

Szczecin, 5.09.2023 r.

Prof. dr hab. Violetta Dzieziejko
Katedra Biochemii i Chemii Medycznej
Samodzielna Pracownia Biochemii Farmaceutycznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Al. Powstańców Wlkp. 72
70-111 Szczecin

Recenzja rozprawy doktorskiej

Podstawą niniejszej recenzji jest rozprawa doktorska mgr Joanny Stalińskiej, z tytułem "Szlaki metabolizmu energetycznego jako potencjalny cel terapii glejaka wielopostaciowego z zastosowaniem nowych pochodnych fenofibratu", wykonana w Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Justyny Drukały. Badania będące podstawą rozprawy zostały częściowo wykonane podczas stażu naukowego w laboratorium prof. Krzysztofa Reissa w Stanley S. Scott Cancer Center, Department of Interdisciplinary Oncology, Louisiana State University Health Sciences Center w Nowym Orleanie w Stanach Zjednoczonych.

Glejaki wielopostaciowe (GBM, *glioblastoma multiforme*) należą do pierwotnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN), o dużym stopniu złośliwości zarówno pod względem histopatologicznym, jak i klinicznym. W zależności od analizowanego źródła, szacuje się, że roczna zapadalność na GBM wynosi średnio 4 na 100 000 osób. Rokowanie u chorych na GBM pozostaje złe i wciąż stanowi istotny problem kliniczny. Czas przeżycia od rozpoznania u większości chorych wynosi jedynie kilkanaście miesięcy, a mediana przeżycia około 12 miesięcy. Jedynie 3–8% chorych żyje dłużej niż 3 lata.

Mimo postępu w dziedzinie onkologii, wyniki leczenia złośliwych nowotworów mózgu pozostają niezadawalające, stanowiąc nadal wyzwania dla współczesnej medycyny i nauki. Obraz makroskopowy glejaka wielopostaciowego jest niejednorodny. W obrębie tego samego guza obserwuje się zmienne utkanie histologiczne oraz duże zróżnicowanie komórkowe z wyraźną atypią i bardzo licznymi podziałami komórkowymi. Najczęściej w terapii wykorzystuje się tzw. leczenie skojarzone, które obejmuje łączenie - operacji

chirurgicznej, radioterapii i chemioterapii. Niestety, z uwagi na naciekający charakter wzrostu guza oraz położenie glejaka w obszarach mózgu, w wielu przypadkach przeprowadzenie radykalnego leczenia operacyjnego bez uszkodzenia kluczowych obszarów mózgu nie jest możliwe.

Nie udało się dotychczas opracować leku, którym dałoby się skutecznie leczyć GBM. W dużym stopniu jest to związane z ograniczoną przepuszczalnością bariery krew-mózg (BBB) dla chemioterapeutyków. Zastosowanie leków metabolicznych do destabilizacji homeostazy energetycznej komórek nowotworowych jest jedną z potencjalnych strategii terapeutycznych. Przeciwnowotworowe działanie fenofibratu jest opisywane w literaturze. Jednakże lek ten nie przekracza bariery krew-mózg, co jest ograniczeniem do zastosowania go w skutecznej terapii nowotworów mózgu. Z tego względu poszukuje się związków chemicznych wykazujących działanie przeciwnowotworowe zbliżone do aktywności biologicznej fenofibratu, lecz cechujących się lepszą stabilnością i penetracją tkanek. Zsyntetyzowano nowe pochodne fenofibratu, wprowadzając modyfikacje w strukturze chemicznej związku. Niektóre z tych zmodyfikowanych związków przebadano w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Mając na uwadze powyższe fakty, zasadnym jest podjęte przez Doktorantkę zagadnienie dotyczące oceny potencjału przeciwnowotworowego względem glejaka wielopostaciowego wybranych pochodnych fenofibratu. **Cel pracy jest zrozumiały i zgodny z zawartością tematyczną prowadzonych badań.**

Szczegółowe cele obejmowały między innymi: ocenę aktywności biologicznej nowych pochodnych fenofibratu (PP) i selekcję związków o najlepszym potencjale przeciwnowotworowym na komórki glejaka wielopostaciowego *in vitro*, analizę wpływu związków PP na szlaki metabolizmu energetycznego komórek glejaka wielopostaciowego *in vitro*, analizę stabilności we krwi, rozpuszczalności w wodzie oraz potencjału do przekraczania bariery krew-mózg wybranych związków PP, jak również próbę określenia potencjału zastosowania nowych pochodnych fenofibratu jako terapii GBM. Uważam, że **temat podjęty przez Doktorantkę w niniejszej rozprawie doktorskiej jest bardzo ambitny, niezwykle ważny i aktualny, tak pod względem poznawczym, klinicznym jak i potencjalnie terapeutycznym.**

Układ przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest klasyczny. Rozprawa liczy 172 strony i ma typowy układ pracy doktorskiej zawierający wstęp, cel, materiały, metodologię, wyniki badań i ich omówienie, dyskusję, podsumowanie, wnioski, streszczenie,

dane uzupełniające oraz bogate piśmiennictwo (174 pozycje). Pracę poprzedza bogaty wykaz skrótów, który znacznie ułatwia śledzenie tekstu. W pracy znajduje się 8 tabel i aż 55 rycin oraz rozbudowana tabela z wynikami badań w danych uzupełniających.

Rozprawę doktorską otwiera obszerna, rzeczowo napisana część teoretyczna. Autorka precyzyjnie wprowadza czytelnika w podjętą tematykę jaką jest glejak wielopostaciowy, a w szczególności w jego nową klasyfikację oraz terapię tej choroby. W bardzo czytelny i przystępny sposób opisuje modele *in vitro* glejaka wielopostaciowego oraz barierę krew-mózg jak również jej modele *in vitro*, bariera ta jest niezwykle ważna w odniesieniu do jej przenikania przez farmakoterapeutyki. W ostatnim podrozdziale wyjaśnia dlaczego fenofibrat i jego pochodne są uwzględniane w potencjalnej terapii glejaka wielopostaciowego.

Pozytywnie oceniam ogólną wiedzę teoretyczną mgr Joanny Stalińskiej w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorantka doskonale zna piśmiennictwo w zakresie tematu pracy, dokonała szczegółowego przeglądu piśmiennictwa w w/w obszarze. Część teoretyczna rozprawy napisana została zgodnie z aktualnym stanem wiedzy w zakresie omawianych zagadnień i ma istotny związek z dalszą częścią badawczą pracy.

Rozdział „Materiał i Metody” zawiera bardzo szczegółowe i profesjonalnie opisane metody i procedury zastosowane w badaniach. Tak dobrze przygotowany rozdział świadczy o bardzo dużej umiejętności analitycznej Doktorantki, a czytelnikowi umożliwia odtworzenie przeprowadzonych badań.

Doktorantka podczas realizacji projektu wykorzystwała aż sześć modeli badawczych: ustalone linie komórkowe ludzkiego glejaka wielopostaciowego (LN-229 i U87 MG), ludzkie pierwotne prawidłowe astrocyty (NHA), komórki PDX (*Patient-Derived Xenograft*) GBM12 ludzkiego glejaka wielopostaciowego oraz linię komórek mysiego glejaka wielopostaciowego (GL261 Red-FLuc), a także model bariery krew-mózg (gdzie barierę śródbłonkową stanowiły komórki śródbłonka mikrowaskularnego mózgu linii hCMEC/D3). Za najtrudniejszy i bardzo pracochłonny uważam model PDX GBM 12.

Podziw i uznanie budzi również ilość metod dobranych i wykorzystanych do realizacji projektu. Wszystkie są nowoczesne, zaawansowane jak również pracochłonne i czasochłonne, wymagające wiedzy i precyzji osoby wykonującej (np. badanie: poziomu ATP w komórkach, żywotności komórek aż czterema sposobami, cyklu komórkowego, ekspresji genu; western blotting, wysokosprawna chromatografia cieczowa, testy metaboliczne, mikroskopia kontrastowo-fazowa i fluorescencyjna, pomiary zmian transendotelialnej oporności elektrycznej).

Metody badawcze zastosowane przez Doktorantkę są właściwie dobrane i nowoczesne, a zastosowane testy statystyczne gwarantują prawidłowe wnioskowanie statystyczne. Cała metodologia i uzyskanie wartościowych wyników wskazują na staranność przeprowadzonych badań. Duży nakład pracy w przeprowadzeniu badań oraz analiza wyników wskazują na bardzo dobre przygotowanie mgr Joanny Stalińskiej do pracy laboratoryjnej, jak również dobre przygotowanie teoretyczne do analizowanych zagadnień. Współautorstwo prac Doktorantki podkreślają posiadanie zdolności organizacyjnych i umiejętności pracy w zespole multidyscyplinarnym. Cechy te są jak najbardziej niezbędne we współczesnej nauce.

Wyniki szczegółowych badań w zostały przedstawione w sposób niezwykle dobrze przemyślany, zaprezentowane w tabelach i na precyzyjnych rycinach, prezentujących zależności pomiędzy analizowanymi parametrami. Interpretacja wyników, z adekwatną oceną uzyskanych dowodów, jest dojrzała, obiektywna i wyważona. Opisując wyniki poszczególnych eksperymentów Doktorantka zwraca uwagę czytelnika i wyjaśnia skrupulatnie zasadność podjętego kolejnego eksperymentu lub zaprzestanie go. Autorka rozprawy zachowała należyty krytycyzm w interpretacji własnych wyników. Wszystko to dowodzi **umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę**. Dowodem na to są również opublikowane prace zawierające wyniki z przeprowadzonych badań, gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem.

W dyskusji dokonano interpretacji otrzymanych spostrzeżeń i wyników przy jednoczesnym zachowaniu krytycyzmu naukowego.

Wnioski wynikają z treści pracy, zostały trafnie sformułowane i świadczą o dużej zdolności Autorki do syntetycznej analizy uzyskanych wyników. Mam świadomość, jak trudne było sformułowanie precyzyjnych i zwięzłych wniosków z tak ogromnej ilości otrzymanych wartościowych i różnorodnych wyników.

Uwagę recenzenta zwróciły również wskazane przez Doktorantkę ograniczenia w pracy, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej i ostrożnym formułowaniu wniosków.

Niniejsza rozprawa to cenne i wartościowe źródło wiedzy, dostarczające niezwykle ważnych danych, które mogą okazać się pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmów działania pochodnych fenofibratu jak również potencjalnego ich zastosowania w leczeniu glejaka wielopostaciowego. Zaprezentowane przez Doktorantkę rezultaty badań oraz wynikające z nich wnioski zostały poprawnie sformułowane i stanowią przejrzystą odpowiedź

na założone cele. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki **wyznaczają również dalszy kierunek badań**. W pracy umieszczono rozbudowaną tabelę w danych uzupełniających stanowiącą wykaz i wyniki badań przesiewowych wpływu kolejnych 317 związków pochodnych fenofibratu na żywotność komórek linii LN-229.

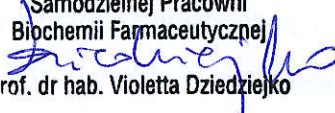
Praca doktorska przedstawiona do recenzji dowodzi znakomitej znajomości analizowanego tematu, warsztatu badawczego, olbrzymiego wkładu pracy i umiejętności interpretacyjnych niezbędnych do uzyskania założonych celów. Na uwagę zasługuje fakt, iż wyniki badań Doktorantki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania (*Transl Oncol. 2019, Sci Rep. 2019, Sci Rep. 2022*; sumaryczny IF 12,156 i łączna liczba punktów ministerialnych 350, cytowane 11 razy na dzień dzisiejszy). Mgr Joanna Stalińska w w/w pracach ma wiodący wkład w ich powstanie gdyż jest pierwszym autorem. Praca została właściwie zaplanowana, bardzo dobrze wykonana, a uzyskane wyniki dowodzą, iż patomechanizm glejaka wielopostaciowego ma bardzo złożony charakter i do dnia dzisiejszego nie wszystkie jej aspekty są poznane. Przedstawiona do oceny dysertacja wnosi nowe, cenne dane. **Otrzymane wyniki badań stanowią o oryginalności i nowatorskim charakterze dysertacji**. Sugerują również, konieczność prowadzenia dalszych badań mających na celu wyznaczenie potencjalnych możliwości uzyskania skutecznej terapii GBM z zastosowaniem pochodnych fenofibratu.

Ze względu na bardzo aktualny i ważny temat badawczy, podczas publicznej obrony chciałabym uprzejmie poprosić Doktorantkę o zwięzłe przybliżenie tematu innych nowoczesnych badań ukierunkowanych na skuteczną terapię glejaka wielopostaciowego.

Wniosek końcowy:

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytułach z zakresu sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz.455, z 2017 r., poz. 1789; z 2023 r. poz. 742). Mam przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Joanny Stalińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Biorąc pod uwagę wartość naukową, nowatorski charakter, bardzo szeroki zakres badań, świadczący o dużej samodzielności naukowej i badawczej Autorki oraz znaczenie poznawcze i praktyczne uzyskanych wyników oraz fakt opublikowania wartościowych wyników w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania **wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni
Biochemii Farmaceutycznej

prof. dr hab. Violetta Dziedzicko