



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

Białystok, 05.08.2025

Kochana panna
dona o zdrowie

Z-ca Przewodniczącej
Rady Dyscypliny Nauki Medyczne
prof. dr hab. Tomasz Grzybowski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Warmuzińskiej

pt. „Analiza lipidomiczna w diagnostyce transplantacyjnej”

sporządzona na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Nauki Medyczne

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Mgr Natalia Warmuzińska ukończyła studia magisterskie na kierunku Analityka Medyczna w Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w 2016 roku. Po ukończeniu studiów rozpoczęła studia doktoranckie w dziedzinie nauk medycznych, dyscyplinie biologia medyczna w macierzystej Uczelni. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku Starszego Specjalisty Inżynierjno-Technicznego w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Kandydatka spełnia ustawowy wymóg posiadania tytułu zawodowego magistra.

Pani Magister jest współautorką 13 publikacji (o łącznej wartości IF 67,735, punktacji MNiSW 1480) dwóch rozdziałów w monografiach naukowych oraz 14 doniesień prezentowanych podczas konferencjach krajowych i zagranicznych. Dorobek ten świadczy o ogromnej pracowitości i zaangażowaniu Doktorantki.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Warmuzińskiej ma formę zbioru sześciu powiązanych tematycznie publikacji wieloautorskich: dwóch poglądowych i czterech oryginalnych. Prace te opublikowano w latach 2020-2024 w recenzowanych czasopismach o łącznym współczynniku wpływu IF 22,955, punktacji MNiSW 650. W trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, w pozostałych jednym z dwóch równorzędnych pierwszych autorów. Kopie prac zawarte są w rozprawie. Promotorem rozprawy jest wybitna specjalistka z zakresu bioanalizy prof. dr hab. n. farm. Barbara Bojko.

Pani Magister przedstawiła oświadczenia współautorów dotyczące ich udziału w badaniach przedstawionych w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Z dokumentów wynika, że Kandydatka pełniła w przygotowaniu tych prac rolę znaczącą, m. in.: gromadziła literaturę i przeprowadziła jej analizę, wykonywała analizy instrumentalne, uczestniczyła w interpretacji wyników, analizie statystycznej i wizualizacji danych, przygotowywała manuskrypty oraz wprowadzała poprawki w trakcie procesu publikacyjnego. Na



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

przeprowadzenie badań przedstawionych w dysertacji uzyskano zgody Komisji Bioetycznej przy UMB w Toruniu.

Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną mgr Natalii Warmuzińskiej w zakresie dyscypliny nauk medycznych w obszarze niezwykle ważnego problemu badawczego jak i klinicznego - niedoboru nerek do transplantacji oraz możliwości rozwiązania tego wyzwania. Wstęp (Rozdział 5), publikacje przeglądowe oraz wstępy do pozostałych prac zawartych w rozprawie stanowią przegląd aktualnej literatury i argumentację zasadności podjęcia badań będących przedmiotem rozprawy. Z analizy literatury dokonanej przez Doktorantkę wynika, że liczba pacjentów oczekujących na przeszczep nerki gwałtownie rośnie, co prowadzi do coraz większej dysproporcji między zapotrzebowaniem na narządy a dostępnością nerek do transplantacji. Niedobór organów powoduje wykorzystywaniem nerek marginalnych od dawców rozszerzonych kryteriów (ECD), w celu zwiększenia puli dawców i skrócenia czasu oczekiwania pacjentów z schyłkową niewydolnością nerek. Przeszczepy od dawców ECD wiążą się z gorszymi wynikami niż te od dawców spełniających standardowe kryteria m.in. ze zwiększonym ryzykiem opóźnionego podjęcia funkcji przez przeszczep lub pierwotną niewydolnością przeszczepu. Istnieje zatem konieczność opracowania metod oceny jakości przeszczepu, zwłaszcza w przypadku ECD. Obecnie ocena jakości nerek do przeszczepu polega głównie na analizie badań laboratoryjnych dawcy, klinicznych wskaźników ryzyka, ocenie wizualnej narządu oraz niekiedy - biopsji i parametrów perfuzji. Jak wskazuje mgr Natalia Warmuzińska w ostatnich latach rozwinęły się narzędzia analityczne umożliwiające dokładniejsze badanie jakości narządów, takie jak nowoczesne techniki obrazowania, transkryptomika, genomika, proteomika, metabolomika, lipidomika oraz innowacje w zakresie perfuzji narządów. Podejścia te pozwalają na identyfikację mechanizmów uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego i odrzutu przeszczepu. Podsumowaniem przeglądu literatury oraz oceną mocnych i słabych stron obecnie stosowanych metod diagnostycznych oraz najnowszych strategii w zakresie oceny jakości przeszczepów jest pierwsza z prac stanowiących rozprawę doktorską – „A review of current and emerging trends in donor graft-quality assessment techniques” (J. Clin. Med., 2022).

Analiza literatury dokonana przez Doktorantkę ponadto wskazała, iż jednym ze sposobów na zwiększenie dostępności narządów do przeszczepów jest rozwój metod analitycznych umożliwiających lepszą ocenę jakości narządów. Jako narzędzie umożliwiających ocenę funkcji przeszczepu oraz profilowanie narządów poddanych różnym protokołom konserwacji wskazana została mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME). Podsumowanie literatury w zakresie zastosowania SPME w kontekście wyzwań analitycznych związanych z różnymi typami próbek wykorzystywanych w okresie okołoperacyjnym



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

wskazujące na potencjał tej techniki jako narzędzia diagnostycznego stanowi druga z prac zawartych w ocenianej rozprawie doktorskiej – „Solid phase microextraction – a promising tool for graft quality monitoring in solid organ transplantation” (Separations, 2023, 10, 153).

Szczegółowa analiza literatury pozwoliła Doktorantce na precyzyjne wskazanie celu badań realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej. Przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej są nowatorskie, oryginalne badania nad rozwiązaniem problemu niskiej skuteczności diagnostyki około transplantacyjnej poprzez ocenę przydatności metody SPME do analizy jakości nerek wykorzystywanych do przeszczepów. Badania te stanowią nowatorskie podejście analityczne, polegające na bezpośrednim badaniu tkanki *in vivo* za pomocą SPME - chemicznej biopsji, połączonej z analizą profilu lipidomicznego i metabolomicznego. W początkowej fazie eksperymentów zastosowano model zwierzęcy, aby zbadać wpływ niedokrwienia na stan narządu, uwzględniając dwa typy dawców oraz porównując metody przechowywania narządów i ich wpływ na lipidom nerek. Ostatecznym celem była ocena możliwości wykorzystania techniki SPME do zidentyfikowania nowatorskiego panelu metabolitów i lipidów, które mogą mieć znaczenie diagnostyczne w ocenie jakości przeszczepianego narządu oraz pozwolą prognozować ryzyko powikłań w praktyce klinicznej u pacjentów z przeszczepem nerek.

Pierwsza z prac eksperymentalnych zawartych w rozprawie doktorskiej („Using a chemicalbiopsy for graft quality assessment” Jove-J. Vis. Exp. 2020, 160, e60946) ma formę filmu video oraz przedstawia niskoinwazyjny protokół biopsji chemicznej pozwalającej na wielokrotne pobieranie próbek z tej samej tkanki, co umożliwia śledzenie zmian zachodzących w narządzie na wszystkich etapach procedury przeszczepienia - od pobrania narządu, przez jego przechowywanie, aż po reperfuzję. Zastosowana mikroekstrakcja do fazy stałej pozwoliła na kompleksową analizę metabolomiczną i lipidomiczną niskocząsteczkowych związków obecnych w nerkach przeznaczonych do przeszczepienia. Niewielki rozmiar sondy SPME umożliwił bezpośrednie pobranie metabolitów z narządu bez pobierania fragmentów tkanki. Połączenie tej innowacyjnej metody poboru próbek z wysokorozdzielczą spektrometrią mas umożliwiło identyfikację charakterystycznych związków chemicznych, które mogą pełnić rolę biomarkerów jakości przeszczepu oraz wskaźników ryzyka rozwoju jego dysfunkcji. Warty podkreślenia jest, iż przygotowany przez Doktorantkę profesjonalny materiał video, którym jest publikacja, pozwala na łatwe zrozumienie i nauczanie się prezentowanej procedury przez zespoły, które zdecydują się na wykorzystanie prezentowanej techniki.

Opracowany protokół Doktorantka wykorzystwała w kolejnym etapie badań *in vitro*. Nerki świń poddano wielokrotnemu pobieraniu próbek sondami SPME w różnych momentach procedury, aby śledzić zmiany zachodzące w narządzie na różnych etapach procedury



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

transplantacyjnej. Przeprowadzono autotransplantację nerek w modelu świńskim, symulując dwie ścieżki dawstwa: dawcy z bijącym sercem (HBD) oraz dawcy po zatrzymaniu krążenia (DCD). Przeszczepy były poddane ciągłej normotermicznej perfuzji *ex vivo*. Profilowanie metabolomiczne i lipidomiczne, przeprowadzone za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, ujawniło różnice pomiędzy nerkami HBD i DCD. Zmiany dotyczyły głównie metabolizmu energetycznego i glukozy oraz poziomów aminokwasów egzogennych, nukleozydów purynowych, lizofosfocholin, fosfoetanolamin i trójglicerydów. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę potwierdziły zasadność zastosowania biopsji chemicznej w ocenie jakości przeszczepów i monitorowaniu funkcji nerek podczas perfuzji (praca numer 4 w rozprawie - Metabolomic and lipidomic landscape of porcine kidney associated with kidney perfusion in heart beating donors and donors after cardiac death. Transl Res., 2024, 267:79-90).

Wyniki uzyskane w powyższych badaniach pozwoliły Pani Magister na realizację kolejnego etapu badań - oceny wpływu technik konserwacji hipotermicznej i normotermicznej na profil lipidomiczny nerki przy użyciu mikroekstrakcji do fazy stałej jako metody poboru i preparatyki próbki. Doktorantka porównała trzy metody konserwacji nerek: hipotermii prostej (SCS), hipotermicznej perfuzji maszynowej (HMP) oraz normotermicznej perfuzji maszynowej (NEVKP) w kontekście jakości przeszczepu, wykorzystując profilowanie lipidomiczne i metodę SPME. Uzyskane wyniki wykazały, że normotermiczna perfuzja *ex vivo* (NEVKP) korzystnie wpływa na profil lipidowy narządu, w przeciwieństwie do metod hipotermicznych (SCS, HMP), które wiążą się z wyższym poziomem lipidów związanych z uszkodzeniami komórkowymi. NEVKP może więc poprawiać jakość przeszczepu. Badania Doktorantki potwierdziły ponadto skuteczność metody SPME w monitorowaniu zmian metabolicznych w czasie (publikacja numer 5 - The impact of normothermic and hypothermic preservation methods on kidney lipidome—comparative study using chemical biopsy with microextraction probes. Front. Mol. Biosci., 2024, 11, 1341108).

Ostatni etap badań stanowiła weryfikacja założeń głównego celu badawczego rozprawy doktorskiej Natalii Warmuzińskiej. Doktorantka przeprowadziła analizy metabolomiczne i lipidomiczne tkanek nerek dawców oraz osocza biorców w różnych punktach czasowych, w celu identyfikacji związków chemicznych mogących przewidywać ryzyko opóźnionej funkcji przeszczepu (DGF). Wykorzystała SPME jako "biopsję chemiczną" do analizy nerek, a cienkowarstwową mikroekstrakcję do wysokoprzepustowego przygotowania próbek osocza. Po analizie uzyskanych danych z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas zastosowała algorytm „random forest” w celu wytypowania związków o potencjale prognostycznym dla oceny ryzyka DGF przed



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

przeszczepieniem. Porównanie profili metabolomicznych i lipidomicznych osocza biorców we wczesnych dniach po operacji pozwoliło na identyfikację metabolitów różnicujących pacjentów z DGF i bez DGF. Zidentyfikowane związki to głównie aminokwasy i ich pochodne, nukleotydy, kwasy organiczne, peptydy oraz lipidy głównie z grupy fosfolipidów i trójglicerydów. Badanie to potwierdziło duży potencjał biopsji chemicznej i analizy metabolitów osocza w ocenie ryzyka DGF oraz nieinwazyjnym monitorowaniu powikłań po przeszczepie co stanowi realizację głównego celu badawczego wskazanego w niniejszej rozprawie. Zidentyfikowane metabolity stanowią podstawę do opracowania metody oceny i nadzoru nad DGF w praktyce klinicznej (publikacja numer 6 Dysertacji - Metabolomic and lipidomic profiling for pre-transplant assessment of delayed graft function risk using chemical biopsy with microextraction probes. Int. J. Mol. Sci., 2024, 25, 13502)

Podsumowaniem przeprowadzonych badań jest sześć syntetycznych wniosków, które przedstawiają najistotniejsze elementy poznawcze pracy. O dojrzałości naukowej Doktorantki świadczy ostatni wniosek, w którym wskazuje konieczność rozwinięcia badań z wykorzystaniem większych grup pacjentów. Strona edytorska pracy nie budzi wątpliwości. Rozprawa jest napisana w sposób zrozumiały i staranny. Zgodnie z wymogiem ustawowym do rozprawy dołączone jest streszczenie w języku angielskim (Rozdział 4).

Rozprawę doktorską mgr Natalii Warmuzińskiej oceniam jak bardzo dobrą. Pani Magister zrealizowała wszystkie założone, zaawansowane cele badawcze. Do badań wykorzystwała nowoczesne metody instrumentalne, chemometrię oraz modele *in vivo*. Rozprawa doktorska mgr Natalii Warmuzińskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i klinicznego jakim są niedobory nerek i ich jakość do przeszczepów tego narządu. Pani Magister wskazała, że zastosowanie SPME w warunkach klinicznych pozwala na predykcję ryzyka wystąpienia powikłań oraz zidentyfikowała panel metabolitów i lipidów o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym w postępowaniu transplantacyjnym nerki. Wyniki badań zawarte w rozprawie doktorskiej mają zatem charakter zarówno poznawczy jak i aplikacyjny. Rozprawa doktorska jest dowodem na umiejętność mgr Natalii Warmuzińskiej samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

Ze względu na przygotowanie rozprawy doktorskiej w formie zbioru publikacji, które z pewnością zostały poddane szczegółowej, krytycznej analizie w trakcie procesu publikacyjnego nie mam uwag do tych prac. Ich opublikowanie z pewnością wymagało odniesienia się do szeregu uwag recenzentów powołanych przez redakcję czasopism. Z punktu widzenia recenzenta interesujące są plany mgr Natalii Warmuzińskiej dotyczące rozwinięcia przedstawionych w rozprawie badań.



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Analizy i Bioanalizy Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Natalii Warmuzińskiej pt. „Analiza lipidomiczna w diagnostyce transplantacyjnej” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz. 1571) w związku z czym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy z wnioskiem o nadanie mgr Natalii Warmuzińskiej stopnia doktora w dyscyplinie nauk medycznych.

Z uwagi na wysoki poziom naukowy rozprawy oraz aplikacyjny charakter wyników badań w niej przedstawionych, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Natalii Warmuzińskiej.

prof. dr hab. Wojciech Milyk



Signed by /
Podpisano przez:

Wojciech Milyk

Date / Data:
2025-08-05 11:34