

Recenzja rozprawy doktorskiej pani **Natalii Pudelko-Malik** pt. *„Zastosowanie podejścia metabolomicznego do analizy zmian plastyczności synaptycznej w oparciu o mysz model zwierzęcy oraz neuronalne pierwotne linie komórkowe”*. Praca przygotowana pod opieką prof. dr hab. Piotra Młynarza (promotor) oraz dr Dominiki Drulis-Fajdasz (promotor pomocniczy) w Zakładzie Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej oraz Zakładzie Fizjologii Molekularnej i Neurobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Przedmiotem pracy doktorskiej było opracowanie i przetestowanie nowej metody pomiaru poziomu związku BAY U6751 (inhibitora fosforylasy glikogenowej) w tkankach myszy oraz zastosowanie modelu badawczego wykorzystującego ten inhibitor do analizy metabolizmu energetycznego komórek nerwowych. Doktorantka w swojej pracy wykorzystwała narzędzia metabolomiczne do zrealizowania oryginalnego projektu dotyczącego bardzo ważnego zjawiska – zależności między metabolizmem komórkowym a funkcjami komórek nerwowych. Wysoko oceniam decyzję Doktorantki o podjęciu innowacyjnego tematu o dużym znaczeniu naukowym i równocześnie wysokim poziomie skomplikowania metodologicznego. Uwagę zwraca również multidyscyplinarność wybranego tematu, który mógłby być przedmiotem rozprawy doktorskiej w kilku różnych dyscyplinach naukowych.

Rozprawa doktorska pani Natalii Pudelko-Malik ma formę zbioru opublikowanych powiązanych tematycznie artykułów naukowych, uzupełnionych wprowadzeniem, omówieniem wyników i podsumowaniem, a także wymaganym streszczeniem. W skład cyklu wchodzi trzy publikacje doświadczalne opublikowane w latach 2022-2025:

[praca I] **Pudelko-Malik N**, Wiśniewski J, Drulis-Fajdasz D, Młynarz P. Validated liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of glycogenolysis phosphorylase inhibitor in mouse tissues - 5-isopropyl-4-(2-chlorophenyl)-1-ethyl-1,4-dihydro-6-methyl-2,3,5-pyridinetricarboxylic acid ester disodium salt hydrate. J Sep Sci. 2022 Oct;45(20):3791-3799. doi: 10.1002/jssc.202200454.

[praca II] **Pudelko-Malik N**, Drulis-Fajdasz D, Pruss Ł, Mielko-Niziałek KA, Rakus D, Gizak A, Młynarz P. A single dose of glycogen phosphorylase inhibitor improves cognitive functions of aged mice and affects the concentrations of metabolites in the brain. Sci Rep. 2024 Oct 15;14(1):24123. doi: 10.1038/s41598-024-74861-z.

[praca III] **Pudelko-Malik N**, Drulis-Fajdasz D, Fydryszewski M, Burgess S, Młynarz P, Rakus D, Deja S. Glucose-dependent metabolism of hippocampal primary neurons in response to chemically induced long-term potentiation. bioRxiv [Preprint]. 2025 Feb 25:2025.02.24.639988. doi: 10.1101/2025.02.24.639988.

Do druku pn. „Rozprawa Doktorska”, poza publikacjami tworzącymi zbiór i oświadczeniem Doktorantki określające jej udział w powstaniu tych publikacji, zostało włączone bardzo

obszerne i szczegółowe wprowadzenie do tematu pracy, przedstawienie zastosowanej metodyki badawczej, omówienie i podsumowanie uzyskanych wyników, a także prezentacja dorobku naukowego Doktorantki.

W pierwszej części wprowadzenia (Rozdział 1. Wstęp teoretyczny), Doktorantka omawia główne zagadnienia, których dotyczy praca: anatomię mózgu, funkcje i cechy metabolizmu komórek nerwowych, założenia i techniki stosowane w metabolomice, metody analizy danych metabolomicznych, a także klarownie przedstawia cel pracy (Rozdział 2. Cel pracy). W kolejnej części wprowadzenia (Rozdział 3. Metodologia), Kandydatka szczegółowo przedstawia modele badawcze i metodykę stosowaną w publikacjach tworzących zbiór. Prace tworzące zbiór przedstawione są jako „Rozdział 4. Wyniki” (każda z nich poprzedzona jest rozbudowanym streszczeniem). W kolejnej części druku (Rozdział 5) znajduje się podsumowanie i wnioski jakie płyną z prac tworzących zbiór. Napisane w języku polskim wprowadzenie/omówienie prac tworzących zbiór jest przedstawione w bardzo czytelnej, bogato ilustrowanej formie. Tekst przygotowany przez Doktorantkę jest dobrze napisany poprawnym językiem, a stosowany gdzieś żargon laboratoryjny (np. „eppendorfek”, „ekstrakty tkankowe rekonstruowano”, „poddano sonifikacji”, czy „Stymulacja LTP przeprowadzana była w Ringerze”) nie utrudnia znacząco lektury.

Zgodnie z ustawą Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Art. 187 ust. 3) „rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym monografia naukowa, zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, praca projektowa, konstrukcyjna, technologiczna, wdrożeniowa lub artystyczna, a także samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej”. Wydaje się, że intencją Doktorantki było wybranie formy „zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych”. Zgodnie z praktyką stosowaną w instytucjach nadających stopień doktora, w przypadku takiego wyboru „zbioru artykułów naukowych” obudowany jest wprowadzeniem i omówieniem, którego forma nie jest jednak szczegółowo określona w przepisach. W przypadku recenzowanej pracy to wprowadzenie/omówienie jest wyjątkowo rozbudowane i szczegółowe, a zaprezentowany druk ma wiele cech typowej pracy doktorskiej przygotowanej jako odrębny utwór.

Wadą przedstawionej dokumentacji jest jednak brak materiałów uzupełniających (*Supplementary Materials*) do publikacji tworzących cykl. Rozumiem problemy praktyczne związane z prezentacją takich danych, jednak Doktorantka powinna znaleźć sposób na ich dołączenie do dokumentacji (np. w formie nośnika elektronicznego). Brak jakiegokolwiek rozwiązania tej kwestii uniemożliwia Recenzentowi zapoznanie się z ważną częścią osiągnięcia Doktorantki (z przyczyn oczywistych recenzja powinna dotyczyć tylko materiałów formalnie stanowiących zawartość rozprawy).

Omówienie najważniejszych wyników zawartych w pracach tworzących zbiór.

Praca I. W pracy tej autorzy przedstawili wykorzystującą technikę LC-MS metodę szybkiego i selektywnego pomiaru stężenia związku BAY U6751 (inhibitor fosforylasy glikogenowej) w tkankach myszy. Czułość, swoistość, precyzja i stabilność metody pomiarowej została zwalidowana zgodnie z rekomendacjami Europejskiej Agencji Leków. Autorzy wykazali, że BAY U6751 ma zdolność przekraczania bariery krew-mózg, a związek podany do jamy otrzewnowej był wykrywany i oceniany ilościowo w różnych częściach mózgu. Wyniki pracy umożliwiły stworzenie nowego modelu doświadczalnego *in vivo*, dzięki któremu można obserwować wpływ zaburzenia metabolizmu glikogenu (i szerszych zmian metabolizmu komórkowego) na funkcje układu nerwowego, w tym na zachowanie i funkcje pamięci u myszy. Taki model *in vivo* pozwala na dużo szerszą i pełniejszą analizę związków metabolizmu energetycznego z funkcjami komórek nerwowych niż było to możliwe w dotychczas stosowanym modelu skrawków mózgu, przede wszystkim umożliwiając analizy behawioralne. Taki mysi model badawczy został już wykorzystany w kilku pracach naukowych zespołu, w tym w Pracy II z ocenianego zbioru.

Praca II. W pracy tej autorzy przedstawili wyniki eksperymentu, w którym myszom (1-miesięcznym i 20-22-miesięcznym) jednorazowo podawano inhibitor BAY U6751. Zespół ten zaobserwował wcześniej (praca Drulis-Fajdasz i wsp. 2023), że długotrwałe (2 tygodnie) podawanie tego związku poprawia funkcje poznawcze u zwierząt starych i zmienia profil proteomu hipokampu na porównywalny z profilem proteomu hipokampu zwierząt młodych. Celem Pracy II było zbadanie wpływu jednorazowego podania inhibitora BAY U6751 na metabolom różnych części mózgu (hipokamp, kora mózgowa i mózdzek) u myszy młodych i starych, oraz ocena wpływu zahamowania glikogenolizy na funkcje poznawcze badane testami behawioralnym. Testy te wykazały m.in., że zahamowanie glikogenolizy poprawiało pamięć przestrzenną (zależna od hipokampu) w grupie zwierząt starszych (i utratę konsolidacji pamięci u zwierząt młodych); wpływ inhibitora BAY U6751 był mniejszy w przypadku pamięci zależnej od kory mózgowej. Analiza metabolomiczna wykazała m.in., że hipokamp charakteryzuje się największą wrażliwością na zmiany związane z wiekiem. Co najistotniejsze, autorzy pracy wykazali, że zahamowanie glikogenolizy indukowało zmiany metaboliczne, dzięki którym metabolom hipokampu starszych zwierząt traktowanych BAY U6751 przypominał metabolom hipokampu kontrolnych myszy młodych. Obserwacja ta stanowi obiecującą przesłankę do hipotezy, że modulacja metabolizmu glikogenu może być podstawą strategii terapeutycznych w leczeniu deficytów poznawczych związanych ze starzeniem.

Praca III. W pracy tej autorzy analizowali wpływ stężenia glukozy na możliwość stymulacji funkcji neuronów (chemiczna indukcja tzw. *long-term potentiation*, LTP) w modelu badawczym *in vitro* wykorzystującym pierwotną hodowlę hipokampalnych komórek

nerwowych. Autorzy wykazali istotne różnice w metabolizmie komórek hodowanych w warunkach fizjologicznego (2,5 mM) i wysokiego nie fizjologicznego (25 mM) stężenia glukozy – to drugie jest wykorzystywane w wielu powszechnie stosowanych protokołach badawczych. Co jednak istotne, to że stymulacja funkcji neuronów (indukcja LTP) była podobna w obu warunkach doświadczalnych. Autorzy konkludują, że testy neurofizjologiczne *in vitro* powinny być prowadzone w warunkach fizjologicznego stężenia glukozy, gdyż wyższe jej stężenie rodzi ryzyko powstawania artefaktów wynikających z zaburzeń metabolizmu energetycznego. Obserwacja ta potwierdza konieczność kompleksowej optymalizacji i walidacji modeli badawczych, na co słusznie uwagę zwracają autorzy.

Prace tworzące cykl zostały opublikowane w języku angielskim w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: Praca I w czasopiśmie z Q2, a Praca II w czasopiśmie z Q1 w swoich dziedzinach (5-letni IF czasopism, w których opublikowano obie prace wynosi odpowiednio 2,7 oraz 5,4). Praca III została umieszczona w publicznie dostępnym repozytorium bioRxiv, co pozwala uznać ją za opublikowaną w rozumieniu ustawy.

Indywidualny udział Doktorantki w pracach tworzących zbiór.

W przypadku rozprawy doktorskiej opartej o współautorski cykl publikacji istotnym elementem recenzji jest ocena indywidualnego udziału Doktoranta w publikacjach stanowiących rozprawę. We wszystkich trzech publikacjach zawartych w zbiorze Doktorantka jest pierwszym autorem. Zgodnie oświadczeniem Doktorantki (Rozdział 4.1) była ona odpowiedzialna za metabolomiczną część eksperymentów: na podstawie analizy literatury przedmiotu opracowała założenia prac, wybrała i przygotowała metody pomiarowe, przygotowała próbki materiału biologicznego do analiz instrumentalnych, przeprowadziła pomiary, przeprowadziła analizę statystyczną i chemometryczną uzyskanych wyników, przygotowała ryciny i tabele ilustrujące uzyskane wyniki oraz przygotowała pierwsze wersje manuskryptów. Oświadczenie to jest spójne z informacjami o roli współautorów zawartymi w Pracy II i Pracy III. Należy więc uznać, że indywidualny wkład Doktorantki w prace wieloautorskie stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej spełnia kryteria określone w ustawie.

Ocena całościowego dorobku naukowego Doktorantki.

Poza trzema pierwszo-autorskimi pracami zawartymi w zbiorze tworzącym pracę doktorską, Doktorantka jest współautorem 7 innych publikacji (opublikowanych w latach 2021-2025), w tym dwóch dotyczących tematyki rozprawy doktorskiej. Łączny IF czasopism, w których opublikowano te prace wynosi ok. 80, a prace te były cytowane 61 razy (index-H Doktorantki wynosi obecnie 4). Doktorantka była również autorem prezentującym 11 doniesień konferencyjnych, w tym jednej prezentacji ustnej na konferencji międzynarodowej. Doktorantka odbyła również dwa kilkumiesięczne staże naukowe w renomowanym

zagranicznym centrum badawczym (UT Southwestern Medical Center w Dallas). Osiągnięcia Doktorantki zostały docenione szeregiem nagród i wyróżnień: stypendium Fundacji Kościuszkowskiej (2024), stypendium Wrocławskiego Centrum Akademickiego (2024), stypendium Politechniki Wrocławskiej w programie NAWA STER (2021) oraz nagrodami Rektora Politechniki Wrocławskiej (2020, 2024). Pani Natalia Pudełko-Malik jest więc zdolną badaczką, której dynamicznie wzrastający dorobek naukowy jest dostrzegany i doceniany przez środowisko naukowe.

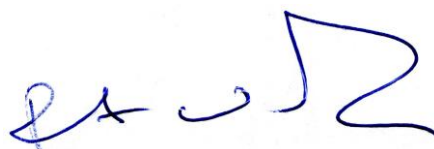
Podsumowanie.

Wybrana przez Doktorantkę tematyka dotyczyła oryginalnego i wymagającego metodologicznie problemu – znaczenia zmian metabolizmu komórkowego dla funkcji komórek nerwowych. Recenzowana rozprawa doktorska składa się z cyklu publikacji o wysokiej wartości merytorycznej, w których umieszczono wyniki o dużej wartości poznawczej i aplikacyjnej (opracowanie i zweryfikowanie modelu badawczego). Indywidualny udział Doktorantki w pracach tworzących rozprawę stanowi potwierdzenie jej wiedzy i umiejętności prowadzenia pracy naukowej. Nie mam istotnych uwag krytycznych do przedstawionego mi do oceny druku „Rozprawa Doktorska”.

Wniosek końcowy:

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska pani Natalii Pudełko-Malik w pełni spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o kontynuowanie postępowania i nadanie Jej stopnia doktora.

Jednocześnie, mając na względzie wysoką ocenę rozprawy, wnioskuję o rozważenie możliwości wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani Natalii Pudełko-Malik, jeśli spełnione są wymagania formalne obowiązujące w tej kwestii w Jednostce nadającej stopień doktora.



5 maja 2025

prof. dr hab. Piotr Widłak
Gdański Uniwersytet Medyczny