



MEDICAL
UNIVERSITY
OF WARSAW

DEPARTMENT OF DRUG CHEMISTRY,
PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

Z-ca Przewodniczącej
Rady Dyscypliny Nauki Medyczne

prof. dr hab. Tomasz Grzybowski

Warszawa, 29.07.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Warmuzińskiej

pt: "Analiza lipidomiczna w diagnostyce transplantacyjnej"

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Bojko

Podstawą formalną przygotowania recenzji jest pismo LADL.5201.1623.2025 z dnia 16.06.2025 r., otrzymane od Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne dr hab. Iwony Sadowskiej-Krawczenko, w którym Rada Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, powierzyła mi funkcję recenzenta w postępowaniu w sprawie nadania mgr Natalii Warmuzińskiej stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Mgr Natalia Warmuzińska złożyła rozprawę doktorską pt. *Analiza lipidomiczna w diagnostyce transplantacyjnej*. Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Pani promotor, prof. dr hab. Barbary Bojko w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter pracy pisemnej. Została przygotowana jako zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych opatrzonych stosownymi komentarzami Doktorantki. Rozprawa stanowi 206-stronicowy dokument, który obejmuje: wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora, streszczenia w języku polskim i angielskim (po 2 strony każde), wstęp (4 strony) wprowadzający do dwóch artykułów przeglądowych prezentujących podstawy teoretyczne podjętego tematu, cel pracy (1 strona), wyniki badań wraz z ich omówieniem i dyskusją – obejmujące cztery publikacje oryginalne opatrzone dziewięciostronicowym komentarzem – oraz wnioski (1 strona). Zawiera także wykaz skrótów, spis piśmiennictwa, rycin, wykaz osiągnięć Doktorantki, Opinię Komisji Bioetycznej na temat prowadzonego badania, oświadczenia Autorki rozprawy doktorskiej o jej wkładzie w powstanie artykułów wchodzących w skład pracy oraz analogiczne oświadczenia współautorów.

Ocena rozprawy

Rozprawa doktorska dotyczy jednego z kluczowych wyzwań współczesnej transplantologii, jakim jest ograniczona skuteczność diagnostyki okołotransplantacyjnej. Doktorantka postawiła sobie za cel ocenę potencjalnych możliwości wykorzystania techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) w biochemicznej charakterystyce nerek przeznaczonych do przeszczepienia. Mgr Natalia Warmuzińska zaproponowała nowatorskie podejście analityczne polegające na bezpośredniej analizie narządu w warunkach *ex vivo* z zastosowaniem tzw. biopsji chemicznej, zintegrowanej z profilowaniem lipidomicznym, co stanowi oryginalną i innowacyjną koncepcję w tej dziedzinie badań. W pierwszym etapie Doktorantka wykorzystała model zwierzęcy, który umożliwił ocenę wpływu niedokrwienia na lipidom narządu, z uwzględnieniem dwóch typów dawców. Równocześnie przeprowadziła porównanie wpływu różnych metod przechowywania nerek pomiędzy pobraniem a przeszczepieniem na profil lipidomiczny. W kolejnym kroku Doktorantka przeniosła opracowaną metodykę do warunków klinicznych, podejmując próbę zastosowania metody SPME jako narzędzia wspomagającego przewidywanie ryzyka powikłań po przeszczepieniu. Zaproponowała panele metabolitów i lipidów o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym, które w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie w kwalifikacji i monitorowaniu narządów przeznaczonych do transplantacji.

Temat podjęty przez Doktorantkę jest niezwykle aktualny. W ostatnich latach, w obliczu stale rosnącej liczby pacjentów oczekujących na przeszczepienie nerek oraz pogłębiającej się dysproporcji pomiędzy zapotrzebowaniem na narządy, a ich dostępnością, szczególnego znaczenia nabierają badania ukierunkowane na doskonalenie metod diagnostyki okołotransplantacyjnej. Zagadnienia związane z oceną stanu i przydatności przeszczepianych nerek, identyfikacją czynników ryzyka powikłań po transplantacji oraz poszukiwaniem nowych metod ograniczających uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjne należą obecnie do kluczowych wyzwań współczesnej transplantologii. W związku z tym prowadzonych jest wiele badań, zarówno retrospektywnych, jak i prospektywnych, których celem jest m.in. prognozowanie funkcji przeszczepionego narządu, zarówno w perspektywie krótkoterminowej, jak i długoterminowej. Tworzone są różnorodne modele szacujące prawdopodobieństwo wystąpienia powikłań po transplantacji, wykorzystujące zarówno dane dotyczące dawcy, jak i biorcy. W ostatnich latach szczególną uwagę zwraca się na metabolomikę i lipidomikę oraz ich potencjał badawczy, gdyż odzwierciedlają one aktualny stan metaboliczny organizmu i narządów w momencie badania. Z tego względu mogą dostarczać bardziej aktualnych informacji o kondycji przeszczepianego narządu niż, na przykład, proteomika. Niewątpliwie najbardziej wiarygodnym źródłem takich danych jest materiał pobrany bezpośrednio z przeszczepianego narządu. Jednak tradycyjna biopsja, ze względu na swój inwazyjny charakter oraz związane z nim ograniczenia etyczne, stwarza istotne trudności w badaniach naukowych, zwłaszcza gdy konieczne jest wielokrotne pobieranie próbek, które to zwiększa ryzyko uszkodzenia narządu oraz wystąpienia powikłań. W tym kontekście szczególnie interesującą i innowacyjną propozycją jest zastosowanie zaproponowanej przez Doktorantkę techniki SPME, która – dzięki minimalnie inwazyjnej procedurze – umożliwia wielokrotne

pozyskiwanie materiału do profilowania lipidomicznego badanego narządu, bez istotnego naruszania jego struktury. Istotnym atutem tej techniki jest także prosty i szybki protokół przygotowania próbek do analizy chromatograficznej, co otwiera realne perspektywy wykorzystania jej w przyszłości w badaniach prowadzonych w miejscu opieki nad pacjentem, czyli w tzw. diagnostyce przyłóżkowej. Diagnostyka przyłóżkowa jest jednym z najszybciej rozwijających się trendów we współczesnej medycynie laboratoryjnej. Odpowiada ona na potrzebę uzyskania wyników w czasie rzeczywistym, co jest szczególnie istotne w intensywnej opiece medycznej oraz transplantologii. Rozwiązania umożliwiające szybkie i minimalnie inwazyjne pobranie materiału, połączone z szybką analizą lipidomiczną, mają ogromny potencjał i stanowią odpowiedź na aktualne potrzeby transplantologii, w pełni wpisując się w światowe kierunki badań w tej dziedzinie. Z tego względu uważam, że podjęty przez Doktorantkę temat jest aktualny i istotny dla rozwoju nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Wstęp teoretyczny pracy opiera się na dwóch artykułach. Pierwszy z nich (P.1) stanowi przegląd ograniczeń i zalet konwencjonalnych metod diagnostycznych oraz nowych, potencjalnych narzędzi służących ocenie jakości narządu, identyfikacji uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego, monitorowaniu perfuzji oraz przewidywaniu ryzyka wystąpienia opóźnionej funkcji przeszczepu. Drugi artykuł (P.2) poświęcony jest zastosowaniu techniki SPME w badaniach ukierunkowanych na monitorowanie przeszczepów w okresie okołoperacyjnym oraz omówieniu jej potencjału jako nowoczesnego narzędzia diagnostycznego. Artykuły w pełni wyczerpały tematykę zagadnienia i potwierdziły, że Doktorantka swobodnie porusza się w obrębie badanej dziedziny, wykazując się dojrzałością w doborze i wykorzystaniu źródeł naukowych.

Część wynikowa pracy obejmuje cztery artykuły oryginalne. Publikacja P.3 poświęcona jest opisowi protokołu wykorzystania techniki SPME do biopsji chemicznej. Artykuł przedstawia szczegółowy opis procedury – od przygotowania próbki SPME, poprzez sposób ekstrakcji, transportu, przechowywania, aż po proces desorpcji analitów ze złoża, analizę instrumentalną oraz analizę danych. W pracy przedstawiono również wstępne wyniki analiz lipidomicznych, uzyskane przy zastosowaniu opracowanego protokołu badawczego. Materiał badawczy stanowiły narządy na kolejnych etapach procesu transplantacyjnego – od pobrania i przechowywania, aż po fazę reperfuzyjii.

W publikacji P.4 Doktorantka zastosowała opracowany wcześniej protokół do oceny zmian lipidomu narządu w trakcie całego procesu transplantacji, przedstawiając tym razem szczegółowe wyniki. Na wieprzowym modelu autotransplantacji nerek w dwóch scenariuszach dawców – w modelu odzwierciedlającym dawcę żywego (HBD) i dawcę po zatrzymaniu krążenia (DCD) – pobierała wielokrotne próbki przy użyciu sond SPME, podczas normotermicznej perfuzji *ex vivo*. Wśród związków różnicujących dawców HBD i DCD, najbardziej obiecującymi lipidami do stworzenia zawężonego panelu analitycznego, służącego ocenie funkcji i jakości przeszczepu były trójglicerydy o różnej długości łańcuchów acylowych i liczbie wiązań podwójnych, lizofosfatydylocholino oraz fosfatydyloetanoloaminy. Następnie na tym samym modelu (P.5) oceniła wpływ technik konserwacji hipotermicznej

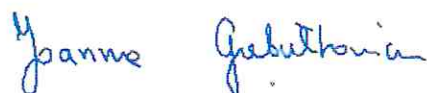
i normotermicznej nerki pobranej od dawcy DCD, na profil lipidomiczny nerki. Analiza chemometryczna wykazała, że temperatura przechowywania ma większy wpływ na profil lipidomiczny nerki niż mechaniczny charakter metody konserwacji. Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowanie normotermicznej perfuzji nerki może korzystnie wpływać na funkcję przeszczepu. W publikacji P.6 Doktorantka przedstawiła wyniki badań przeprowadzonych na materiale ludzkim, wykonując biopsję chemiczną nerki w wielu punktach czasowych, podczas przechowywania narządu. Dodatkowo przeanalizowała osocze biorców w celu identyfikacji zmian związanych z opóźnioną funkcją przeszczepu. Badanie to stanowi pierwsze zastosowanie biopsji chemicznej do oceny jakości przeszczepu nerki w warunkach klinicznych, a jego wyniki podkreślają znaczący potencjał translacyjny biopsji chemicznej oraz analizy metabolitów osoczowych w ocenie ryzyka i nieinwazyjnym monitorowaniu funkcji przeszczepu.

Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione sobie cele naukowe, uzyskując wyniki, które mają duży potencjał aplikacyjny. W przedstawionej rozprawie nie dostrzegłam uchybień o charakterze merytorycznym. Z obowiązku Recenzenta pragnę jednak poprosić Doktorantkę o odniesienie się do kilku pytań, które nasunęły mi się w trakcie lektury rozprawy. Czy w trakcie opracowywania protokołu badawczego (P.3) Doktorantka przeprowadzała jego optymalizację, a jeśli tak – które elementy zostały poddane temu procesowi? W przedstawionym protokole pozostawiono badaczom pewną swobodę w zakresie wyboru metody sterylizacji. Czy w ramach badań analizowano wpływ zastosowanej metody sterylizacji (zwłaszcza metod opartych na wysokiej temperaturze) na właściwości złoza, w tym jego porowatość oraz obecność grup funkcyjnych, które mogą mieć istotny wpływ na jego właściwości sorpcyjne? Czy w trakcie pobierania próbek zdarzały się sytuacje, w których próbnik trafił w większe naczynie krwionośne i jak wówczas postępowano z takimi próbkami? Proszę o uzasadnienie wyboru testów nieparametrycznych pomimo zastosowania transformacji zmiennych i niewielkiej liczby powtórzeń (P.5). W publikacji P.6 wykazano, że biopsja chemiczna wykonywana podczas przechowywania narządu ujawnia różne zestawy lipidów w zależności od czasu pobrania próbki. Czy w toku badań Doktorantka zidentyfikowała lipidy wykazujące korelację pomiędzy abundancją a czasem? Jeśli nie, czy jej zdaniem brak takiej zależności może nieść ze sobą jakieś ryzyko/ograniczenia dla przyszłego modelu prognostycznego? Czy Doktorantka rozważała stworzenie modelu prognostycznego o charakterze mieszanym, łączącego dane uzyskane zarówno z badań lipidomii osocza, jak i z narządu? Czy Doktorantka podejmowała próbę porównania panelu metabolitów uznanych za obiecujące w prognozowaniu jakości nerki w modelu wieprzowym z panelem lipidów wyselekcjonowanych w modelu ludzkim?

Praca została napisana w sposób klarowny i zrozumiały. W niektórych miejscach widoczne są kalki językowe z języka angielskiego, co najprawdopodobniej wynika z faktu, że język angielski stanowi podstawowe narzędzie komunikacji naukowej. Nie wpływa to jednak w istotny sposób na odbiór tekstu, który jest logicznie uporządkowany i spójny pod względem merytorycznym. Pracę oceniam bardzo wysoko. Niniejsza praca w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Ponadto Doktorantka aktywnie uczestniczyła w innych

badaniach realizowanych w Jednostce, dzięki czemu uzyskała dorobek naukowy wyróżniający się na tle innych doktorantów. Jej zaangażowanie badawcze, samodzielność oraz umiejętność prowadzenia badań na wysokim poziomie świadczą o dużym potencjale naukowym i dają podstawy do pozytywnej oceny zarówno przedłożonej rozprawy, jak i całokształtu dotychczasowej działalności badawczej.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Natalii Warmuzińskiej prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.). Dlatego składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy o dopuszczenie Pani mgr Natalii Warmuzińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny pracy, jej oryginalny i nowatorski charakter oraz istotny wymiar aplikacyjny uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy.



Dr hab. Joanna Giebułtowa

Zakład Chemii Leków, Analizy
Farmaceutycznej i Biomedycznej

Wydział Farmaceutyczny

Warszawski Uniwersytet Medyczny