertacja posiada układ typowy dla prac opartych na cyklu publikacji tj. zawiera oprócz rozdziałów zatytułowanych: *Wstęp*, *Cel rozprawy doktorskiej*, *Wyniki badań i Wnioski*, skany (3) publikacji (P.1-P.3) prezentujących wyniki badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. W pracy doktorskiej zamieszczono także *Streszczenie w języku polskim i angielskim* oraz *Wykaz skrótów*, *Bibliografię* i *Spis rycin*. Dodatkowo do pracy został załączony wykaz osiągnięć Doktorantki i pozytywna opinia Komisji Bioetycznej przy UMK w Toruniu Collegium Medicum w Bydgoszczy dotycząca zgody na realizację badań stanowiących podstawę dysertacji. Na końcu pracy doktorskiej zaprezentowano również oświadczenia autora/współautorów o wkładzie pracy w powstanie publikacji (P.1-P.3), na których to oparta jest niniejsza rozprawa doktorska. Z oświadczeń tych wynika, że udział Doktorantki w powstawanie ww. publikacji jest znaczący. Doktorantka czynnie uczestniczyła w dokonywaniu aktualnego przeglądu literatury tematu, a także w planowaniu i prowadzeniu eksperymentów, w opracowywaniu metodyki badań, w analizie wyników oraz w przygotowaniu manuskryptów w wersji pierwotnej i finalnej.

Tematyka rozprawy doktorskiej jest oryginalna. Glejaki należą do najpowszechniejszych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN), których diagnostyka oraz skuteczna farmakoterapia nadal stanowią duże wyzwanie onkologiczne. To nowotwory o wysokiej tendencji do wznowy i dużej śmiertelności. W związku z tym, bardzo istotne jest poszukiwanie nowych i skutecznych terapii spersonalizowanych (celowanych), które umożliwiłyby osiągnięcie wymiernych efektów leczenia i obniżenia wskaźników śmiertelności wśród osób cierpiących na najbardziej agresywne typy glejaka do których należy glejak o wysokim stopniu złośliwości w skrócie GBM. Jak wskazują najnowsze dane literaturowe, metabolomika i lipidomika to nowatorskie narzędzia, które w połączeniu z zaawansowanymi technikami analitycznymi, takimi jak spektrometria mas, mogą dostarczyć

więcej informacji o zmianach nowotworowych w organizmie i pomagać nie tylko we wczesnej diagnostyce nowotworów OUN, ale także wspierać proces leczenia, w tym jego personalizację. Praca posiada dużą wartość aplikacyjną z uwagi na możliwość zastosowania nowo opracowanych przez Doktorantkę modeli farmakoterapii z wykorzystaniem profilowania metabolomicznego i lipidomicznego linii komórkowych glejaka w spersonalizowaniu terapii tego nowotworu.

We *Wstępie* pracy doktorskiej Autorka w sposób bardzo przystępny dla czytelnika i obrazowy omówiła w skrócie zagadnienia związana bezpośrednio z założonym tematem pracy doktorskiej, w tym przede wszystkim dokonała charakterystyki problemu jaki stanowi glejak o wysokim stopniu złośliwości, zaprezentowała klasyczne metody leczenia glejaka oraz aktualne trendy w spersonalizowanej diagnostyce GBM i możliwości terapeutyczne. Opierając się na najnowszych danych literaturowych Doktorantka wykazała celowość zastosowania w zaplanowanych przez siebie badaniach kompleksu galu (III) w postaci maltolanu (GaM) jako obiecującego kandydata terapeutycznego w leczeniu GBM w odniesieniu do badań prowadzonych z wykorzystaniem linii GBM oraz komórek pierwotnych w systemach hodowli 2D i 3D.

Zastosowanie biodostępnego kompleksu galu (III) w zaplanowanych w pracy doktorskiej badaniach jest w pełni uzasadnione dzięki tak przejrzyste napisanemu przez Autorkę pracy *Wstępowi*, aczkolwiek w tym miejscu nasuwa się poniższe pytanie:

Czy zastosowanie w przyszłości innych metali np. kompleksów rutenu mogłoby stanowić również dobrą alternatywę jak zaproponowany kompleks galu (III) w terapii glejaka złośliwego? Jaka jest aktualna wiedza nt. aktywności przeciwnowotworowej kompleksów rutenu?

W zaprezentowanym *Wstępie* Doktorantka omówiła również rolę małoinwazyjnej techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) w analizie metabolomicznej i lipidomicznej guzów mózgu. Ponadto w tej części pracy zamieszczony jest odsyłacz do publikacji (P.1.) pt. „*Glioblastoma metabolomics – in vitro studies*” wchodzącej w skład cyklu prac stanowiących podstawę dysertacji. To praca pogładowa powstała na podstawie dużej liczby tj. 100 źródeł literaturowych. W powyższej publikacji Doktorantka dokonała w sposób precyzyjny przeglądu badań *in vitro* glejaków o wysokim stopniu złośliwości. W pracy tej niezwykle starannie i rzeczowo zaprezentowane zostały warunki prowadzenia tych badań, w tym proces przygotowywania próbek do analizy farmakometabolicznej, warunki hodowli komórek glejaka oraz zidentyfikowane w czasie badań metabolity. Wykonany przez Doktorantkę przegląd

literaturowy, który z sukcesem ukazał się w postaci publikacji (P.1.) jest doskonałym przewodnikiem dla innych naukowców planujących tego typu badania i nakreśla on przyszłe kierunki metabolomiki *in vitro* GBM. Ważnym wnioskiem sformułowanym przez Doktorantkę na podstawie wykonanego przeglądu literatury jest z pewnością ten, który podkreśla duże znaczenie starannego planowania badań mających na celu dokładne profilowanie metabolomiczne komórek GBM. Jak zaznaczyła w publikacji poglądowej (P.1.) Doktorantka, dzięki precyzyjnie zaplanowanemu projektowi oraz wykorzystaniu modeli 3D hodowli komórkowych glejaka, a także warunkom hipoksji podczas przeprowadzania badań lub odpowiednio zastosowaniu skutecznych metod przygotowywania próbek, badania *in vitro* metabolomiki GBM mogą być przydatne nie tylko w diagnozowaniu guzów mózgu, ale także w procesie poszukiwania innowacyjnych leków dedykowanych leczeniu tych nowotworów. Reasumując, należy podkreślić, że Doktorantka wykazała się doskonałym doбором i wykorzystaniem literatury do przygotowania wstępu do pracy doktorskiej oraz publikacji poglądowej stanowiącej część rozprawy doktorskiej (P.1.). Świadczy to o tym, że Pani mgr Paulina Szeliska potrafi pozyskiwać niezbędne informacje i dokładnie analizować prace innych autorów. Moim zdaniem konkluzje zawarte w publikacji (P.1.) stały się istotną przesłanką do podjęcia przez Doktorantkę w kolejnym etapie realizacji pracy doktorskiej badań eksperymentalnych związanych z założonym tematem rozprawy.

W kolejnym rozdziale rozprawy doktorskiej zatytułowanym *Cel rozprawy doktorskiej* Doktorantka zamieściła jasno sprecyzowany cel pracy oraz zadania badawcze, które obejmowały scharakteryzowanie profilu metabolomicznego komórek glejaka wielopostaciowego wyprowadzonych od pacjentów oraz linii ustalonych z użyciem techniki SPME w połączeniu z metodą LC-MS/MS oraz w dalszym etapie skorelowanie otrzymanych wyników z rezultatami klasycznych testów. Zaplanowane przez Doktorantkę eksperymenty *in vitro* na hodowlach pierwotnych GBM w układzie 2D i 3D, miały na celu dokładne określenie efektu działania maltolanu galu (GaM) na te komórki oraz porównanie efektów działania GaM na zastosowane modele linii komórkowych GBM ustalone (A-172, U-87 MG) i linie wyprowadzone od pacjenta (3005, 3019, 3034, 3048, 3037) z danymi metabolomicznymi oraz poziomem receptora transferyny (TFRC).

W części pracy zatytułowanej „*Wyniki*” Autorka przedstawiła w postaci trzech podrozdziałów wyniki oryginalnych badań związanych z realizacją założonego celu pracy doktorskiej.

W rozdziale (6.1.) zostały zaprezentowane w sposób bardzo obrazowy i interesujący rezultaty nowatorskich badań poświęconych opracowaniu systemu do mikroekstrakcji do fazy stałej do celów badań metabolomicznych *in vitro*. Doktorantka zaprezentowała w nim szczegółowo etapy opracowania warunków wysokoprzepustowego systemu przygotowania próbek opartego na włóknach SPME, przeznaczonego do biokompatybilnego pobierania związków z małych objętości hodowli komórkowych *in vitro* oznaczanego jako „SPME-lid”. Niezmiernie ważny jest fakt, że zaproponowany w pracy system integruje włókna SPME z pokrywką płytki 96-dołkowej i umożliwia prowadzenie ekstrakcji bezpośrednio w inkubatorze CO₂. Ponadto system ten jest neutralny, co zostało również wykazane na drodze eksperymentalnej i pozwala on również na utrzymanie optymalnych warunków wzrostu komórek oraz ogranicza zaburzenia fizjologii komórek. Poza tym, co jest szczególnie cenne z punktu widzenia analizy metabolomicznej (farmaceutycznej i toksykologicznej) czy odpowiednio w badaniach farmakokinetyki leków, dzięki opracowanej metodzie z tego samego dołka można wykonywać powtarzane ekstrakcje w układzie czasowym. Warto podkreślić, że nowo opracowana technika jest zgodna z trendami zielonej chemii. Omawiane wyniki zostały ujęte w publikacji (P.2.) pt. „*Protocol for the upgraded high-throughput SPME system for biocompatible in vitro extraction from small volume for metabolomics and pharmaceutical assays*” opublikowanej na łamach czasopisma *Green Analytical Chemistry*. Należy zaznaczyć, że praca ta jest rezultatem efektywnej współpracy Doktorantki z ośrodkiem zagranicznym tj. z Middle East Technical University w Ankarze (METU, Turcja). Z pełnym przekonaniem można stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki są kluczowe jeśli chodzi o dalszy rozwój standaryzacji i upowszechnienia wysokoprzepustowej, czasowo-rozdzielczej metabolomiki hodowli komórkowych na potrzeby badań farmaceutycznych i toksykologicznych. W publikacji (P.2.) Doktorantka nakreśliła także kierunek dalszej optymalizacji ww. metody.

W następnym rozdziale (6.2) zaprezentowane zostały w sposób szczegółowy rezultaty badań dotyczących zastosowania opracowanego wcześniej systemu próbkowania SPME-lid w analizie zmian metabolomu zewnątrzkomórkowego ustalonych linii glejaka mózgu A-172 oraz U-87 MG po zastosowaniu maltolanu galu (III). Zilustrowane na wykresach krzywe przeżywalności linii komórkowych od stężenia po 72 h inkubacji z GaM oraz wykonana w dalszych etapach dogłębna analiza statystyczna wyników, w tym poziomu metabolitów najbardziej zmienionych dla komórek traktowanych GaM i kontrolnych A-172 oraz U-87 MG, dowiodły, że w obu liniach komórkowych dodatek GaM obniża aktywność metaboliczną i

przeżywalność w porównaniu do kontroli. Na wykresach zmiany metabolitów w czasie dla linii komórkowej A-172 potwierdziły silną zależność efektu od czasu. Ponadto przedstawione w pracy krzywe przeżywalności wykazały większą wrażliwość farmakodynamiczną linii A-172 niż U-87 MG. Natomiast pomiary tempa spożycia tlenu (OCR) dowiodły trwałe obniżenie konsumpcji tlenu w obecności GaM względem kontroli w obu liniach. Dzięki wykonanemu zestawieniu wyników Doktorantka wyciągnęła stosowne wnioski świadczące o tym, że zastosowany w badaniach GaM hamuje oddychanie mitochondrialne i moduluje metabolizm aminokwasów/prekursorów nukleotydów w sposób zależny od linii i czasu w A-172 przy niskich wartościach stężenia hamującego (IC) oraz supresji OCR w U-87 MG.

Z kolei rozdział 6.3 poświęcony został przedstawieniu i omówieniu wyników mających na celu określenie wpływu GaM na hodowle komórkowe glejaków mózgu w różnych systemach tj. hodowli jednowarstwowej (2D) oraz trójwymiarowej (3D) *in vitro*. Doktorantka dokonała skrupulatnej analizy metabolomu wewnątrzkomórkowego linii komórkowych ustalonych oraz komórek wyprowadzonych od pacjentów połączonej z oceną poziomu receptora dla transferyny i pomiarem oddychania mitochondrialnego. Wyniki te zostały ujęte w publikacji (P.3.) pt. „*Culture dimensionality governs gallium maltolate response in glioblastoma: comparative analyses in 2D and 3D models*” wydanej na łamach BioRxiv.

W pracy tej poddano ocenie, w jakim stopniu wymiar hodowli komórkowej (2D vs 3D) kształtuje odpowiedź GBM na maltolan galu (nowy i obiecujący kandydat terapeutyczny). Głównym celem tego etapu badań było porównanie efektów GaM w panelu modeli GBM obejmującym linie ustalone (A-172, U-87 MG) oraz różne linie wyprowadzone od pacjentów takie jak 3005, 3019, 3034, 3048 i 3073 przy równoczesnej integracji odpowiedzi fenotypowej z danymi metabolomicznymi oraz poziomem receptora transferyny (TFRC). Badania te stanowiły połączenie klasycznych testów cytotoksyczności z analizą metabolomiczną, co umożliwiło wyznaczenie parametrów IC₁₀/IC₅₀/IC₉₀ oraz porównanie wrażliwości między modelami i formatami zastosowanych w badaniach hodowli. Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka sformułowała bardzo cenne spostrzeżenia, do których należy m.in. stwierdzenie, że sposób hodowli istotnie modyfikuje odpowiedź GBM na GaM, jak również, że związek ten obniża przeżywalność i aktywność mitochondrialną w większym stopniu dla hodowli 3D niż 2D. Do profilowania metabolitów wykorzystano technikę LC-MS/MS i SPME/CBS. Z pełnym przekonaniem można stwierdzić, że wyznaczony na drodze licznie przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów panel (4) metabolitów w połączeniu z

OCR może być przydatny do dalszej weryfikacji pod względem stanowienia wskaźnika odpowiedzi. Zaprezentowane przez Doktorantkę wyniki w postaci publikacji (P.3.) dowodzą, że modele hodowli 3D oraz linie pierwotne stanowią środowisko bardziej zbliżone *in vivo* dla maltolanu galu oraz innych substancji wpływających na gospodarkę żelaza i bioenergetykę glejaka.

Podsumowując tę część pracy należy podkreślić, że uzyskane w pracy doktorskiej wyniki są oryginalne i bardzo obiecujące. Do ich opracowania Doktorantka zastosowała różne narzędzia statystyczne, w tym m.in. test Wilcoxon, test Kruskala-Wallisa, korelację Pearsona, a także metody chemometryczne jak analizę głównych składowych (PCA) i analizę dyskryminacyjną (PLS-DA), co bardzo ułatwiło interpretację uzyskanych wyników badań i wyciągnięcie na ich podstawie cennych wniosków z przeprowadzonych badań.

Pani mgr Paulina Szeliska na podstawie otrzymanych wyników sformułowała sześć wniosków, które bardzo dobrze korespondują z postawionym celem pracy i korelują z wynikami.

Piśmiennictwo w pracy obejmuje 58 pozycji, które zostały prawidłowo wykorzystane w dysertacji. Potwierdza to bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki do planowanych eksperymentów.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Szeliskiej napisana jest w sposób staranny, poprawną polszczyzną z zastosowaniem fachowej terminologii. Tytuł dysertacji został prawidłowo sformułowany i odzwierciedla postawione w pracy cele badawcze. Praca ma charakter interdyscyplinarny. Na całokształt rozprawy składały się zarówno licznie przeprowadzone przez Doktorantkę badania biologiczne jak również chemiczna analiza instrumentalna z wykorzystaniem nowoczesnej techniki LC-MS/MS i SPME. Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki badań wymagały dużej umiejętności planowania, skrupulatności oraz konsekwentnej ich realizacji przez Doktorantkę, aby finalnie osiągnąć zamierzony w pracy cel. Fakt uczestniczenia przez mgr P. Szeliską w realizacji projektów naukowo-badawczych we współpracy z ośrodkami zagranicznymi oraz doskonały dorobek naukowy potwierdzają dojrzałość naukową Doktorantki.

Wniosek końcowy

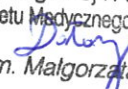
Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Szeliskiej jest oryginalna, ambitna i prezentuje wysoki poziom merytoryczny. Stanowi ona nowatorskie rozwiązanie problemu zdefiniowanego w tytule pracy, a otrzymane przez Doktorantkę wyniki są kluczowe dla rozwoju nowych i skutecznych

terapii w leczeniu glejaków. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością planowania i prowadzenia badań naukowych.

Pracę doktorską autorstwa Pani mgr Pauliny Szeliskiej pt. „Ocena efektywności wybranego modelu farmakoterapii glejaków na podstawie profilowania metabolomicznego i lipidomicznego linii komórkowych tych nowotworów wyprowadzonych od pacjentów jako krok w stronę personalizacji terapii” oceniam pozytywnie.

Rozprawa spełnia warunki formalne określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (z późniejszymi zmianami) i mam zaszczyt wnosić do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne w Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr Pauliny Szeliskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej, oryginalność i aktualność podjętego tematu oraz wysoki poziom badań, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne w Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Szeliskiej.

ADIUNKT
Zakładu Chemii Analitycznej
Katedry Chemii Ogólnej i Analitycznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

dr hab. n. farm. Małgorzata Dolowy