

Katedra i Zakład Chemii
Klinicznej i Diagnostyki
Laboratoryjnej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu

41-200 Sosnowiec
ul. Jedności 8
www.sum.edu.pl

Profesor SUM naukowo-badawczy
dr hab. n. med. Katarzyna Winsz-Szczotka
winsz@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 364 11 50
fax: (+48 32) 364 11 57
chem_klin@sum.edu.pl

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
mgr Natalia Warmuzińska

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Tytuł pracy: ***Analiza lipidomiczna w diagnostyce transplantacyjnej***
Promotor: **Prof. dr hab. n. med. Barbara Bojko**
Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej

Przewlekła choroba nerek (PChN), definiowana jako zaburzenie budowy lub czynności nerek trwające przez okres co najmniej trzech miesięcy, zaliczana jest obok otyłości, nadciśnienia tętniczego, cukrzycy czy zaburzeń sercowo-naczyniowych do chorób cywilizacyjnych XXI wieku. Zgodnie z światowymi wskaźnikami omawiana patologia może występować u 9 – 15% populacji, stając się jedną z głównych przyczyn przedwczesnych zgonów ludzi na świecie. W związku powyższym PChN należy postrzegać nie tylko w kontekście zdrowia jednostki lecz także jako problem społeczny. Stąd istnieje pilna potrzeba reorganizacji postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nefrologii, celem wczesnego rozpoznania dysfunkcji nerek i ograniczenia napływu do specjalistów pacjentów z pełnoobjawowym schorzeniem. W leczeniu tych ostatnich dostępnych jest bowiem niewiele opcji terapeutycznych. I tak, formą leczenia schyłkowej niewydolności nerek jest przeszczep narządu, zapewniający choremu lepszą jakość życia w porównaniu z inną formą leczenia, tj. dializami. Chociaż wskaźniki ilościowe przeszczepów nerek rosną, to coraz liczniejsze dane wskazują na szereg wielopoziomowych barier i dysproporcji w dostępie do przeszczepu nerki na poziomie pacjenta, świadczeniodawcy i systemu opieki zdrowotnej. Co więcej, pomimo gwałtownego rozwoju technik i metod badawczych obecnie brak jest wiarygodnych metod oceny jakości narządów używanych do transplantacji. Standardowe techniki diagnostyczne ograniczają się do kontroli wyglądu makroskopowego czy inwazyjnej biopsji tkanek, które nie dostarczają wyczerpujących informacji na temat przeszczepianego narządu. Z uwagi na powyższe oraz na fakt, że długoterminowe wyniki transplantacji pozostają w zależności od jakości narządu dawcy, badania – pod wspólną nazwą: „Analiza lipidomiczna w diagnostyce transplantacyjnej” – prowadzone przez Panią mgr Natalię Warmuzińską, pod opieką Pani prof. dr hab. Barbary Bojko, wpisujące się w nurt badań naukowych związanych z przestrzenią transplantacyjną, uważam za niezwykle interesujące, zarówno ze względów naukowych, jak i potencjalnie użytecznych klinicznie.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Warmuzińskiej została przygotowana celem wykazania potencjału mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME, *solid phase microextraction*), tj. innowacyjnej i czułej technologii przygotowywania próbek do analizy, w ocenie jakości nerek w trakcie procedury przeszczepiania, ze szczególnym uwzględnieniem dawców z bijącym sercem (HBD, *heart beating donor*) oraz tych po zatrzymaniu krążenia (DCD, *donor after cardiac death*). Ponadto, celem wykazania ewentualnych zmian biochemicznych zachodzących na wszystkich etapach procedury transplantacji w przeszczepianych narządach pochodzących od dawców zarówno HBD jak i DCD poddano ocenie ich profil lipidomiczny. Dla realizacji nadrzędnego celu pracy Autorka przeprowadziła także analizy metabolomiczne i lipidomiczne w tkankach nerkowych pozyskanych od dawców oraz we krwi biorców w celu wykrycia zmian związanych z wystąpieniem opóźnionej funkcji narządu po przeszczepie (DGF, *delayed graft function*). Na przeprowadzenie badań, stanowiących powyższe cele pracy, wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy (numer zgody KB 636/2017, pismem z dnia 24.10.2017 r. wraz z przedłużeniem zawartym w piśmie z dnia 24.11.2020 r.).

Praca cechuje się typowym układem dla opracowań naukowych z dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu, i została przygotowana na podstawie monotematycznego cyklu sześciu publikacji, których teksty stanowią integralny element dysertacji. Prace, będące podstawą rozprawy, zostały opublikowane w latach 2020 – 2024, dwie z nich – o charakterze prac poglądowych – na łamach czasopism: *Journal of Clinical Medicine* oraz *Separations*, zaś cztery oryginalne na łamach czasopism: *Journal of Visualized Experiments*, *Translational Research*, *Frontiers in Molecular Biosciences* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym lub drugim, równorzędnym (w trzech pracach) autorem, zaś jej wiodący udział w powstaniu tych prac wiązał się z analizą literatury naukowej właściwej dla ich przedmiotu, opracowaniem koncepcji prac, przygotowaniem i optymalizacją części lipidomicznej protokołu badań, wykonywaniem oznaczeń, analizą i interpretacją uzyskanych wyników, oraz przygotowaniem manuskryptów zgodnie z wymaganiami technicznymi wydawcy. Pozostali współautorzy – zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami – wyrazili zgodę na przedłożenie tych prac przez Panią mgr Natalię Warmuzińską, jako części składowych Jej rozprawy doktorskiej, przygotowanej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów. Część prac powstała w efekcie współpracy międzynarodowej.

Należy podkreślić, że prace zostały opublikowane w wymienionych wyżej, prestiżowych czasopismach naukowych, indeksowanych w interdyscyplinarnej bazie *Journal Citation Reports*, o łącznej imponującej wartości wskaźnika oddziaływania (IF, *impact factor*) wynoszącym 22,955. Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla tych prac wynosi 650,000. Powyższe wskazuje, że przedmiotowe prace, będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora, zostały wcześniej poddane wysoce wymagającym procesom recenzji i spełniły wymagania stawiane w światowych, renomowanych czasopismach naukowych.

Cyklowi wymienionych publikacji, zrealizowanych w oparciu o grant Narodowego Centrum Nauki OPUS nr. 2017/27/B/NZ5/01013 pt. „Bezbiopsyjna analiza metabolomiczna i lipidologiczna nerek jako krok w kierunku lepszej oceny jakości narządów selekcjonowanych do transplantacji i uszkodzenia poreperfuzyjnego”, towarzyszy polskojęzyczny autoreferat, obejmujący między innymi: wykaz skrótów,

streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp i cel rozprawy doktorskiej, wyniki badań, wnioski, bibliografię, spis rycin, wykaz osiągnięć, opinię komisji bioetycznej oraz oświadczenia zarówno Doktorantki jak i współautorów. Pomimo iż nie znajdujemy w omawianej części dysertacji rozdziałów: materiały i metody badań oraz dyskusji to przedmiotowe informacje możemy odnaleźć w opisie poprzedzającym teksty prac oryginalnych jak i w samych tekstach artykułów.

Pierwsze dwie publikacje noszące tytuły odpowiednio: „*A Review of Current and Emerging Trends in Donor Graft-Quality Assessment Techniques*” oraz „*Solid phase microextraction: a promising tool for graft quality monitoring in solid organ transplantation*”, będące przeglądem i analizą aktualnej literatury naukowej, wprowadzają czytelnika w zakres badań prowadzonych przez Doktorantkę a opisanych w kolejnych eksperymentalnych pracach. Doktorantka wskazuje, że starzenie się społeczeństwa, związane ze wzrostem średniego czasu przeżycia człowieka, niesie ze sobą zwiększone ryzyko nieodwracalnej niewydolności nerek z następową koniecznością transplantacji narządu. Sukces terapeutyczny takiego zabiegu pozostaje w zależności od jakości przeszczepianej nerki, obecnie ocenianej na podstawie subiektywnej, wizualnej oceny narządu, wyników biopsji, perfuzji czy laboratoryjnych badań diagnostycznych. Jak wskazuje Doktorantka w ciągu ostatnich kilku lat opracowano wiele nowych technologii mogących mieć zastosowanie w ocenie funkcji narządów wykorzystywanych w transplantologii, identyfikacji uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego, kontroli perfuzji czy przewidywania DGF. Wśród nowych narzędzi diagnostycznych wymienia liczne techniki, w tym – obrazowania, transkryptomiki, genomiki, proteomiki, metabolomiki czy lipidomiki, a ponadto niskoinwazyjną technikę przygotowania próbek – SPME. Ta ostatnia, zdaniem Doktorantki, w połączeniu z analizą metabolomiczną i lipidomiczną pozwala na wykrycie zmian zachodzących w przeszczepianym narządzie na wszystkich etapach tego procesu, tj. od momentu pobrania od dawcy, przez przechowywanie, reperfuzję, aż do rewaskularyzacji u biorcy. Opis protokołu analitycznego bazującego na tzw. biopsji chemicznej – będący dowodem zaangażowania naukowego Doktorantki zasługuje na szczególne wyróżnienie – został przedstawiony w pracy pt.: „*Using a chemical biopsy for graft quality assessment*” a następnie wykorzystany do profilowania lipidomicznego nerek w trakcie poszczególnych, wyżej wymienionych, etapów przeszczepiania. Wyniki przedmiotowych analiz, przeprowadzone na modelu zwierzęcym (świnie rasy Yorkshire, zgoda Animal Care Committee at the Toronto General Hospital) zostały zawarte w pracy pt.: „*Metabolomic and lipidomic landscape of porcine kidney associated with kidney perfusion in heart beating donors and donors after cardiac death*”. Autorka wykorzystując nowoczesne systemy analityczne, w tym – ultrasprawną chromatografię ciekłą sprzężoną ze spektrometrem mas Q-Exactive Focus Orbitrap, dowiodła występowania odmiennych profili lipidomicznych nerek, zależnych od typów dawców tj. HBD oraz DCD. Wśród związków różnicujących wymienionych dawców najbardziej obiecującymi lipidami mogącymi posłużyć do opracowania panelu badań diagnostycznych stosowanych w ocenie funkcji przeszczepianego narządu są – różniące się liczbą atomów węgla w łańcuchach alifatycznych oraz liczbą wiązań wielokrotnych – trójglicerydy (TG, o liczbie atomów węgla 30-40 – wyższe stężenia podczas perfuzji w próbkach pozyskanych od dawców z grupy DCD), lizofosfatydylocholin (LPC, niższe stężenia podczas perfuzji w próbkach pozyskanych od dawców z grupy DCD), jaki i fosfatydyloetanoloamin (PE, o liczbie atomów węgla 34 i 36 – wyższe stężenia podczas perfuzji w próbkach pozyskanych od dawców z grupy HBD). Obserwowany odmienny trend zmian ocenianych lipidów w próbkach pozyskanych z grup DCD

oraz HBD może mieć – zdaniem Autorki – charakter lipotoksyczny a z drugiej może odzwierciedlać mechanizmy adaptacyjne służące neutralizacji toksycznych wpływów nasyconych kwasów tłuszczowych. Na omawiany profil lipidowy w przeszczepianych narządach znamieny wpływ ma temperatura przechowywania, zaś mniejszy udział mają właściwości mechaniczne metod konserwacji, co potwierdziła Doktorantka w kolejnej pracy pt.: *„The impact of normothermic and hypothermic preservation methods on kidney lipidome-comparative study using chemical biopsy with microextraction probes”*. Spośród trzech opisanych przez Doktorantkę metod konserwacji narządu tj. hipotermii prostej (SCS, *static cold storage*), hipotermicznej perfuzji maszynowej (HMP, *hypothermic machine perfusion*) oraz normotermicznej perfuzji maszynowej (NEVKP, *normothermic ex vivo kidney perfusion*) najbardziej korzystny wpływ na profil lipidowy wydaje się mieć NEVKP. W warunkach normotermicznych zaobserwowano bowiem wyższe stężenia ceramidów i fosfatydyloetanolamin o krótszym łańcuchu, zaś w grupie hipotermicznej zaobserwowano wyższe stężenia acyklokarnityn (CAR), fosfatydylocholin (PC), PC i PE z wiązaniem eterowym, fosfatydyloinozytoli, TG, większości LPC i lizofosfatydyloinozytoli oraz PE o dłuższym łańcuchu. Profil lipidowy ujawniający się w narządzie konserwowanym w warunkach hipotermicznych, przejawiający się w szczególności podwyższonymi stężeniami długołańcuchowych CAR, i wiążący się z dysfunkcją mitochondriów oraz zwiększoną aktywnością prooksydacyjno-prozapalną, na drodze licznych mechanizmów może sprzyjać opóźnionej funkcji przeszczepu. Ten ostatni stan, szerzej opisany w kolejnej pracy Pani mgr Natalii Warmuzińskiej pt.: *„Metabolomic and lipidomic profiling for pre-transplant assessment of delayed graft function risk using chemical biopsy with microextraction probes”*, stanowi najczęstsze wczesne powikłanie u biorców przeszczepu nerki. Biopsja chemiczna, jak wykazała Doktorantka pozwala na dobór związków o potencjalnej wartości predykcyjnej dla wystąpienia DGF, którego prawdopodobieństwo wystąpienia można ocenić przed przeszczepem narządu. Ponadto, analizy metabolomiczne i lipidomiczne osocza biorcy umożliwiają identyfikację związków różnicujących pacjentów z DGF w pierwszych dniach pooperacyjnych. Potencjalną rolę predykcyjną w wystąpieniu DGF wykazują – szeroko omówione i przedyskutowane z wynikami innych badaczy na łamach pracy – arginina, ornityna, kwas glutaminowy czy histydyna, a ponadto adenozyne, 4-hydroksynonenal, acyklokarnityny, TG, fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina czy sfingomielina. Interesującym wynikiem badań Doktorantki jest identyfikacja S-adenozylhomocysteiny, endogennego prekursora homocysteiny, jako potencjalnego biomarkera funkcji nerek. Pomimo iż Pani Magister wskazuje, że wyniki uzyskane w tym badaniu niewątpliwie są bardzo obiecujące i sugerują możliwość włączenia biopsji chemicznej do rutynowych praktyk diagnostycznych, to będąc ostrożnym młodym naukowcem zaznaczyła kilka ograniczeń przeprowadzonych badań, a tym samym potwierdziła posiadanie kompetencji do pracy naukowej.

Pracę zamyka sześć wniosków odnoszących się w większości do zakładanych w poszczególnych pracach celów oraz do uzyskanych wyników.

Uprzejmie zapytuję Doktorantkę, które badania prowadzące do uzyskania rezultatów stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora, a zaprezentowanych w niniejszej dysertacji wykonywała Pani samodzielnie?

W podsumowaniu oświadczam, że przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska pt.: *„Analiza lipidomiczna w diagnostyce transplantacyjnej”* jest oryginalnym, samodzielnym dorobkiem naukowym Pani

mgr Natalii Warmuzińskiej, Kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu. W recenzowanej pracy Doktorantka podjęła bardzo aktualną i istotną – z punktu widzenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w schyłkowej chorobie nerek – tematykę przeszczepiania narządu, wykazała się wiedzą teoretyczną, znajomością bardzo nowoczesnego warsztatu badawczego, technik analizy statystycznej i umiejętnością krytycznej analizy uzyskanych wyników.

Jednocześnie potwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). Z pełnym przekonaniem przedkładam Szanownym Członkom Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie Pani mgr Natalii Warmuzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej, doceniając nakład pracy i wyjątkowe walory poznawcze i praktyczne znaczenie otrzymanych przez Panią mgr Natalię Warmuzińską wyników badań, wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy wniosek o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.

Sosnowiec 16.08.2025 r.

