

dr hab. Wiktoria Struck-Lewicka

Gdańsk, 29.01.2025

Zakład Farmakodynamiki

Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki

Wydział Farmaceutyczny

Gdański Uniwersytet Medyczny

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Szeliskiej p.t.

„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”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została zrealizowana w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Bojko – promotor pracy. Badania realizowane były także we współpracy z Katedrą Urologii i Andrologii tego samego Uniwersytetu oraz Katedrą Chemii z *Middle East Technical University* w Ankarze, Turcji.

Ocena wyboru tematyki badawczej

Skuteczna farmakoterapia glejaków stanowi priorytetowe wyzwanie we współczesnej onkologii. Specyficzne umiejscowienie nowotworu, złożona architektura komórek i ich agresywność sprawiają, że obecnie dostępne opcje leczenia są niewystarczająco skuteczne. Dodatkowo, biorąc pod uwagę rokowania pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem o wysokim stopniu złośliwości, niezwykle istotne staje się poszukiwanie nowych ścieżek terapeutycznych ukierunkowanych na personalizację leczenia. Badania nad metabolizmem komórek nowotworowych zmienionym pod wpływem farmakoterapii stanowią kluczową strategię w poszukiwaniu nowych celów terapeutycznych. Podejście farmakometabolomiczne pozwala na precyzyjne zdefiniowanie szlaków metabolicznych oraz punktów molekularnych związanych z progresją lub remisją choroby, umożliwiając tym samym rzetelną ocenę skuteczności leczenia. Ponadto, analiza linii komórkowych ustalonych i wyprowadzonych od pacjentów jako strategia badań farmakometabolomicznych z zastosowaniem maltolanu galu jest przykładem badań translacyjnych obejmujących aspekt kliniczny, analityczny i statystyczny.

Uważam, iż prace badawcze wykonane w ramach pracy doktorskiej przez Panią mgr Paulinę Szeliską są nad wyraz aktualne a tematyka dysertacji jest uzasadniona i istotna z punktu widzenia rozwoju zaawansowanych strategii analitycznych, poszukiwania nowych mechanizmów molekularnych rozwoju glejaka wielopostaciowego, a także oceny wrażliwości linii komórkowych na zastosowaną farmakoterapię.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi zbiór 3 artykułów naukowych (praca przeglądowa oraz dwie prace oryginalne), które zebrane są pod wspólnym tytułem rozprawy doktorskiej i napisane zostały w języku angielskim. We wszystkich publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem (w publikacji przeglądowej jest równorzędnym pierwszym

autorem). Prace ukazały się w czasopiśmie naukowych, indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor* – IF) tych prac wynosi 14,4 zgodnie z rokiem ich opublikowania. Zamieszczone w dysertacji oświadczenia współautorów wskazują, że udział Doktorantki w realizacji wszystkich prac był wiodący. Ponadto, realizowane przez Doktorantkę badania opisane w drugiej i trzeciej publikacji zostały zrealizowane we współpracy z Katedrą Chemii z Middle East Technical University w Ankarze w Turcji, co potwierdza umiejętność Doktorantki w pracy w międzynarodowym zespole badawczym.

Recenzowana rozprawa zawarta została na 174 stronach maszynopisu i podzielona klasycznie na wstęp, cel pracy, wyniki oraz wnioski. Cykl 3 artykułów naukowych poprzedzony jest także streszczeniem oraz bardzo przydatnym, choć w mojej opinii niekompletnym, wykazem skrótów. We wstępie rozprawy, doktorantka przedstawiła teoretyczne zagadnienia obejmujące charakterystykę glejaków o wysokim stopniu złośliwości (GBM), aktualne możliwości terapeutyczne GBM, rolę hodowli komórkowych w badaniach przedklinicznych, jak również syntetyczny opis techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME, ang. *solid phase microextraction*). W ostatniej części wstępu, doktorantka zawarła informacje na temat roli farmakometabolomiki w profilowaniu fenotypów glejaka mózgu. Należy podkreślić, iż syntetyczny wstęp jest spójny i wprowadza czytelnika w zagadnienia zawarte w artykułach naukowych a opisane cele pracy, a następnie uzyskane wyniki i sformułowane wnioski podkreślają wysoką jakość przeprowadzonych badań. W dalszych częściach maszynopisu, rozprawa doktorska obejmuje kopie opublikowanych manuskryptów, oświadczenia współautorów, zgodę Komisji Bioetycznej, wykaz osiągnięć Doktorantki oraz bibliografię w postaci 58 cytowanych odnośników literaturowych.

Celem badawczym jaki postawiła sobie Pani mgr Paulina Szeliska było opracowanie platformy analitycznej pozwalającej na integrację różnych formatów hodowli komórkowych (2D i 3D) i tradycyjnych testów komórkowych z analizą metabolomiczną, a także jej zastosowanie w badaniach nad wrażliwością komórek glejaka wielopostaciowego leczonego maltolanem galu. Cele zostały podzielone na poszczególne etapy i sformułowane prawidłowo.

Pierwsza publikacja stanowi przegląd literatury na temat zmienionych szlaków metabolicznych w przebiegu glejaka wielopostaciowego. Doktorantka bardzo szczegółowo opisała zmiany w metabolomie komórkowym glejaka *in vitro*, oraz ich potencjalne znaczenie w diagnostyce i prognostyce choroby. Pani mgr Paulina Szeliska wskazała też na możliwości oraz pewne ograniczenia kluczowych etapów badań metabolomicznych co świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności wnikliwej oceny istniejącego stanu wiedzy.

Druga publikacja, opisana przez Doktorantkę jako metodyczna, przedstawia protokół opracowanej technologii mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME-lid) w nowoczesnym, wysokoprzepustowym systemie umożliwiającym wielokrotne pobieranie próbek z tej samej hodowli komórkowej w czasie trwania procesu inkubacji. Opracowany system przeznaczony jest do biokompatybilnego pobierania związków nawet z małych objętości hodowli komórkowych *in vitro*. Technologia nie narusza ciągłości hodowli oraz zapewnia stabilne warunki pH i temperatury, co sprawia iż proces ekstrakcji jest wydajny i powtarzalny. Dzięki temu może też znajdować zastosowanie w badaniach toksykologicznych oraz w badaniach kinetyki leków. Ponadto, opracowany protokół został oceniony pod kątem zrównoważonego rozwoju z wykorzystaniem skali AGREEprep (wynik 0,75/1,00) i oceniony jako spełniający zasady tzw. zielonej chemii. Doktorantka zbadała efektywność ekstrakcji na przykładzie procedury izolowania wybranych aminokwasów, które następnie oznaczono z zastosowaniem techniki LC-MS/MS. Zdaję sobie sprawę, iż trzonem tej pracy było opracowanie wysokoprzepustowego, powtarzalnego i wydajnego systemu SPME-lid ale chciałam zapytać czy Doktorantka próbowała ekstrahować związki należące do innych klas chemicznych np. związków lipidowych. Ponadto, należy podkreślić, iż publikacja nr 2 stanowi kompleksową charakterystykę systemu SPME-lid oraz uwzględnia analizę poszczególnych czynników wpływających na jakość procedury ekstrakcji. W punkcie 1.4.5. tej publikacji („*Standardization and calibration method*”), Doktorantka szczegółowo opisuje czynniki analityczne istotne z perspektywy przygotowania próbek kalibracyjnych takie jak: rodzaj stosowanych wzorców wewnętrznych, zjawisko efektu matrycy czy standaryzacja stosowanych matryc biologicznych. Takie kompleksowe przedstawienie tematyki konieczności



standardyzacji badań świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i zdobytym gruntownym warsztacie analitycznym.

Trzecia publikacja obejmuje zastosowanie badań metabolomicznych do oceny wpływu maltolanu galu na hodowle komórkowe glejaków mózgu *in vitro*. Doktorantka zastosowała linie ustalone oraz wyprowadzone od pacjentów z uwzględnieniem rodzaju hodowli (2D lub 3D), które poddane zostały testom rutynowym. Wyniki przeprowadzonych testów cytotoksyczności, pomiaru oddychania mitochondrialnego oraz dodatkowo poziomu transferryny korelowano z rodzajem hodowli, a także uzyskanymi danymi metabolomicznymi. Doktorantka wykazała wpływ maltolanu galu na zmniejszenie przeżywalności komórek glejaka oraz istotną zależność między poziomem transferryny a wrażliwością komórek na zastosowaną terapię. Podkreślono także zasadność prowadzenia badań na różnorodnych liniach komórkowych, co uwzględnia heterogenną naturę glejaka oraz może pozwolić na bardziej kompleksową ocenę wrażliwości komórek na wdrożoną farmakoterapię. Wyniki badań metabolomicznych przeprowadzonych przez Doktorantkę, wskazują na istotny udział szlaków przemian aminokwasów, puryn oraz pirymidyn, które są także obserwowane w procesie dysfunkcji mitochondrialnej. Żałuję, że w tej części pracy nie przeprowadzono niecelowanych badań lipidomicznych, które mogłyby wskazać udział innych szlaków biochemicznych w patomechanizmie rozwoju glejaka wielkopostaciowego lub korelujące z wrażliwością linii komórkowych na maltolan galu. Uwaga ta nie zmienia jednak faktu, iż prace realizowane przez Doktorantkę stanowią przykład wysokiej jakości badań nad poszukiwaniem skutecznych strategii terapeutycznych w onkologii.

Podsumowując tę część mojej oceny, stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała cel pracy, dobrała właściwe metody badacze, w przemyślany sposób zinterpretowała uzyskane wyniki, a także poprawnie sformułowała wnioski.

Uwagi szczegółowe i podsumowanie

Podczas uważnej lektury rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Szeliskiej nasunęły mi się też pewne dodatkowe uwagi i pytania, które wymagają wyjaśnienia:

1. We wstępie pracy napisała Pani, iż GaM to doustnie biodostępny kompleks galu (III). Proszę o komentarz w kontekście biodostępności tego związku.
2. Na jakiej zasadzie dobierane były poszczególne zakresy stężeń maltolanu galu i dlaczego różniły się one względem zastosowanej linii komórkowej raka.
3. Czy podjęła Pani próbę oznaczenia związków lipidowych w badanych liniach komórkowych? Na podstawie danych zawartych w publikacji nr 3, oznaczeniu podlegały związki z grupy aminokwasów, puryn, pirymidyn oraz allantoina. Ze względu na istniejący stan wiedzy na temat przeprogramowania metabolizmu komórek nowotworowych analiza profili lipidomicznych byłaby dobrym uzupełnieniem prowadzonych badań. Według danych zawartych w publikacji nr 3 wynika, iż przeprowadzono oznaczenia analityczne z zastosowaniem techniki LC-MS/MS w trybie MRM w oparciu o „*Primary Metabolites Version 3 method package*” - proszę o krótkie przedstawienie zastosowanej metodologii.
4. W publikacji nr 3 próbki kontrolne QCs stanowiły mieszaninę badanych próbek. Czy przeprowadzono procedurę filtrowania danych z uwzględnieniem próbek QCs czyli metodologii QA/QC? Dlaczego do analiz przeprowadzonych w trybie MRM nie przeprowadzono typowych badań ilościowych z walidacją metody i z oznaczaniem stężeń konkretnych metabolitów?
5. Czy wybierając metabolity według parametru VIP uwzględniono także wartość parametru $p(\text{corr})$?
6. W pracy napisano, iż „zewnątrzkomórkowa metabolomika polega na profilowaniu zmian stężeń metabolitów”. Proszę o rozwinięcie czy w tym kontekście miała Pani na myśli tzw. badania niecelowane czy celowane?
7. W kontekście błędów edytorskich jest ich niewiele: np. rozworu zamiast roztworu, antybityków zamiast antybiotyków, fosfoanowym zamiast fosforanowym. Brakuje też konsekwencji w nazewnictwie leku: maltilan galu, maltonian galu albo maltolan galu a mutacje genów nie zostały napisane kursywą.



Wniosek końcowy

Uważam, iż mimo drobnych uchybień edytorskich, rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Szeliskiej została przygotowana rzetelnie. Należy podkreślić, iż doktorantka zrealizowała cele pracy wykorzystując nowoczesne techniki analityczne oraz zaawansowane metody obliczeniowe. Doktorantka wykazała się także dojrzałością naukową przy ocenie i interpretacji uzyskanych wyników oraz dobrze sformułowała wnioski.

Reasumując, stwierdzam, iż recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Szeliskiej spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, według obowiązujących przepisów (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742)). Doktorantka spełniła warunki określone w ustawie o stopniach i tytułach naukowych, dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Szeliskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony przedłożonej rozprawy doktorskiej celem nadania stopnia doktora nauk medycznych.

Gdańsk, 29.01.2025

Zakład Farmakodynamiki
dr hab. Wiktoria Struck-Lewicka

Wiktoria Struck-Lewicka

Adiunkt



Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska p.t. „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” odznacza się wysokim poziomem merytorycznym, przedstawia nowatorskie podejście technologiczne oraz zaawansowane badania analityczne i statystyczne. Z uwagi na zaawansowaną metodologię, innowacyjność badań oraz istotny wkład w rozwój chemii analitycznej i metabolomiki wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Gdańsk, 29.01.2022

Zakład Farmakodynamiki
dr hab. Wiktoria Struck-Lewicka

Wiktoria Struck-Lewicka

Adiunkt