

Konkluzja
4.10.2024

Z-ca Przewodniczącej
Rady Dyscypliny Nauki Medycznej

prof. dr hab. Tomasz Grzybowski

75

JUBILEUSZ
UNIwersytetu Medycznego
w Białymstoku
1950—2025

Prof. dr hab. Michał Ciborowski

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Zakład Biochemii Lekarskiej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Kamila Mateusza Łuczykowskiego

pt.: „*Nowe możliwości diagnostyczne w monitorowaniu funkcji wątroby
od pobrania narządu do przeszczepienia*”

wykonanej w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
pod kierunkiem Prof. dr hab. Barbary Bojko.

Badania przeprowadzone przez Pana mgr. Kamila Łuczykowskiego, na podstawie których ubiega się On o nadanie stopnia naukowego doktora, poświęcone były opracowaniu oraz walidacji metody analitycznej dedykowanej do pomiaru wybranych metabolitów w żółci. Zaproponowany panel metabolitów pozwala na efektywną ocenę jakości pobranej od dawcy wątroby oraz monitorowanie jej stanu od pobrania narządu aż do jego przeszczepienia, zatem opracowana metoda może być użyteczna klinicznie. Jak dotąd brak jest jednoznacznych i wiarygodnych metod oceny jakości wątroby przed transplantacją, co sprawia, że decyzje podejmowane przez chirurgów są często oparte na ograniczonych danych laboratoryjnych i ocenie wizualnej narządu, która może być nieobiektywna. Ponadto, liczba pacjentów oczekujących na przeszczep wątroby znacznie przewyższa liczbę dostępnych narządów, co powoduje konieczność wykorzystywania organów od dawców nie spełniających standardowych kryteriów, zapewniających, że narząd jest w stosunkowo dobrym stanie i daje większe szanse na powodzenie przeszczepu. W związku z powyższym do przeszczepu kwalifikowane są wątroby dawców o zwiększonym ryzyku, które są bardziej narażone na powikłania pooperacyjne, takie jak uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjne czy dysfunkcja przeszczepu. Nieinwazyjne, szybkie metody analityczne pozwalające na ocenę jakości wątroby na podstawie pomiaru metabolitów w żółci mogą zrewolucjonizować praktykę kliniczną, zwiększając ilość możliwych do przeszczepienia narządów, a przy tym zmniejszając liczbę odrzuceń oraz ryzyko powikłań. Biorąc pod uwagę powyższe, podjęty przez Doktoranta temat badawczy jest istotny klinicznie i poznawczo, a efekt przeprowadzonych badań ma potencjał aplikacyjny.

W skład ocenianej rozprawy doktorskiej wchodzi cztery publikacje naukowe, w tym dwie prace poglądowe oraz dwie badawcze. Wszystkie są pierwszoautorскими publikacjami Doktoranta. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (z ang. *impact factor*) tych prac to ponad 28 punktów oraz 400 punktów MNiSW. Każda z nich została opublikowana w innym czasopiśmie, a trzy w ostatnim zestawieniu bazy *Journal Citation Reports*, opublikowanym w 2025 roku przez *Clarivate Analytics*, znalazły się w najwyższej kategorii Q1. Jak dotąd (październik 2025) prace te łącznie były cytowane 17 razy, w tym ta opublikowana w 2024 roku już 4-krotnie. Świadczy to o istotności wybranej przez Doktoranta tematyki i wartości naukowej prowadzonych badań.

Główne elementy obejmującej 119 stron rozprawy to wstęp, cel pracy, wyniki badań oraz wnioski i bibliografia. Prace poglądowe są wkomponowane w rozdział „Wstęp”, a badawcze w rozdział „Wyniki badań”. Całość jest bardzo spójna tematycznie, co świadczy o tym, że zarówno badania, jak i cała rozprawa, były od początku przemyślane i dobrze zaplanowane. Ponadto, na początku rozprawy umieszczone są: spis treści, wykaz skrótów oraz streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim. Ostatnie części to dorobek naukowy Doktoranta, oświadczenia wszystkich autorów publikacji odnośnie ich roli i udziału w przeprowadzonych badaniach i tworzeniu prac wchodzących w skład rozprawy oraz spis rycin.

W części teoretycznej rozprawy Doktorant przedstawia aktualne dane dotyczące ilości pacjentów potrzebujących przeszczepu wątroby w porównaniu do ilości wykonywanych zabiegów. Dane te pokazują, że potrzeby są dużo większe niż ilość wykonywanych przeszczepów. Wynika to m.in. z jakości dostępnych do przeszczepu narządów. We wstępie przedstawiona jest również charakterystyka donora, z podziałem na dawców spełniających standardowe oraz rozszerzone kryteria, gdzie w przypadku tych drugich ryzyko niepowodzenia przeszczepu jest większe. Badania mgr. Łuczykowskiego mogą przyczynić się do zwiększenia ilości przeszczepów, dzięki dokładniejszej ocenie jakości narządu przeprowadzonej na podstawie molekularnej oceny żółci. W kolejnym podrozdziale wstępu opisane są metody prezerwacji wątroby przed transplantacją. Do tego momentu wstęp obejmował zagadnienia istotne z punktu widzenia tematyki prowadzonych badań, ale nie ujęte w pracach poglądowych. Dalsza część wstępu to prace poglądowe. Pierwsza z nich poświęcona jest najnowszym metodom analizy żółci oraz oznaczania kwasów żółciowych w różnych matrycach biologicznych, które mogą wspierać tradycyjne testy diagnostyczne stosowane do wykrywania dysfunkcji wątroby i chorób dróg żółciowych. Produkowane w wątrobie kwasy żółciowe ulegają wielu przemianom metabolicznym i są obecne w różnych matrycach biologicznych, przez co ich oznaczanie może dostarczać cennych informacji klinicznych wspomagających diagnostykę. W artykule omówione

są różne metody przygotowania próbek i platformy analityczne stosowane do analizy żółci; przykłady mikrobiologicznych, środowiskowych czy „omicznych” badań żółci; czy też możliwości wykorzystania profili kwasów żółciowych jako biomarkerów różnych chorób wątroby i dróg żółciowych. Praca kompleksowo omawia zarówno aspekty techniczne (przygotowanie próbek, platformy analityczne), jak i praktyczne (wykorzystanie żółci i kwasów żółciowych w diagnostyce). Przegląd metod analitycznych jest aktualny, szczegółowy i uzupełniony przykładami zastosowań w badaniach naukowych i klinicznych. Informacje zawarte w tej publikacji są przydatne dla szerokiego grona odbiorców, zarówno analityków, klinicystów, jak i diagnostów laboratoryjnych. Drugi artykuł poglądowy poświęcony jest zastosowaniu ekstrakcji do fazy stałej (SPME) jako narzędzia do pobierania próbek przed analizami mającymi na celu monitorowanie jakości narządów do przeszczepów. W pracy przedstawione są atuty tej metody, takie jak minimalna inwazyjność, możliwość pobierania zarówno lotnych jak i nielotnych metabolitów, duża kompatybilność z technikami opartymi na spektrometrii mas, a także prostota i szybkość wykonania. Wskazane są również ograniczenia tej metody, wśród których można wymienić możliwość wyekstrahowania jedynie wolnej frakcji metabolitów, przez co SPME daje mniej kompleksową informację niż klasyczne przygotowanie próbek (homogenizacja, ekstrakcje rozpuszczalnikami) czy też utrudniona możliwość oznaczania metabolitów znajdujących się na niskich poziomach stężeń. Artykuł ten trafnie podsumowuje potencjał SPME w monitorowaniu przeszczepów narządowych i identyfikacji nowych biomarkerów, ale zwraca też uwagę na ograniczenia tej technologii i konieczność jej dalszego doskonalenia oraz integracji z innymi metodami analitycznymi. Całość wstępu jest spójna i zawiera wszystkie informacje, istotne z punktu widzenia przedstawionych w dalszej części rozprawy badań. Po wstępie umieszczony jest cel pracy, w którym jasno i szczegółowo zostały przedstawione założenia badań wraz ze wskazaniem narzędzi, które zostały wykorzystane by je osiągnąć.

W rozdziale „Wyniki badań” umieszczone są dwie publikacje badawcze. Każda z nich poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim zawierającym informacje o tym czego dotyczyła, jakie przeprowadzono badania, jakie uzyskano wyniki oraz osiągnięte cele badań.

W pierwszej części przeprowadzonych badań, przedstawionych w publikacji *„Biliary Metabolome Profiling for Evaluation of Liver Metabolism and Biliary Tract Function Related to Organ Preservation Method and Degree of Ischemia in a Porcine Model”*, Doktorant skupił się na ocenie wpływu różnych metod konserwacji oraz stopnia niedokrwienia wątroby na zmiany w profilu metabolitów żółci. Celem tych badań była identyfikacja związków drobnocząsteczkowych, które potencjalnie mogą służyć jako biomarkery pozwalające na monitorowanie zmian zachodzących w konserwowanych narządach w okresie okołotransplantacyjnym. Badania przeprowadzono na

modelu zwierzęcym (świnie Yorkshire). Porównano dwa sposoby przechowywania wątroby przed przeszczepem: klasyczną statyczną hipotermię i normotermiczną perfuzję pozaustrojową. Porównano narządy od dawców po zatrzymaniu krążenia z różnym czasem niedokrwienia. Metabolitami żółci, które różnicowały grupy badawcze były głównie kwasy żółciowe, aminokwasy oraz związki lipidowe. Statyczna hipotermia prowadziła do zwiększenia poziomów m.in. kwasu chenodeoksycholowego, kwasu arachidonowego czy też nasyconych i jednonienasyconych lizofosfatydylocholin, co może być związane ze zmianami w szlakach syntezy kwasów żółciowych i stanem zapalnym narządu. Normotermiczna perfuzja pozaustrojowa skutecznie ograniczała negatywny wpływ niedokrwienia na funkcje narządu, a istotne zmiany w składzie żółci obserwowano dopiero po dłuższym (90 min.) czasie niedokrwienia. Krótkotrwałe niedokrwienie przed pobraniem narządu skutkowało istotnymi zmianami w składzie metabolitów w żółci w przypadku konserwacji metodą statycznej hipotermii, a w przypadku drugiej metody zmiany pojawiały się dopiero przy dłuższym czasie niedokrwienia. Uzyskane wyniki badań wskazują, iż normotermiczna perfuzja pozaustrojowa lepiej chroni narząd przed uszkodzeniem niedokrwieniowym, a ponadto zaproponowane zostały potencjalne biomarkery, które mogą być przydatne do oceny jakości narządów przeznaczonych do przeszczepu.

Druga część badań, znajdująca się w publikacji *"Recent solid-phase microextraction-based analytical approaches for the profiling of biliary bile acids in pre-transplant assessments of liver grafts subjected to normothermic ex vivo liver perfusion"*, była poświęcona opracowaniu i walidacji nowoczesnej i szybkiej metody analitycznej do profilowania kwasów żółciowych w żółci, która może być użyteczna do oceny jakości planowanych do przeszczepienia wątrób, zwłaszcza tych charakteryzujących się zwiększonym ryzykiem powikłań. Doktorant zoptymalizował i zwalidował wysokoprzepustową metodę do oznaczania wybranych kwasów żółciowych przy pomocy mikroekstrakcji cienkowarstwowej oraz chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (TFME-LC-MS). Ponadto, aby skrócić czas analizy, zaproponował metodę bezpośredniej analizy kwasów żółciowych z żółci, bez rozdziału chromatograficznego. Wykorzystał do tego bezpośrednie sprzężenie mikroekstrakcji na fazie stałej ze spektrometrem mas za pośrednictwem otwartego interfejsu mikroprzepływowego. Pozwoliło to na uproszczenie etapu przygotowania próbek, skrócenie czasu analizy do kilku minut oraz zminimalizowanie użycia odczynników organicznych. Metody te zostały wykorzystane do oznaczenia kwasów żółciowych w próbkach żółci pobranych podczas przechowywania wątroby przed przeszczepem stosując normotermiczną perfuzję pozaustrojową, w trakcie reperfuzji oraz po przeszczepie. Na podstawie wykonanych oznaczeń Doktorant zaproponował trzy kwasy żółciowe: taurocholowy, glicocholowy oraz glikocheno-deoksycholowy jako markery pozwalające oszacować jakość narządu przed przeszczepem.

Po przeczytaniu obu publikacji badawczych nasunęły mi się następujące pytania:

1. Jak były pobierane próbki żółci w każdej z badanych grup? Jaka była objętość pobieranej próbki?
2. Czy poszczególne grupy próbek (BL, perfusion, reperfusion, POD i SHAM) różniły się znacząco matrycą? W przypadku badań przedstawionych w publikacji P3, jaki był średni całkowity sygnał zarejestrowany dla poszczególnych grup próbek? Jeżeli matryce różniły się, czy była rozważana lub podejmowana próba normalizacji uzyskanych danych w zależności od złożoności badanych próbek?
3. Ad. P3 - Identyfikacja niektórych metabolitów jest bardzo dokładna, np.: 2,5-Dichloro-4-oxohex-2-enedioate czy 4,9-heptadeca-1,4,9-trien-6-yn-3-ol. Na jakiej podstawie dokonano tak precyzyjnej identyfikacji w/w i innych metabolitów?
4. Ad. P4 – Myśląc o praktycznym wykorzystaniu metod przedstawionych w tej publikacji, czy zdaniem Doktoranta metoda pomiaru izobarów kwasów żółciowych przy pomocy SPME-MOI-MS może być wykorzystana do dalszych badań mających na celu wdrożenie oceny jakości wątroby do przeszczepu na podstawie pomiaru kwasów żółciowych w żółci? Czy jednak w dalszych badaniach powinny być ciągle stosowane obie metody by jeszcze porównać ich użyteczność?

Wnioski wyciągnięte przez Doktoranta z przeprowadzonych badań przedstawione są w odrębnym rozdziale. Odpowiadają one postawionym celom pracy. Doktorant wskazuje, że normotermiczna perfuzja maszynowa ogranicza negatywny wpływ niedokrwienia na funkcje wątroby, a pomiar stężenia wybranych metabolitów w żółci może być wykorzystany do oceny stopnia niedokrwienia narządu i jego przydatności do przeszczepu. Ponadto, wykorzystana przez Doktoranta technika mikroekstrakcji do fazy stałej może być z powodzeniem stosowana do przygotowania próbek żółci do oznaczeń metabolomicznych, a zaproponowana metoda SPME-MOI-MS pozwala na uzyskiwanie wyników w krótkim czasie, dzięki czemu może stać się przydatnym narzędziem do oceny funkcji narządów i wczesnej predykcji ewentualnych powikłań po przeszczepie.

W dalszej części rozprawy zebrany jest dorobek naukowy Doktoranta. Pan mgr Kamil Łuczykowski jest współautorem prawie 20 publikacji o łącznym *impact factor* prawie 100 oraz dwóch rozdziałów w książkach i ponad 20 doniesień zjazdowych. Biorąc pod uwagę etap kariery, dorobek ten jest imponujący. Dołączone do rozprawy oświadczenia autorów publikacji będących jej podstawą jasno wskazują, że Pan mgr Kamil Łuczykowski jest wiodącym autorem wszystkich tych prac, a jego pierwsza pozycja na liście autorów jest adekwatna do włożonej pracy. Spis literatury to jedynie 18

pozycji. Wynika to z faktu, że w dokument wkomponowane są 4 publikacje, a dodatkowe treści są uzupełnieniem o informacje których nie ma w tych pracach, tak by rozprawa stanowiła spójną całość.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pana mgr. Kamila Łuczykowskiego została przygotowana z dbałością o walory estetyczne i niemal brak w niej błędów stylistycznych czy edytorskich. Pojedyncze błędy jakie znalazłem to określenie „spektrometrem masowym” zamiast „spektrometrem mas” w streszczeniu oraz na stronie 77, a także „metabomicznych” zamiast „metabolomicznych” na stronie 31. Ponadto na tej samej stronie technika SPME jest wskazana jako skuteczne narzędzie do oznaczania związków. Rozumiem, że jest to skrót myślowy, jednak w tekście naukowym powinno to być opisane precyzyjnie. Jest to technika przygotowania próbki do oznaczania związków. Podobnie w celu rozprawy, zdanie „...rozwiązań analitycznych poszukujących parametrów lub związków umożliwiających bardziej efektywną ocenę jakości narządów przed transplantacją.” zmodyfikowałbym następująco: „...rozwiązań analitycznych poszukujących parametrów lub związków, których pomiar umożliwi bardziej efektywną ocenę jakości narządów przed transplantacją.” Błędy te są jednak marginalne, a od strony merytorycznej przeprowadzone badania wnoszą istotny wkład w rozwój transplantologii wątroby. Opracowane metody analityczne mogą przyczynić się do stworzenia szybkiej, precyzyjnej i ekologicznej diagnostyki pozwalającej na ocenę jakości przeszczepianych narządów na podstawie analizy metabolitów żółci.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, iż zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742), oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu dziełom. W związku z czym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. Kamila Łuczykowskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora. Ponadto, w związku z tym, iż przeprowadzone badania są na wysokim poziomie naukowym, wyróżniają się innowacyjnością, a uzyskane wyniki mają potencjał aplikacyjny przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Białystok, 31.10.2025

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Lekarskiej
Ciborowski
prof. dr hab. Michał Ciborowski