

Prof. Piotr Młynarz
Katedra Biochemii,
Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Wrocław, 22.12.2021 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Tracz, zatytułowanej: „*Proteomiczna, metabolomiczna i lipidomiczna analiza krwi w poszukiwaniu mechanizmów progresji miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek*”

Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska była zrealizowana w Zakładzie Proteomiki Biomedycznej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Łuczak prof. IChB PAN, która od lat z powodzeniem prowadzi badania „omiczne” różnego rodzaju materiału biologicznego.

Analityka medyczna oparta o wieloplatformowe badania z zastosowaniem spektrometrii mas stanowi niewątpliwie przyszłość holistycznych badań klinicznych, monitorowania procesów rekonwalescencji oraz zachodzących procesów patologicznych. Wielopoziomowa analiza począwszy od związków drobnocząsteczkowych (metabolomiki/lipidomika), aż do makromolekuł (proteomika) umożliwia również określanie szlaków biochemicznych, które ulegają modyfikacji na skutek działania procesów patologicznych. Takie podejście nie tylko sprzyja określeniu molekularnych podstaw rozwoju choroby, lecz również pozwala na zdefiniowanie potencjalnych celów terapeutycznych.

Przedstawiona do recenzji praca posiada układ niestandardowy, to znaczy składa się ze zbioru opublikowanych prac, której podstawą są trzy prace naukowe opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. W takim przypadku rola recenzenta jest w pewnym aspekcie ograniczona, ponieważ opublikowane prace przeszły już proces recenzentki oraz edytorski.

Na pracę składa się streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody badawcze, skrótowe omówienie publikacji, wnioski, bibliografia, dorobek naukowy oraz załączniki. Oczywiście taki układ pracy wymaga dużo mniej czasu na jej napisanie, ale mogą sobie na niego pozwolić tylko ci doktoranci, którzy wykazali się dużym zaangażowaniem i opublikowali całość swojego dorobku naukowego wchodzącego w skład dysertacji doktorskiej.

Pomimo niestandardowego układu pracy jest ona przemyślana, krótkie wprowadzenie pozwala na zapoznanie się czytelnika z przewlekłą chorobą nerek, patogenezą zmian miażdżycowych oraz wykorzystanych narzędzi omicznych. Następnie został opisany cel pracy doktorskiej, którym było „pogłębienie wiedzy” o procesach miażdżycowych w przewlekłej chorobie nerek CKD (*ang. Chronic Kidney Diseases*). Był on realizowany poprzez cele szczegółowe. Pierwszym było scharakteryzowanie profilu białkowego leukocytów pochodzących od pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (CKD), chorobami układu sercowo-naczyniowego CVD (*ang. Cardiovascular*

diseases) oraz osób zdrowych z grupy kontrolnej HV (*ang. Healthy Volunteers*). Drugim celem były badania metabolomiczne i lipidomiczne osocza pacjentów z CKD, CVD oraz grupy kontrolnej HV. Następne dwa szczegółowe cele właściwie są związane z przedstawionymi powyżej, ponieważ zawierały walidację wyników oraz identyfikację szlaków i sieci sygnałowych związanych z rozwojem i progresją miażdżycy u grupy pacjentów z CKD (oznaczonych jako CKD-A). W tej pracy z założenia została wybrana kohorta pacjentów cierpiących na przewlekłą chorobę nerek, która rozwinęła zmiany miażdżycowe. W związku z tym mam do Doktorantki pytanie, czy zawsze w CKD występują zmiany aterogenne?

Jak już wcześniej napisałem w skład dysertacji wchodzi trzy publikacje, z których jedna jest pracą przeglądową, a dwie zawierają badania własne. Jakkolwiek pracę przeglądową jest trudno uznać za pracę zawierającą oryginalne dane uzyskane przez Doktorantkę, w zaprezentowanej konstrukcji całości dysertacji stanowi ona bardzo dobre wprowadzenie do podjętej tematyki badawczej. Moim zdaniem szkoda tylko, że praca ta została opublikowana po pracach oryginalnych, a nie na początku dysertacji jako przegląd dotychczasowych doniesień literaturowych. Praca obejmuje 144 pozycje literaturowe, więc stanowi bardzo obszerny przegląd zawierający wstęp do przewlekłej choroby nerek w powiązaniu z chorobami układu sercowo-naczyniowego. W pracy zostały opisane technologie wykorzystywane w analizie proteomicznej oraz lipidomicznej z kluczową rolą lipoproteiny o wysokiej gęstości HDL, mechanizm zwapnienia naczyń wraz z rolą toksyn mocznicowych (siarczanu indoksyłu, siarczanu p-krezolu), rola mikroflory jelitowej oraz białek skorelowanych z procesami patogennymi. W ostatniej części m. in. zostały poruszone różnice proteomiczne pomiędzy CVD, CKD oraz CKD-A. Tak obszerny zbiór literatury umożliwia wgląd nie tylko do zastosowanych metod analitycznych, lecz również protokołów przygotowania próbek materiału biologicznego, analizy danych etc. Niewątpliwym atutem „omicznych” prac przeglądowych jest wyznaczenie wspólnego mianownika, czyli w tym przypadku molekularnego podłoża miażdżycy na tle przewlekłej choroby nerek.

W pierwszej pracy eksperymentalnej zostały porównane leukocyty pochodzące od pacjentów z CVD1, CVD2, CKD1-2, CKD5 (w sumie 220 pacjentów) oraz grupy kontrolnej HV (48 osób). Analiza została przeprowadzona za pomocą platformy proteomicznej (spektrometria mas, test immunoenzymatyczny, immunoblotting) analizy transkryptomu (ddPCR), mikroskopii fluorescencyjnej oraz cystometrii przepływowej. Analiza statystyczna wyników wykazała różnice pomiędzy CKD5 a CVD1 w pięciu szlakach sygnałowych: IL-8, paksyliny, wynaczyniania leukocytów, integryn oraz cytoszkieletu aktywnego. Dla porównania CKD5 z CVD2 dodatkowo nastąpiła aktywacja układu receptorów LXR/RXR oraz produkcja NO wraz z reaktywnymi formami tlenu. W szczególności zostało wykazane, że ścieżki sygnałowe cytoszkieletu aktywnego, integryn oraz paksyliny były znacznie zahamowane w przypadku CKD5 w porównaniu z CVD1 i CVD2. Dodatkowo profil białek związany z diapedezą leukocytów był zmieniony pomiędzy CKD i CVD, a niektóre zmiany miały charakter post-translacyjny. Fakt ten został potwierdzony metodą ddPCR. Zostały przedstawione interesujące zmiany w profilu białek grupy CKD wykazując wyższy poziom apoptozy w leukocytach, które były potwierdzone również za pomocą mikroskopii i/lub cytometrii przepływowej. Badania wykazały, że podwyższona aktywność procesów nekrotycznych i apoptotycznych jest związana z dysfunkcją nerek i są one podwyższone dla CKD5 w porównaniu do CKD1-2. W niniejszej pracy został scharakteryzowany proteom leukocytów pacjentów z CKD sugerując deregulację białek związanych z transmigracją leukocytów oraz

nadprodukcje białek skorelowanych z procesami apoptotycznymi. Niniejsza praca stanowi bardzo dobry przykład połączenia badań proteomicznych, transkryptomicznych, statystycznych i bioinformatycznych, czyta ją się bardzo dobrze i stanowi myślowy ciąg przyczynowo-skutkowy.

Chociaż, niniejszą publikację uważam za bardzo dobrze wykonaną oraz opisaną, w szczególności pod względem bioinformatycznym oraz biochemiczno-medycznym to mam dwie wątpliwości nurtujące mnie podczas jej czytania. Pierwsza dotyczy porównywania grupy kontrolnej HV, w której średnia wieku wynosi 43 ± 6 lat z pozostałymi grupami ze średnią wieku oscylującą 62-66 lat. Druga wątpliwość związana jest z hemodializą osób z grupy CKD5, czy znany jest czas poboru krwi od hemodializy pacjentów z CKD5, czy w jakiś sposób ten czynnik mógłby wpłynąć na otrzymane wyniki?

W następnej pracy zostały przeprowadzone badania lipidomiczne i metabolomiczne osocza krwi pochodzących od 75 pacjentów cierpiących na CKD1-2, CKD5, CVD (25 osób w każdej grupie dopasowanych pod względem wieku) oraz grupa kontrolna (25 osób). Próbkę były analizowane za pomocą dwóch platform spektrometrycznych tzw. „shotgun” MS oraz GC-MS. Do analizy lipidomicznej typu „shotgun” został wykorzystany protokół ekstrakcji lipidów z użyciem eteru *tert*-butylowo-metylowego (MTBE), natomiast do analizy metabolomicznej GC-MS został wykorzystany protokół derywatywacji związków drobnocząsteczkowych przy użyciu *N*-metylo-*N*-(trimetylosililo)trifluoroacetamidu (MSTFA). Metoda analizy lipidów typu „shotgun” MS pozwoliła na zanalizowanie 14 podklas lipidów. Zastosowana nienadzorowana analiza głównych składowych (PCA) nie wykazała różnicowania pomiędzy grupami HV i CVD1-2. Jednak, jak można było się spodziewać, największe zmiany w profilu lipidowym były widoczne pomiędzy grupami HV a CKD5, podobnie jak dla grupy CKD5 a CVD1-2. Obliczenie wykonane testem ANOVA lub Kruskala-Wallisa wykazały 9 grup lipidów, które różnicowały badane grupy osób: HV, CVD, CKD1-2 oraz CKD5. W tym miejscu należy zadać następujące pytanie, czy włączenie do obliczeń grupy HV jest uzasadnione dla określenia zmian miażdżycowych w CKD? Następne porównanie w postaci mapy ciepła zawierało współczynniki korelacji Pearsona dla analizowanych lipidów i zostały wskazane poszczególne korelacje pomiędzy nimi. Dodatkowo przeprowadzono korelację pomiędzy parametrami klinicznymi a lipidami, które wykazały słabą dodatnią korelację CE z CRP i eGFR oraz ujemną korelację LPC z glukozą. W części badawczej pracy zostały zidentyfikowane i skwantyfikowane 253 lipidy spośród których zostały określone te, które różnicują poszczególne grupy badanych osób. Bardzo ciekawe porównania zostały przedstawione na rysunkach 5 i 6, które bardzo dobrze ilustrują międzygrupowe zmiany w ontologii i poziomach lipidów. Wykorzystanie platformy GC-MS pozwoliło na określenie zmian ilościowych pomiędzy badanymi kohortami próbek w tym kwasu oleopalmitynowego, kwasu palmitynowego, kwasu oleinowego, kwasu linolowego, kwasu arachidonowego, kwasu stearynowego, 2-hydroksymasłowego, cholesterolu oraz glicerolu. W następnym kroku została skonstruowana mapa ciepła za pomocą korelacji rang Spearmana zanalizowanych kwasów tłuszczowych, cholesterolu i glicerolu, która zawierała również parametry kliniczne CRP oraz eGFR. Przeprowadzony eksperyment bardzo jasno wykazał, że same badania kliniczne profilu lipidowego są niewystarczające w szczególności do diagnostyki CKD i CVD, a szczegółowa analiza lipidomiczna i metabolomiczna może pozwolić na określenie molekularnych zmian w profilu lipidowym. Profilowanie zmian lipidowych w obu stanach patologicznych CVD i CKD uważam za główne osiągnięcie tej pracy.

Podsumowując, według przedłożonych oświadczeń wszystkie eksperymenty były wykonane przez Autorkę dysertacji, tym samym można stwierdzić, że Doktorantka w pełni opanowała warsztat laboratoryjny służący do badań proteomicznych, lipidomicznych oraz transkryptomicznych materiału biologicznego. Biorąc pod uwagę wieloplatformowe podejście do przeprowadzonych analiz „omicznych”, wraz z dużą ilością próbek przyczyniło się ono niewątpliwie do otrzymania wielu danych, z którymi Pani mgr inż. Joanna Tracz musiała się zmierzyć zarówno na poziomie ich obróbki jak również różnego rodzaju korelacji, co zasługuje na znaczne zaakcentowanie.

Zawarty materiał w obu pracach eksperymentalnych stanowi cenne źródło do zrozumienia procesów związanych z tworzeniem się zmian miażdżycowych w chorobie CVD i CKD oraz wskazuje kierunki przyszłych badań w tym zakresie. Moim zdaniem główny cel pracy został zrealizowany, a do najważniejszych osiągnięć niniejszej pracy uważam: określenie różnic w proteomie leukocytów pomiędzy CKD5 a CVD; określenie deregulacji lipidów osocza krwi pacjentów z poszczególnymi chorobami oraz zdrową kontrolą; potwierdzenie odwróconej epidemiologii oraz powiązanie jej ze stanem zapalnym.

Pani mgr Joanna Tracz posiada ponadprzeciętny dorobek naukowy składający się z siedmiu publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych, z których trzy wchodzi w skład dysertacji doktorskiej. Niewątpliwie do osiągnięć doktorantki należy również jej wysoka aktywność w popularyzacji swoich badań na konferencjach naukowych, jedenaście doniesień konferencyjnych w tym cztery ustne. Autorka dysertacji była beneficjentką trzech stypendiów Środowiskowego Studium Doktoranckiego dla najlepszych doktorantów, otrzymała Grant dla Młodych Naukowców ICHB PAN 2018/2019 oraz brała udział w badaniach, w projekcie NCN OPUS.

Prawie na koniec recenzji dodam, że nie mam w zwyczaju wymieniania jakichkolwiek błędów językowych, czy edytorskich, czego i w tym wypadku nie zamierzam czynić, ponieważ nie wpływają one na merytoryczną zawartość pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Tracz spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

