



Gdańsk, 5 stycznia 2022

Dr Joanna Banasiak
Sekretarz Rady Naukowej
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polska Akademia Nauk

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Tracz pt. „Proteomiczna, metabolomiczna i lipidomiczna analiza krwi w poszukiwaniu mechanizmów progresji miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek”.

Praca doktorska mgr Joanny Tracz składa się z cyklu trzech powiązanych tematycznie prac w tym dwóch oryginalnych oraz jednej przeglądowej. W pracy przeglądowej oraz jednej oryginalnej doktorantka jest pierwszym autorem. Wszystkie prace są opublikowane w bardzo dobrych czasopismach.

Doktorat zawiera: Wykaz artykułów zawarty w rozprawie doktorskiej oraz powiązanych artykułów niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wykaz skrótów, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Wprowadzenie, Cel rozprawy doktorskiej, Materiały i metody badawcze, Skrótowe omówienie publikacji będących wynikiem pracy doktorskiej, Wnioski, Piśmiennictwo, Dorobek naukowy oraz Załączniki w postaci oświadczeń o wkładzie doktorantki w prace zawarte w rozprawie doktorskiej oraz kopie publikacji wraz z suplementami. Praca doktorska liczy 36 stron bez załączników (76 stron).

Przedmiotem pracy doktorskiej są poszukiwania mechanizmów progresji miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek z zastosowaniem metod umożliwiających kompleksową ocenę procesów na poziomie stężeń białek, metabolitów oraz mRNA.

Miażdżycza jest jednym z najważniejszych problemów klinicznych pojawiających się u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek, co jest konsekwencją utraty funkcji nerek oraz gromadzenia w organizmie produktów ubocznych metabolizmu. Substancje te zwane toksynami mocznicowymi mogą przyczyniać się do rozwoju patologii takich jak szybko postępująca miażdżycza i jej konsekwencje sercowo-naczyniowe, które są główną przyczyną śmierci wśród pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Zmiany miażdżycowe pojawiające się w naczyniach krwionośnych u takich pacjentów różnią się od miażdżycy rozwijającej się bez



patologii nerek, co sugeruje zaangażowanie innych unikalnych mechanizmów, które nie zostały do tej pory w pełni wyjaśnione.

Z tych względów w pracy doktorskiej podjęto próbę pogłębienia wiedzy na temat procesów i szlaków zaangażowanych w rozwój miażdżycy u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. W ramach podjętych badań przeprowadzono kompleksową analizę proteomu frakcji leukocytów oraz metabolomiczną i lipidomiczną analizę osocza, z wykorzystaniem metod opartych o zastosowanie spektrometrii mas (MS). Materiał badawczy uzyskano od pacjentów z różnym stopniem zaawansowania przewlekłej choroby nerek i tym samym z różną progresją miażdżycy oraz pacjentów z miażdżycą bez dysfunkcji nerek. Zbadano również materiał od zdrowych ochotników. Przeprowadzono również analizy stężeń niektórych białek z zastosowaniem ELISA i Western blot oraz analizy mRNA z zastosowaniem ddPCR.

Przedmiot rozprawy doktorskiej uważam za niezwykle ważny zarówno dla zrozumienia ogólnych mechanizmów patologicznych jak i ze względów praktycznych dając możliwości poszukiwania nowych terapii. Na szczególne podkreślenie zasługuje najlepsze z możliwych podejście metodyczne obejmujące analizę wielu zróżnicowanych procesów na wszystkich poziomach: metabolitów, białek oraz mRNA. Takie kompleksowe podejście ma fundamentalną przewagę nad analizą tylko wybranych procesów, co nawet przy wykazaniu różnic dało by tylko częściowy obraz tej złożonej patologii. Należy też podkreślić, że niecelowane analizy metabolomiczne i proteomiczne zostały zweryfikowane przez analizy celowane oraz badania zmian ekspresji genów, co znacznie wzmacnia i uwiarygadnia uzyskane wyniki i wnioski.

Z załączonych deklaracji współautorów wynika, że doktorantka wykonywała osobiście te analizy na wszystkich etapach, od zebrania i przygotowania materiału, poprzez lipidomiczne analizy GC/MS czy proteomiczne analizy nano LC/MS do obliczenia wyników oraz analiz statystycznych. Doktorantka optymalizowała i wykonywała również analizy ELISA, Western blot oraz analizy ekspresji mRNA z zastosowaniem ddPCR. Włączona do doktoratu praca przeglądowa przygotowana przez doktorantkę świadczy o wysokiej kompetencji w tym obszarze badań. Tak szerokie umiejętności w wielu bardzo trudnych technikach zasługują na szczególne podkreślenie.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej, a w szczególności porównanie obrazu zaburzeń w postaci zmienionej akumulacji białek, metabolitów oraz lipidów w miażdżycy z dysfunkcją nerek i bez potwierdziło, że patomechanizm obserwowanych zmian może być podobny w początkowych stadiach obu procesów patologicznych. Stwierdzono jednak różnice w zaawansowanym stadium tych patologii. W miażdżycy z dysfunkcją nerek stwierdzono większą deregulację białek zaangażowanych w różne etapy procesu diapedezy leukocytów, co może działać prozapalnie na mikrośrodowisko, a tym samym nasilać dysfunkcję śródbłonna i produkcję czynników prozapalnych takich jak TGFβ1, który promuje zwłóknienie i zwapnienie naczyń. W konsekwencji obserwujemy wzmocnienie procesu



programowanej śmierci komórki, zmiany molekuł adhezyjnych, nasilenie uogólnionego stanu zapalnego przyczyniające się do progresji zmian w zaawansowanych stadiach miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek. W pracy, po raz pierwszy scharakteryzowano również unikalny profil lipidomiczny pacjentów z miażdżycą związaną z przewlekłą chorobą nerek, wskazując na obniżone zawartości sfingomielin, cholesterolu i jego estrów, fosfatydylocholin, ceramidów i fosfatydyloetanolamin. Wykazano również akumulację triacylogliceroli. Wyniki tych analiz wskazały, na zaburzenia syntezy prowadzące do zmiany składu lub struktury lipidów, a nie do zaburzeń w stężeniu głównych frakcji lipidowych, przez co standardowe badania profilu lipidowego mogą być niewystarczające w ocenie predyspozycji do rozwoju zmian miażdżycowych u pacjentów dysfunkcją nerek.

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej wskazały ważne kierunki dalszych badań, które powinny dotyczyć procesów adhezji i migracji leukocytów oraz systemowej analizy poszczególnych subpopulacji leukocytów, szczególnie monocytów i limfocytów T. Istotne było by również porównanie poziomu cytokin oraz innych wskaźników stanu zapalnego w miażdżycy z dysfunkcją nerek i bez.

W podsumowaniu, badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały wiele nowych aspektów patologii miażdżycy specyficznych dla przewlekłej choroby nerek które nie tylko pozwolą na lepsze zrozumienie lecz również są inspiracją dla dalszych badań również tych dotyczących zastosowań praktycznych. Wynik tych badań uważam za znaczące i unikalne, a ich rzetelność poddana została skrupulatnej analizie przez recenzentów czasopism.

Przedstawione badania są przeprowadzone modelowo, dlatego trudno jest przedstawić jakiegokolwiek uwagi krytyczne. Chciałbym jedynie zwrócić uwagę, że nie do końca poprawne jest używanie w tytule i konstrukcji pracy sformułowania analiza lipidomiczna i metabolomiczna. Lipidomika jest w zasadzie częścią metabolomiki, co również w pracy przyznano pisząc że lipidy zaliczają do metabolitów, np. na stronie 18. Dlatego w tytule powinna zostać tylko „...analiza proteomiczna i metabolomiczna..” lub ponieważ wyniki dotyczące związków drobnocząsteczkowych zawarte w rozprawie dotyczą niemal wyłącznie pochodnych lipidów poprawnie by było „analiza proteomiczna i lipidomiczna...”

Niewiele uwagi poświęcono również pewnym ograniczeniom przeprowadzonych badań. W porównaniu do celowanych analiz ukierunkowanych na jeden proces podjęta strategia badawcza jest dużym krokiem do przodu, jednak nadal dalekim w stosunku do kompletnego obrazu całości. Dlatego prosiłbym o przedyskutowanie tych ograniczeń i możliwości jeszcze bardziej szczegółowego zbadania różnic w badanych patologiach.

Wymienione uwagi do ocenianej przeze mnie pracy w żadnej mierze nie umniejszają jej bardzo wysokiej wartości. Praca doktorska mgr Joanny Tracz stanowi znaczący wkład w zrozumienie mechanizmów patologicznych w miażdżycy przy współistniejącej dysfunkcji nerek. Badania te mogą pomóc w opracowaniu nowych terapii. Oceniana praca spełnia



wszystkie kryteria stawiane rozprawie doktorskiej określone w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Joanny Tracz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na opracowanie, opanowanie i wdrożenie wielu złożonych technik badawczych oraz jakość publikacji stanowiący wynik pracy doktorskiej wnoszę o jej wyróżnienie.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Ryszard T. Smoleński
prof. dr hab. *Ryszard Tomasz Smoleński*