



Prof. dr hab. Michał Ciborowski
Laboratorium Metabolomiki i Proteomiki
Centrum Badań Klinicznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Kamili 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”*

wykonanej w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
pod kierunkiem Prof. dr hab. Barbary Bojko.

W rozprawie doktorskiej Pani mgr Kamili Szeliskiej przedstawione są badania nad glejakiem wielopostaciowym, który jest najczęstszym i najbardziej złośliwym nowotworem mózgu. Obejmują one wykorzystanie dwu- i trójwymiarowych hodowli komórkowych, ocenę żywotności komórek i parametrów mitochondrialnych, a także profilu metabolitów. Do pobrania i przygotowania próbek do badań metabolomicznych wykorzystany został wysokoprzepustowy system do mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Powyższy model badawczy oraz warsztat metodyczny pozwoliły na ocenę wpływu maltolanu galu na komórki glejaka wielopostaciowego. Związek ten zaburza kluczowe dla komórek nowotworowych szlaki zależne od żelaza, a dotychczasowe badania na modelach glejaka, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, wskazują na jego przeciwnowotworowe działanie. Ważne jest również to, że może on być stosowany doustnie. Obecnie prowadzone są badania kliniczne oceniające skuteczność terapii maltolanem galu u chorych z guzami nawrotowymi i/lub opornymi na leczenie.

Badania prowadzące do lepszego zrozumienia biologii tego nowotworu, identyfikacji nowych celów terapeutycznych oraz biomarkerów odpowiedzi na leczenie są bardzo istotne. Mediana przeżycia pacjentów z glejakiem wielopostaciowym wynosi ok. 12–18 miesięcy, a zaledwie kilka procent chorych dożywa 5 lat od rozpoznania, co jasno pokazuje pilną potrzebę opracowywania nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych. Dodatkowo, mimo rozwoju onkologii, standard leczenia glejaka (chirurgia, radio- i chemioterapia) od dekad zmienił się niewiele, a skuteczność dostępnych opcji jest ograniczona, dlatego przeprowadzone przez Doktorantkę badania mają realny potencjał, by przełożyć się na poprawę jakości i długość życia pacjentów.

Oceniana rozprawa doktorska oparta jest na cyklu trzech artykułów, dwóch oryginalnych i jednego poglądowego. W każdej z tych prac Doktorantka jest pierwszym autorem, przy czym w pracy poglądowej pierwszym równorzędnym. Druga praca badawcza jest zamieszczona w rozprawie w postaci preprintu, jednak obecnie jest już opublikowana w czasopiśmie *Molecular Pharmaceutics*. Cykl prac będących podstawą tej rozprawy jest spójny tematycznie, a sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (z ang. *impact factor*, IF) tych prac wynosi 14,4. Zgodnie z aktualnym wykazem *Journal Citation Reports*, publikowanym corocznie przez *Clarivate Analytics*, czasopisma, w których zostały opublikowane te prace, są zaklasyfikowane do kategorii Q2 – dwie prace i Q1 – jedna praca. Należy podkreślić, że praca poglądowa ma już 22 cytowania. Wskaźniki bibliometryczne nie są może najlepszą i wyczerpującą miarą jakości pracy naukowej, a mimo to dostarczają informacji o widoczności publikacji i pozycji naukowca i jego badań w danej dziedzinie. Biorąc pod uwagę etap kariery naukowej Pani mgr Pauliny Szeliskiej, uważam te wartości za bardzo dobre.

Rozprawa ma 174 strony, jednak 2/3 tej liczby stanowią zamieszczone w niej publikacje. Praca poglądowa umieszczona jest na końcu rozdziału „Wstęp”, a prace badawcze wkomponowane są w rozdział „Wyniki badań”. Pozostałe elementy rozprawy to cel pracy, wnioski i bibliografia. Ponadto na początku rozprawy umieszczone są: spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, a na końcu spis rycin, wykaz osiągnięć Doktorantki, skan zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań oraz oświadczenia współautorów publikacji odnośnie ich roli i udziału w przeprowadzonych badaniach i tworzeniu prac wchodzących w skład rozprawy. Zgodnie z tą dokumentacją Pani Paulina Szeliska brała udział w planowaniu i realizacji badań, włączając w to prowadzenie hodowli komórkowych, analizy instrumentalne i analizę danych, a także przygotowanie manuskryptów i odpowiedzi na recenzje. Zakres przedstawionego wkładu jest adekwatny do wskazanego szacunku procentowego oraz uzasadnia pierwszą lub pierwszą (równorzędną) pozycję Doktorantki pośród autorów tych publikacji.

Wstęp podzielony jest na pięć podrozdziałów uzupełnionych o pracę poglądową. Doktorantka przedstawia najpierw charakterystykę glejaków o wysokim stopniu złośliwości, omawiając aktualną klasyfikację WHO (2021 rok), znaczenie markerów molekularnych oraz rolę zaburzonego metabolizmu żelaza i nadekspresji receptora transferyny w progresji tych nowotworów. Następnie koncentruje się na maltolanie galu jako związku o aktywności przeciwnowotworowej, w tym potencjalnie w leczeniu glejaka wielopostaciowego. W kolejnej części Doktorantka omawia znaczenie hodowli komórkowych w badaniach nad glejakiem, zwracając uwagę na różnice między hodowlami 2D i 3D oraz przewagę modeli trójwymiarowych i linii wyprowadzonych od pacjentów w odzwierciedlaniu złożonego mikrośrodowiska guza. Dalej opisuje mikroekstrakcję do fazy stałej, wskazując, że jest to biokompatybilna, wysokoprzepustowa technika przygotowania próbek, spełniająca założenia zielonej chemii, która jest użyteczna w badaniach metabolomicznych czy lipidomicznych *in vitro*. Pomimo tytułu „Farmako-metabolomika w glejaku mózgu”, w ostatnim podrozdziale Doktorantka niewiele pisze o farmakometabolomice, a bardziej skupia się na powiązaniach pomiędzy profilami metabolitów a stanem/mutacjami guza. Również w zamieszczonej na końcu tego podrozdziału pracy przeglądowej tylko jeden rozdział poświęcony jest farmakometabolomice. Publikacja ta to bardzo rzetelny przegląd badań metabolomicznych prowadzonych na modelach *in vitro* glejaka wielopostaciowego, uwzględniający badania z wykorzystaniem hodowli komórkowych, strategię przygotowania próbek, różnice między endo- i egzometabolomem oraz ograniczenia w ekstrapolacji wyników *in vitro* do sytuacji *in vivo*. Cennym elementem tej pracy jest zestawienie kluczowych szlaków i metabolitów powiązanych z konkretnymi mutacjami i fenotypami GBM. Praca ta jest bardzo dobrym uzupełnieniem i poszerzeniem informacji zawartych we wstępie. Natomiast w mojej ocenie, aktualny tytuł podrozdziału 5.5 nie odzwierciedla w pełni informacji w nim zawartych. Nie zmienia to faktu, że cała część teoretyczna jest dobrze przygotowana, spójna i zawiera wszystkie informacje istotne z punktu widzenia obszaru badań.

Cel rozprawy jest jasno sformułowany, ale uważam, że brakuje w nim właściwej kolejności. To, co Autorka nazywa „ostatecznym celem badań”, jest w istocie celem głównym, zgodnym z tytułem rozprawy, i powinno otwierać rozdział piąty. Natomiast część analityczna poświęcona opracowaniu platformy SPME i badaniom na różnych modelach komórkowych to cele szczegółowe prowadzące do osiągnięcia celu głównego.

Rozdział „Wyniki badań” składa się z trzech podrozdziałów, przy czym dwa z nich zawierają wspomniane prace badawcze. W pierwszym z nich przedstawiony jest zmodyfikowany, wysokoprzepustowy system przygotowania próbek oparty na włóknach SPME, przeznaczony do biokompatybilnego pobierania związków z małych objętości hodowli komórkowych *in vitro*. Opracowany system SPME-lid umożliwia prowadzenie ekstrakcji bezpośrednio w inkubatorze CO₂, dzięki czemu warunki wzrostu komórek nie są zaburzane, a z tego samego dołka można pobierać próbki w różnych punktach czasowych, bez istotnego wpływu na przebieg hodowli. Rozwiązanie to może być użyteczne m.in. w badaniach kinetycznych. Oprócz zawartej w tym podrozdziale publikacji anglojęzycznej, na jego początku znajduje się jej streszczenie, któremu towarzyszy bardzo czytelny schemat prezentujący to rozwiązanie technologiczne i jego możliwości.

W kolejnej części badań, opisanej w drugim podrozdziale, opracowany system SPME-lid wykorzystano do śledzenia zmian w profilu metabolitów zewnątrzkomórkowych w dwóch liniach komórkowych glejaka traktowanych maltolanem galu, w różnych punktach czasowych po ekspozycji. Tej części nie towarzyszy opublikowana praca badawcza. Stężenie stresora dobrano na podstawie wcześniejszych testów przeżywalności komórek, wybierając te odpowiadające wartości IC50. Oprócz testu przeżywalności i badań metabolomicznych oceniane było też oddychanie komórkowe. Uzyskane wyniki pokazują istotny spadek przeżywalności i zużycia tlenu po 72 h inkubacji z maltolanem galu. W przypadku metabolitów widać wyraźne różnice w ich poziomie pomiędzy próbkami traktowanymi związkiem galu a kontrolnymi, ale nie we wszystkich punktach czasowych. Trajektoria zmian też nie zawsze jest jednoznacznie zależna od czasu. Przeprowadzone badania wskazują na różną wrażliwość badanych linii komórkowych na badany związek. Na rycinach 5 i 6 przedstawione są zmiany w poziomie metabolitów w czasie, a pierwszy umieszczony punkt czasowy to 1h. Czy pobierała Pani też próbki w czasie 0? Jeżeli tak, czy zmiany w poziomie metabolitów pomiędzy czasem 0 a 1h były istotne i zależne od podania maltolanu galu?

Ostatni podrozdział to kontynuacja badań nad wpływem maltolanu galu na linie komórkowe glejaka. Do badań, oprócz tych samych linii co w poprzednim rozdziale, wykorzystano pięć linii wyprowadzonych od pacjentów. Ponadto prowadzono hodowle w modelach 2D i 3D oraz oceniano metabolom zewnątrz- i wewnątrzkomórkowy. Celem tych badań było sprawdzenie, w jakim stopniu wymiar hodowli komórkowej (2D vs 3D) kształtuje odpowiedź na badany związek. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że modele 3D lepiej odzwierciedlają warunki *in vivo*. Ponadto przeprowadzone badania pozwoliły na wskazanie panelu czterech metabolitów, które wraz z tempem zużycia tlenu wydają się być obiecującym panelem metabolicznym do oceny odpowiedzi na leczenie. Przeprowadzone badania przedstawione są w publikacji anglojęzycznej umieszczonej na końcu podrozdziału, a sama jego treść to jej skrócony opis w języku polskim.

Na podstawie wykonanych badań i uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła szereg wniosków, które są przedstawione w postaci podpunktów. Uważam, że powiązanie cel-wniosek byłoby bardziej czytelne, gdyby cele również były przedstawione w postaci punktów. Co nie zmienia faktu, że wyciągnięte wnioski odpowiadają postawionym celom pracy. Pani mgr Kamila Szeliska opracowała system do wysokoprzepustowej ekstrakcji metabolitów z hodowli komórkowych, który może być stosowany w warunkach inkubatora i pozwala na minimalnie inwazyjne pobieranie próbek do badań w czasie. Ponadto wykazała, że maltolan galu obniża przeżywalność komórek glejaka, hamuje oddychanie komórkowe i wpływa na metabolom komórkowy. Na podstawie uzyskanych wyników zidentyfikowała panel metaboliczny o potencjale praktycznym, który może być przydatny do oceny skuteczności terapeutycznej potencjalnych leków na glejaka.

W dalszej części rozprawy zebrana jest bibliografia, która obejmuje 58 pozycji, z czego prawie 60% to prace opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat. Na dorobek naukowy Doktorantki składają się: 10 publikacji, dwa rozdziały w monografii naukowej oraz 9 doniesień zjazdowych. Ponadto Pani mgr Paulina Szeliska była wykonawcą w dwóch projektach finansowanych ze źródeł zewnętrznych. Dorobek naukowy na tym etapie kariery naukowej oceniam jako bardzo dobry.

Pozostałe uwagi przedstawiam poniżej:

1. W spisie treści wykaz skrótów ma numer 1, a w dalszej treści rozprawy numeracja zaczyna się od wykazu publikacji, który w spisie treści jest pod numerem 2. Zatem numery rozdziałów w spisie nie zgadzają się z numeracją w treści.
2. Bardzo podoba mi się przedstawienie skrótów w postaci tabeli, wraz z ich polskim rozwinięciem.
3. Zwroty obcojęzyczne, np. *in vivo*, powinny być pisane kursywą.
4. W tekście można znaleźć literówki oraz drobne błędy edytorskie.
5. Czy modele wielowymiarowe z publikacji nr 3, na bazie których była zrobiona statystyka wielowymiarowa, zostały zwalidowane? W publikacji brakuje też informacji o parametrach tych modeli, R^2 i Q^2 .
6. Czy kody z R zamieszczone w suplemencie do publikacji nr 3 przygotowała Pani samodzielnie?
7. W tytule rozprawy wskazane jest również profilowanie lipidomiczne, natomiast w przedstawionych wynikach nie zidentyfikowano lipidów jako osobnej grupy związków. Proszę o doprecyzowanie, czy komponent lipidomiczny został zrealizowany. A jeżeli nie, to wskazanie, dlaczego.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Szeliskiej stanowi dojrzałe, nowatorskie i spójne działanie badawcze na styku farmakologii i metabolomiki, dobrze wpisujące się w aktualne kierunki badań nad glejakiem wielopostaciowym. Przeprowadzone badania są nowatorskie, a uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład do badań nad maltolanem galu jako potencjalnym lekiem na glejaka wielopostaciowego. Na szczególne podkreślenie zasługują opracowane rozwiązania analityczne, które są w zgodzie z zasadami zielonej chemii, a także połączenie klasycznych testów komórkowych z zaawansowaną analizą metabolomiczną. i są solidną podstawą do dalszych prac ukierunkowanych na bardziej spersonalizowane podejście do terapii. Pomimo kilku wskazanych w recenzji uwag, całość dzieła spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i świadczy o wysokich kompetencjach badawczych Pani mgr Pauliny Szeliskiej.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, iż zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742), oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu dziełom. W związku z czym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Kamili Szeliskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Z-ca DYREKTORA
ds. Badań Metabolomicznych i Proteomiki
Centrum Badań Klinicznych
Ciborowski
prof. dr hab. Michał Ciborowski