

Toruń, dnia 17 marca 2025 r.

dr hab. Paweł Piotr Pomastowski, prof. UMK
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Recenzja rozprawy doktorskiej

Przedmiotem niniejszej recenzji jest rozprawa doktorska Pani mgr inż. Natalii Pudełko-Malik, zatytułowana *„Zastosowanie podejścia metabolomicznego do analizy zmian plastyczności synaptycznej w oparciu o mysz model zwierzęcy oraz neuronalne pierwotne linie komórkowe”*. Dysertacja została złożona w celu uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne. Praca została przygotowana w ramach przewodu doktorskiego prowadzonego przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Piotr Młynarz, natomiast funkcję promotora pomocniczego pełniła dr Dominika Drulis-Fajdasz.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Natalii Pudełko-Malik wpisuje się w interdyscyplinarny obszar badawczy łączący zagadnienia z zakresu chemii bioanalitycznej, neurobiologii oraz metabolomiki, koncentrując się na złożonej problematyce zmian metabolicznych towarzyszących procesowi starzenia się tkanki nerwowej. Praca podejmuje próbę oceny roli metabolizmu glikogenu oraz funkcjonowania tzw. czółenka astrocytarno-neuronalnego w regulacji plastyczności synaptycznej, z wykorzystaniem zarówno modelu zwierzęcego (myszy w dwóch przedziałach wiekowych), jak i hodowli pierwotnych komórek nerwowych. Autorka zdecydowała się na formę rozprawy opartą na zbiorze publikacji, co jest obecnie powszechnie akceptowaną strukturą dysertacji w środowisku naukowym, zwłaszcza w przypadku badań eksperymentalnych o dużym wymiarze aplikacyjnym i wysokim stopniu złożoności metodycznej. Podejście to umożliwia przedstawienie materiału badawczego w oparciu o recenzowane artykuły naukowe, co z jednej strony potwierdza jakość i oryginalność uzyskanych wyników, a z drugiej – stanowi istotny element dokumentacji wkładu kandydatki w rozwój danej dziedziny wiedzy. Na poziomie ogólnym należy podkreślić, że przedstawiona rozprawa jest osadzona w aktualnym kontekście badań nad fizjologią i patofizjologią ośrodkowego układu nerwowego, ze szczególnym uwzględnieniem związków pomiędzy procesami energetycznymi a mechanizmami odpowiedzialnymi za uczenie się, pamięć oraz neuroplastyczność. Autorka wykazuje znajomość bieżącego stanu wiedzy w omawianym obszarze, co znajduje odzwierciedlenie zarówno w doborze problemów badawczych, jak i przyjętej strategii analitycznej. Rozprawa stanowi efekt pracy badawczej prowadzonej w dwóch instytucjach akademickich – Politechnice Wrocławskiej oraz Uniwersytecie Wrocławskim – co podkreśla jej interdyscyplinarny charakter oraz wskazuje na szeroki zakres kompetencji, które były niezbędne do realizacji całości projektu. Praca została przygotowana starannie zarówno pod względem językowym, jak i edytorskim. Styl wypowiedzi





jest klarowny, a argumentacja naukowa zachowuje spójność i logikę w przedstawianiu kolejnych etapów badawczych. Część teoretyczna pracy obejmuje kompleksowy przegląd literatury z zakresu metabolizmu energetycznego w układzie nerwowym, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu ANLS (ang. astrocyte-neuron lactate shuttle), metabolizmu glikogenu w OUN oraz zastosowań metabolomiki w badaniach nad funkcją mózgu. Należy podkreślić, że przegląd ten jest nie tylko obszerny, ale również dobrze ustrukturyzowany i krytyczny. Autorka wykazuje umiejętność selekcji istotnych źródeł oraz ich analizy pod kątem aktualności i znaczenia dla formułowanego problemu badawczego. Bibliografia uwzględnia zarówno klasyczne pozycje z zakresu neurochemii, jak i najnowsze doniesienia dotyczące narzędzi omicznych i bioanalitycznych. Część metodologiczna pracy jest rozbudowana i dobrze udokumentowana. Zastosowane metody, zarówno eksperymentalne (hodowle pierwotne, badania na modelu zwierzęcym, testy behawioralne), jak i analityczne (LC-MS, GC-MS, NMR), zostały dobrane adekwatnie do postawionych hipotez badawczych. Autorka szczegółowo opisuje procedury ekstrakcji, derywatyzacji, walidacji metod pomiarowych oraz sposoby analizy danych statystycznych i chemometrycznych. Na uwagę zasługuje przeprowadzenie pełnej walidacji metody LC-MS zgodnie z wytycznymi EMA, co świadczy o wysokiej świadomości metrologicznej oraz kompetencjach w zakresie bioanalityki. Również procedury związane z analizą widm NMR zostały przeprowadzone z należytą starannością, z uwzględnieniem etapów korekcji, normalizacji oraz identyfikacji metabolitów. Wyniki przedstawiono w oparciu o trzy publikacje naukowe, z których dwie zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych na liście JCR (J.Sep.Sci IF = 3,2 oraz Sci.Rep IF = 4.6), natomiast trzecia – na etapie preprintu – dotyczy badań na hodowlach pierwotnych neuronów. Dane zostały zaprezentowane w sposób przejrzysty, z wykorzystaniem stosownych narzędzi wizualizacji i analizy statystycznej (PCA, OPLS-DA). Interpretacja wyników jest konsekwentna, odnosi się do sformułowanych wcześniej celów i hipotez badawczych, a także uwzględnia możliwe ograniczenia zastosowanych metod. Autorka prezentuje wnioski oparte na analizie zmian metabolomicznych w tkankach i komórkach nerwowych, zwracając uwagę na zależności pomiędzy stężeniem glukozy, aktywnością synaptyczną oraz efektywnością hamowania glikogenolizy.

Wnioski końcowe pracy są zwięzłe, dobrze uporządkowane i wynikają logicznie z przedstawionych danych. Autorka wskazuje na możliwość wykorzystania inhibitora BAY U6751 jako narzędzia do badania mechanizmów regulujących plastyczność synaptyczną w warunkach fizjologicznych i starzeniowych. Szczególnie interesujące są obserwacje wskazujące na potencjalny efekt ochronny hamowania glikogenolizy u osobników starszych, co – w ujęciu translacyjnym – może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad strategiami terapeutycznymi w kontekście starzenia się układu nerwowego.

Uwagi ogólne należy zakończyć stwierdzeniem, iż – mimo stosunkowo szerokiego zakresu tematycznego – Autorka z powodzeniem integruje różne poziomy analizy biologicznej i chemicznej, a podjęta przez nią próba interpretacji zmian metabolicznych w kontekście starzenia się mózgu wydaje się dobrze uzasadniona oraz oparta na adekwatnych danych eksperymentalnych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Pudełko-Malik liczy łącznie 182 stron, została napisana w języku polskim (z wyjątkiem angielskich przedruków manuskryptów) i sporządzona zgodnie





z obowiązującymi standardami edytorskimi. Układ treści jest przejrzysty, a poszczególne części – od wprowadzenia teoretycznego, poprzez cele i metody badań, aż po podsumowanie i dorobek naukowy – tworzą logiczną, spójną strukturę pracy. Praca składa się z siedmiu rozdziałów, poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim. Rozdział pierwszy zawiera rozbudowany i szczegółowy przegląd literatury, w którym Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z metabolizmem energetycznym mózgu, plastycznością synaptyczną oraz zastosowaniem metod omicznych, ze szczególnym uwzględnieniem metabolomiki. Część teoretyczna została opracowana z dużą starannością, a cytowana literatura jest aktualna i obejmuje zarówno podstawowe opracowania, jak i najnowsze prace badawcze z czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym. W pracy przywołano łącznie 142 pozycje literaturowe, w tym przeważają publikacje z tzw. listy filadelfijskiej, co wskazuje na rzetelność doboru źródeł oraz znajomość aktualnego stanu wiedzy. Język pracy jest poprawny, precyzyjny i dostosowany do charakteru naukowego rozprawy. Styl wypowiedzi pozostaje spójny, a użyte nazewnictwo zgodne z terminologią stosowaną w naukach chemicznych i biomedycznych. W tekście nie stwierdzono poważnych uchybień językowych ani błędów merytorycznych, choć w niektórych miejscach można byłoby rozważyć uproszczenie składni lub skrócenie zbyt długich akapitów – nie wpływa to jednak znacząco na klarowność przekazu. Ilustracje, schematy, tabele i ryciny zostały dobrane adekwatnie do treści i pełnią funkcję pomocniczą w prezentacji danych eksperymentalnych. Ich jakość graficzna jest wysoka, a opisy szczegółowe i jednoznaczne. Wszystkie elementy wizualne są prawidłowo ponumerowane i cytowane w tekście, co świadczy o staranności redakcyjnej. Tabele zawierają kompletne informacje liczbowe, a dane są prezentowane z uwzględnieniem miar błędu i istotności statystycznej. Na osobną uwagę zasługuje poprawność cytowania źródeł oraz stosowanie przypisów bibliograficznych. Odniesienia do literatury zostały umieszczone w odpowiednich miejscach tekstu, a lista cytowanych pozycji opracowana została według jednolitego systemu. W bibliografii nie stwierdzono przypadków nieuzasadnionych autocytowań ani nadużywania źródeł wtórnych. Z punktu widzenia formalnego praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim – zarówno pod względem objętości, jak i przejrzystości struktury, jakości językowej oraz staranności edytorskiej. Praca została przygotowana samodzielnie i zgodnie z zasadami dobrej praktyki akademickiej, co potwierdzają również oświadczenie autorskiej załączone do dysertacji. Pani mgr inż. Natalia Pudełko-Malik przedłożyła rozprawę doktorską w formule zbioru publikacji naukowych. Praca obejmuje trzy pozycje, z których dwie zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR), natomiast trzecia została udostępniona w formie preprintu. Pierwsza publikacja dotyczy walidacji nowej metody bioanalitycznej LC-MS do oznaczania inhibitora fosforylasy glikogenowej BAY U6751 w tkankach zwierzęcych. Praca ta ma charakter metodyczny i została opublikowana w czasopiśmie recenzowanym, co świadczy o jej jakości merytorycznej i spełnieniu wymogów technicznych w zakresie analityki biofarmaceutycznej. Autorka jest pierwszym autorem publikacji i w znaczącym stopniu uczestniczyła w opracowaniu i wdrożeniu tej metody. Druga publikacja, również o charakterze oryginalnym, prezentuje wyniki badań nad wpływem inhibicji glikogenezycji na funkcje poznawcze oraz profil metabolomiczny wybranych struktur mózgowych u myszy w różnym wieku. Zawiera kompleksowe analizy NMR oraz testy behawioralne, co wskazuje na umiejętność integracji wyników z różnych poziomów badań biologicznych. W tej pracy Autorka również figuruje jako





pierwszy autor i była odpowiedzialna za całość eksperymentów oraz interpretację wyników. Trzecia część rozprawy, obecnie w formie manuskryptu preprintowego, prezentuje eksperymenty przeprowadzone na hodowlach pierwotnych neuronów hipokampalnych, w których oceniano wpływ glukozy i inhibitora BAY na odpowiedź metabolomiczną komórek nerwowych po stymulacji LTP. Mimo że praca ta nie została jeszcze formalnie opublikowana, poziom jej przygotowania i zakres analiz świadczą o zaawansowanym stopniu realizacji i dojrzałości naukowej Autorki.

Poza publikacjami ściśle związanymi z tematyką rozprawy, doktorantka wykazała się aktywnością w postaci współautorstwa innych prac naukowych oraz uczestnictwa w konferencjach krajowych i międzynarodowych. W dokumentacji zawartej w rozdziale szóstym dysertacji wymienione zostały liczne wystąpienia konferencyjne, zarówno ustne, jak i posterowe, świadczące o zaangażowaniu Autorki w prezentację wyników badań na forum środowiska naukowego. Ponadto, Autorka odbyła staże naukowe i była beneficjentką stypendiów o charakterze projakościowym, co również dokumentuje jej aktywność i motywację badawczą. Na podstawie przedstawionej dokumentacji należy uznać, że dorobek naukowy doktorantki, zarówno ilościowo, jak i jakościowo, odpowiada standardom stawianym kandydatom do stopnia naukowego doktora. Szczególnie istotny jest fakt, że Autorka była główną wykonawczynią i pierwszym autorem wszystkich publikacji wchodzących w skład rozprawy, co jednoznacznie potwierdza jej samodzielność badawczą.

Szczegółowo. Rozdział szósty rozprawy doktorskiej zawiera pełne zestawienie dorobku naukowego mgr inż. Natalii Pudełko-Malik, z wyszczególnieniem publikacji powiązanych bezpośrednio z tematyką dysertacji, a także prac niezależnych, udziału w konferencjach naukowych, odbytych staży oraz przyznanych stypendiów i nagród.

Autorka wykazała się bardzo dobrą aktywnością publikacyjną. W ramach pracy doktorskiej opublikowała **łącznie 6 prac naukowych (Rozdział 6.1.)**. Oprócz publikacji związanych z dysertacją, w rozdziale 6.2 wykazano **cztery inne publikacje naukowe**, w których Autorka uczestniczyła jako współautorka. Obejmują one tematy pokrewne, m.in. z zakresu analizy chemicznej, biologii molekularnej oraz metod instrumentalnych, co potwierdza szerokie spektrum kompetencji badawczych oraz zaangażowanie we współpracę interdyscyplinarną. Również w tych przypadkach publikacje te ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych, w większości indeksowanych w bazach WoS i Scopus. W zakresie aktywności konferencyjnej Autorka brała czynny udział w **11 konferencjach naukowych**, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych. Wystąpienia obejmowały zarówno prezentacje ustne, jak i postery naukowe, w tym w ramach wydarzeń poświęconych neurochemii, metabolomice oraz technikom analizy instrumentalnej. Udział w konferencjach był udokumentowany m.in. w formie abstraktów opublikowanych w materiałach konferencyjnych, a niektóre z wystąpień zostały nagrodzone lub wyróżnione. W dalszej części rozdziału Autorka dokumentuje **cztery odbyte staże naukowe**, w tym dwa zagraniczne. Staże te odbywały się m.in. w instytucjach o wysokim profilu badawczym i dotyczyły doskonalenia umiejętności w zakresie spektrometrii mas, analizy bioinformatycznej oraz pracy z kulturami komórkowymi. Tego typu doświadczenia są szczególnie cenne w kontekście realizacji projektu o charakterze interdyscyplinarnym, jaki przedstawiono w rozprawie. W sekcji poświęconej wyróżnieniom





i wsparciu finansowemu wykazano otrzymanie **pięciu stypendiów naukowych**, w tym stypendium rektora dla najlepszych doktorantów oraz dwóch nagród wewnętrznych za osiągnięcia badawcze. Wskazuje to na uznanie dotychczasowej aktywności Autorki w macierzystych jednostkach naukowych.

Rozprawa mgr inż. Natalii Pudełko-Malik została przygotowana z dużą starannością merytoryczną i edytorską. W trakcie lektury nie odnotowano błędów rzeczowych, które podważyłyby wiarygodność przedstawionych danych czy wniosków. Niemniej, poniżej przedstawiam kilka uwag szczegółowych i pytań, które mogą być przydatne w kontekście ewentualnej dyskusji podczas obrony rozprawy lub przyszłych prac Autorki. Po pierwsze, w rozdziale poświęconym badaniom na hodowlach pierwotnych (publikacja trzecia), interesujące byłoby doprecyzowanie, w jakim stopniu stężenia glukozy zastosowane w eksperymencie (2,5 mM vs. 25 mM) odpowiadają rzeczywistym warunkom fizjologicznym *in vivo*. Wprawdzie Autorka słusznie wskazuje, że standardowe media zawierają glukozę w nadmiarze, ale warto byłoby rozszerzyć komentarz o bezpośrednie odniesienie do poziomów glukozy w płynie mózgowo-rdzeniowym myszy i ich zmienności w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Po drugie, we wszystkich trzech pracach zastosowano bardzo zaawansowaną analizę chemometryczną (PCA, OPLS-DA), która została poprawnie przeprowadzona, ale warto byłoby rozważyć uzupełnienie danych o walidację niezależnymi metodami statystycznymi, np. permutacyjnym testem istotności modeli OPLS lub analizą ROC (ang. Receiver Operating Characteristic), szczególnie przy ograniczonej liczebności grup. Trzecia kwestia dotyczy użycia inhibitora BAY U6751. Praca zawiera bardzo dokładną charakterystykę jego walidacji metodą LC-MS oraz wykazanie przenikania przez barierę krew–mózg. Jednakże interesujące byłoby poznanie opinii Autorki na temat jego specyficzności wobec izoform fosforylasy glikogenowej w różnych typach komórek mózgu – czy w świetle najnowszych danych możliwe jest oddziaływanie pozareceptorowe lub niespecyficzne interakcje z innymi enzymami metabolizmu glukozy? Na koniec należy podkreślić, że pomimo interdyscyplinarnego charakteru rozprawy, Autorka w większości przypadków zachowuje równowagę między opisem metod chemicznych a interpretacją biologiczną. Jedynie miejscami – zwłaszcza w rozdziałach poświęconych roli ANLS – możliwe byłoby nieco szersze rozwinięcie implikacji neurofizjologicznych obserwowanych zjawisk, choć nie jest to zarzut, a raczej sugestia poszerzenia kontekstu w dalszych etapach pracy naukowej.

Wniosek końcowy

Zdaniem recenzenta praca mgr inż. Natalii Pudełko-Malik spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668, z późn. zm.). Wnoszę zatem, aby Wysoka Rada dopuściła Panią mgr inż. Natalię Pudełko-Malik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z pełnym przekonaniem stawiam również wniosek o wyróżnienie przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie





Dysertacja ma wyraźnie zarysowany i aktualny problem badawczy, została zrealizowana z wykorzystaniem zaawansowanego warsztatu metodycznego, a wyniki prac mają charakter oryginalny i poznawczo istotny. Autorka wykazała się samodzielnością badawczą oraz interdyscyplinarnym podejściem, łączącym nowoczesne narzędzia chemii analitycznej i biologii systemowej z wiedzą z zakresu neurobiologii. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż rozprawa została przygotowana w formule zbioru publikacji, z czego dwie zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych z listy JCR, a trzecia została udostępniona jako manuskrypt preprintowy. We wszystkich pracach doktorantka pełniła rolę pierwszego autora, co świadczy o jej wiodącym udziale w realizacji badań i opracowaniu wyników. Przedstawiony dorobek naukowy, obejmujący ponadto publikacje dodatkowe, czynny udział w konferencjach krajowych i zagranicznych, odbycie staży naukowych oraz uzyskane stypendia, wskazuje na systematyczną i świadomą aktywność naukową doktorantki. Biorąc pod uwagę poziom naukowy pracy, samodzielność i jakość wykonanych badań, a także wartość poznawczą i aplikacyjną uzyskanych wyników, wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Natalii Pudełko-Malik do publicznej obrony rozprawy doktorskiej, a jednocześnie, mając na uwadze wyróżniający się charakter pracy, jej kompleksowość i jakość publikacji stanowiących jej podstawę, wnioskuję o przyznanie rozprawie doktorskiej wyróżnienia.

dr hab. Paweł Pomastowski, prof. UMK