

Recenzja rozprawy doktorskiej
na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne
Pana mgr Kamila Mateusza Łuczykowskiego
pt. „Nowe możliwości diagnostyczne w monitorowaniu funkcji wątroby
od pobrania narządu do przeszczepienia”

wykonanej w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Wydział Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w
Toruniu

Zakład Chemii
Analitycznej Katedry
Chemii Ogólnej i
Analitycznej

Promotor: prof. dr hab. Barbara Bojko

Rozprawa doktorska na podstawie cyklu publikacji

41-200 Sosnowiec

ul. Jagiellońska 4

www.sum.edu.pl

dr hab. n. farm.

Małgorzata Dołowy

mdolowy@sum.edu.pl

tel.: (+48 32) 364 16 92

Recenzja niniejszej pracy doktorskiej została przygotowana na podstawie materiałów przesłanych przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Nauki Medycznej Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu Panią Prof. UMK dr hab. Iwonę Sadowską-Krawczenko.

Cykl prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe składa się z 4 publikacji powstałych w latach 2021-2024, dwóch przeglądowych i dwóch doświadczalnych, które wpisują się w założony temat rozprawy doktorskiej tj. opracowanie innowacyjnych metod diagnostycznych do monitorowania funkcji wątroby od pobrania narządu do jej przeszczepienia. Tematyka rozprawy doktorskiej jest oryginalna. Praca posiada dużą wartość aplikacyjną z uwagi na możliwość zastosowania nowo opracowanych przez Doktoranta metod diagnostycznych w praktyce klinicznej, w obszarze współczesnej transplantologii jako skutecznego sposobu leczenia różnych postaci ciężkiej niewydolności wątroby i dróg żółciowych. Łączna wartość punktów MNiSW dla prac wchodzących w skład cyklu wynosi 400. Natomiast sumaryczna wartość wskaźnika IF dla tych prac to 28,008.

Wymienione prace to:

Praca nr 1 (P1): K. Łuczykowski, N. Warmuzińska, B. Bojko: Current approaches to the analysis of bile and the determination of bile acids in various biological matrices as supportive tools to traditional diagnostic testing for liver dysfunction and biliary diseases. *Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 142, 116307. Punktacja MNiSW: 140, IF: 14,908.

Udział Doktoranta (zgodnie z oświadczeniem): dokonanie przeglądu literatury, opracowanie szczegółowej koncepcji manuskryptu, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu, wprowadzanie poprawek, odpowiedź na recenzje, akceptacja końcowej wersji manuskryptu.

Publikacja nr 1 jest artykułem przeglądowym, w którym Doktorant w sposób ciekawy i rzeczowy opierając się na 88 pozycjach literaturowych zaprezentował w pierwszej jej części zagadnienia ogólne związane z zastosowaniem żółci jako matrycy biologicznej do celów diagnostyki medycznej, w tym m.in. do wykrywania schorzeń wątroby i dróg żółciowych. W drugiej części pracy dokonano natomiast szczegółowego przeglądu różnych metod instrumentalnych (analitycznych platform), w tym nowoczesnych systemów chromatograficznych wykorzystywanych do efektywnej analizy wolnych i związanych odpowiednio z glicyną lub tauryną kwasów żółciowych w różnych próbkach biologicznych (krew, mocz, żółć) jako potencjalnych biomarkerów, które mogą być pomocne w tradycyjnej diagnostyce zaburzeń czynności wątroby i chorób dróg żółciowych. Ponadto w pracy tej w sposób interesujący omówiono nowoczesne strategie w biologii z wykorzystaniem żółci jako matrycy biologicznej, takie jak genomika, proteomika, metabolomika i lipidomika.

Praca nr 2 (P2): K. Łuczykowski, N. Warmuzińska, B. Bojko: Solid phase microextraction – a promising tool for graft quality monitoring in solid organ transplantation. *Separations*, 2023, 10, 153. Punktacja MNiSW: 20, IF: 2,500.

Udział Doktoranta (zgodnie z oświadczeniem): dokonanie przeglądu literatury, opracowanie szczegółowej koncepcji manuskryptu, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu, wprowadzanie poprawek, odpowiedź na recenzje, akceptacja końcowej wersji manuskryptu.

Publikacja nr 2 jest kolejnym artykułem przeglądowym, w którym poparte szczegółową analizą 46 pozycji piśmiennictwa Autor zaprezentował i omówił przykłady zastosowania techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) do monitorowania jakości przeszczepów organów mięsnych, takich jak wątroba, płuca, nerki i serce pochodzenia ludzkiego lub z wykorzystaniem modelu zwierzęcego. W postaci tabeli (Tabela 1, str. 5-7) dokładnie

zaprezentowano i porównano warunki prowadzenia tego procesu w odniesieniu do danego materiału biologicznego i monitorowanego organu, w tym sposób przygotowania próbki biologicznej (np. żółć, surowica krwi, popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe), a także stosowany typ fazy stacjonarnej pokrywającej włókno SPME. Ponadto, w pracy tej zestawiono przykłady analitów, do których należały również wybrane kwasy żółciowe wyodrębniane z materiału biologicznego z użyciem odpowiednio zaprojektowanego procesu SPME, jako potencjalne markery do oceny jakości danego narządu (płuca, wątroba, serce) podczas różnych etapów procesu przeszczepiania. W konkluzjach niniejszej pracy przeglądowej stwierdzono, że SPME jest małoinwazyjnym narzędziem analitycznym, które wykazuje duże możliwości wykorzystania w procesie diagnostycznym okołotransplantacyjnym, jak również do monitorowania stanu przeszczepu po operacji. Stwierdzono, że dzięki znacznemu progresowi w zakresie materiałów stosowanych do mikroekstrakcji tj. różnych typów włókien SPME, istnieje możliwość bezpośredniego monitorowania procesów biochemicznych odzwierciedlających zmiany zachodzące w przeszczepie w całym okresie transplantacji. Natomiast sprzężenie techniki SPME ze spektrometrią masową umożliwia szybkie i czułe oznaczanie ilościowe różnych analitów w czasie prawie rzeczywistym.

Reasumując, należy podkreślić, że Doktorant wykazał się bardzo dobrym doбором i wykorzystaniem literatury do przygotowania obu prac przeglądowych. W mojej opinii konkluzje zawarte w tych dwóch pracach przeglądowych stały się istotną przesłanką do podjęcia przez Doktoranta w kolejnym etapie realizacji pracy doktorskiej badań eksperymentalnych związanych z założonym tematem rozprawy z wykorzystaniem techniki SPME w połączeniu ze spektrometrem masowym do profilowania metabolicznego żółci z zastosowaniem modelu wieprzowego jako nowatorskiego narzędzia do oceny jakości wątroby przeznaczonej do transplantacji.

Kolejne dwie publikacje (P3 i P4) to oryginalne prace prezentujące wyniki badań własnych Doktoranta. Szczegółowymi celami i założeniami prac doświadczalnych była ocena wpływu różnych metod konserwacji wątroby oraz stopnia niedokrwienia tego organu na zmiany profilu metabolomicznego żółci z wykorzystaniem wieprzowego modelu zwierzęcego oraz opracowanie wysokoprzepustowego protokołu przygotowania próbek żółci opartego na mikroekstrakcji cienkowarstwowej (TFME) w połączeniu z analizą metabolomiczną z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas tj. LC-MS. Eksperymenty prowadzono na modelu wątroby wieprzowej podchodzącej od dwóch grup dawców tj. z bijącym sercem (HBD) i odpowiednio dawców po śmierci krążeniowej (DCD), co

odpowiadało grupie dawców ze standardowych i rozszerzonych kryteriów. Należy podkreślić, że badania te miały charakter wielośrodkowy i odbywały się w ramach współpracy z dwoma zagranicznymi ośrodkami naukowymi, jakim był Department of Surgery, Ajmera Transplant Centre, Toronto General Hospital, University Health Network (Toronto Kanada) oraz Department of General Surgery, Medical University of Vienna (Wiedeń, Austria). Potwierdza to umiejętność podejmowania i prowadzenia przez Doktoranta współpracy międzynarodowej. Należy również podkreślić, że przeprowadzone w pracy eksperymenty z udziałem modelu zwierzęcego odbywały w oparciu o zgodę wydaną przez Animal Resource Centre from University Health Network (P3, str. 14).

Praca nr 3 (P3): K. Łuczykowski, N. Warmuzińska, D. Kollmann, M. Selzner, B. Bojko:

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. *Int. J.Mol. Sci.*, 2023, 24, 2127. Punktacja MNiSW: 140, IF: 4,900

Udział Doktoranta (zgodnie z oświadczeniem): przeprowadzenie analizy instrumentalnej, analizy statystycznej uzyskanych wyników oraz ich interpretacji, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu, wprowadzenie poprawek, odpowiedź na recenzje, akceptacja końcowej wersji manuskryptu.

Powyższa publikacja nr 3 ma nowatorski charakter. Po raz pierwszy dokonano w niej oceny metabolomu żółci w zależności od różnych warunków konserwacji wątroby oraz stopnia niedokrwienia tego narządu wykorzystując technikę SPME w połączeniu z LC-MS. W pracy tej, w sposób niezwykle rzeczowy i staranny zaprezentowano poszczególne etapy przeprowadzonych w tym celu eksperymentów, w tym omówiono warunki prowadzenia hipotermii prostej (SCS) i normotermicznej perfuzji wątroby *ex vivo* (NEVLP) oraz opisano etap przygotowania próbek żółci metodą mikroekstrakcji cienkowarstwowej (TFME) do analizy LC-MS. Dodatkowo zaprezentowano pełną charakterystykę układu chromatograficznego stosowanego w metodzie LC-MS do identyfikacji metabolitów w analizowanej żółci stanowiących liczną grupę związków organicznych o zróżnicowanej budowie, w tym kwasów żółciowych jako potencjalnych markerów zmian występujących w przeszczepianym narządzie. Na uwagę zasługuje bardzo praktyczny graficzny schemat prowadzonego eksperymentu zamieszczony w pracy doktorskiej na ryc. 2 (str. 50). Zaprezentowane w pracy (P3) wyniki badań potwierdzają fakt, że analiza składu żółci, w tym

kwasów żółciowych może dostarczyć istotnych informacji nt. stanu badanego narządu. Wykonane przez Doktoranta badania wykazały, że poziom poszczególnych indywidualnych kwasów żółciowych w żółci może zależeć od sposobu konserwacji narządu oraz stopnia jego niedokrwienia. W pracy udowodniono, że ocena poziomu kwasów żółciowych, w tym kwasu chenodeoksycholowego, tauroursodeoksycholowego i glikohyocholowego oraz lipidów z grupy pochodnych lizofosfatydylocholiny (LPC) i lizofosfatydyloetanolaminy (LPE) jest pomocna do oceny wpływu danej metody konserwacji i czasu niedokrwienia badanego narządu na jego stan podczas przeszczepiania. Fakt ten potwierdzają otrzymane na drodze licznie przeprowadzonych eksperymentów wyniki w postaci rycin i tabel zamieszczone w publikacji P3 oraz odpowiednio w suplemencie do tej publikacji.

Praca nr 4 (P4): K. Łuczykowski, N. Warmuzińska, K. Jaroch, D. Kollmann, M. Selzner, B. Bojko: 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. *Anal. Chim. Acta*, 2024, 1318, 342954. Punktacja MNiSW: 100, IF: 5,700.

Udział Doktoranta (zgodnie z oświadczeniem): przeprowadzenie analizy instrumentalnej, analizy statystycznej uzyskanych wyników oraz ich interpretacji, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu, wprowadzenie poprawek, odpowiedź na recenzje, akceptacja końcowej wersji manuskryptu.

Publikacja nr 4 stanowi kontynuację poprzedniej pracy doświadczalnej – P3, w której udowodniono wpływ sposobu konserwacji oraz niedokrwienia wątroby na różnice w poziomach oznaczanych w żółci kwasów żółciowych.

Celem publikacji 4 (P4) jako kontynuacji podjętych już wcześniej przez Doktoranta badań było opracowanie wysokoprzepustowej i celowanej metody oznaczania wybranych kwasów żółciowych z wykorzystaniem techniki mikroekstrakcji cienkowarstwowej (TFME) w połączeniu z LC-MS oraz dodatkowo techniką SPME sprzężoną ze spektrometrem masowym za pośrednictwem otwartego interfejsu mikroprzepływowego (MOI-MS). Powyższe badania przeprowadzono na próbkach żółci zebranych podczas wcześniejszego eksperymentu, którego celem było określenie wpływu niedokrwienia na przeszczep wątroby z zastosowaniem normotermicznej perfuzji *ex vivo* na modelu wieprzowym. Nowo opracowaną metodę, która co ważne wpisuje się w obszar tzw. zielonej chemii w pełni zwalidowano zgodnie z wytycznymi określonymi przez US FDA (Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków). Zaprezentowane w

publikacji wyniki wskazują na to, że opracowana metoda TFME-LC-MS jest selektywna, precyzyjna, dokładna i czuła do oznaczania w żółci stosunkowo dużej liczby, bo aż kilkunastu wolnych lub związanych z tauryną lub glicyną kwasów żółciowych jako potencjalnych biomarkerów służących do określania jakości i funkcji wątroby przeznaczonej do potencjalnego przeszczepiania lub do oceny dysfunkcji dróg żółciowych. Ponadto, bardzo pomocną do tych celów, a przy tym szybszą bo bez konieczności wcześniejszego rozdziłu chromatograficznego kwasów żółciowych oraz ekologiczną, jak dowiodły wyniki uzyskane w publikacji P4 okazała się druga z proponowanych metod tj. SPME- MOI-MS. Bardzo cenne z praktycznego punktu widzenia jest porównanie przez Doktoranta wyników otrzymanych za pomocą ww. metod. Wysoka korelacja między wynikami obu potwierdziła fakt, że te dwie nowo opracowane przez Doktoranta metodologie są obiecujące jeśli chodzi o ich potencjalne zastosowanie do oceny profilu kwasów żółciowych w matrycach biologicznych, w schorzeniach wątroby i dróg żółciowych.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Kamila Mateusza Łuczykowskiego napisana jest w sposób staranny, poprawną polszczyzną z zastosowaniem fachowej terminologii. Praca liczy 119 stron wraz z piśmiennictwem, które przedstawia aktualny stan wiedzy na temat zagadnień poruszonych w niniejszej pracy doktorskiej.

Tytuł dysertacji został prawidłowo sformułowany i odzwierciedla postawione w pracy cele badawcze. Tematyka ocenianej pracy bardzo dobrze wpisuje się w obszar badań prowadzonych od wielu lat przez Panią Profesor dr hab. Barbarę Bojko tj. związanych z zastosowaniem techniki SPME w badaniach metabolomiki różnych próbek biologicznych do celów diagnostyki medycznej. Układ pracy jest prawidłowy i typowy dla dysertacji realizowanych w oparciu o spójny tematycznie zbiór publikacji. Dodatkowo w pracy zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w tekście pracy, co ułatwia jej lekturę, a także zwięzłe streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz dorobku i kopie publikacji wchodzących w skład cyklu. Do pracy załączono także spis rycin. Ponadto w rozdziałach 10 i 11 dysertacji Doktorant zamieścił oświadczenia autora/współautorów o wkładzie pracy w powstanie publikacji, na których podstawie oparta jest rozprawa. Z załączonych do pracy oświadczeń wynika, że udział Doktoranta w powstawanie poszczególnych prac jest znaczący. We wszystkich 4 publikacjach stanowiących cykl Doktorant jest pierwszym autorem. Uzyskane w pracy wyniki są oryginalne. Do ich opracowania Doktorant zastosował różne narzędzia statystyczne, w tym także techniki

chemometryczne, co bardzo ułatwiło interpretację uzyskanych wyników badań i wyciągnięcie na ich podstawie cennych wniosków z przeprowadzonych doświadczeń. Sformułowane przez Doktoranta wnioski są wyczerpujące i dobrze korespondują z uzyskanymi wynikami badań oraz z założonym celem pracy.

Na szczególne podkreślenie zasługuje bogaty dorobek naukowy Doktoranta, który w sumie obejmuje 17 publikacji naukowych, w większości przypadków opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz współautorstwo dwóch rozdziałów wydanych w postaci monografii naukowych. Według danych bibliograficznych z dnia 16.04.2025 łączna liczba punktów MNiSW dla tych prac wynosi 1920, a wskaźnik IF=93,255.

Ponadto Pan mgr Kamil Mateusz Łuczykowski wykazał się dużą aktywnością konferencyjną. Jest współautorem 23 wystąpień prezentowanych na konferencjach zarówno krajowych jak i zagranicznych.

Niewątpliwie imponująca jest liczba projektów naukowych, w których uczestniczył Doktorant, dwukrotnie jako kierownik oraz trzy razy w roli współwykonawcy, co świadczy o dużej umiejętności Doktoranta do pozyskiwania środków na badania naukowe i ich właściwego wykorzystania, czego dowodem są publikacje naukowe, powstałe w ramach tych projektów, w tym również te stanowiące część rozprawy doktorskiej. Fakt kierowania przez Pana mgr Kamila Mateusza Łuczykowskiego dwoma projektami naukowymi realizowanymi w ramach konkursu Preludium 21 (grant Narodowego Centrum Nauki) oraz grantem dedykowanym dla młodych naukowców potwierdza doskonałe przygotowanie i zdolność Doktoranta do samodzielnego prowadzenia i koordynowania badaniami naukowymi.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pana mgr Kamila Mateusza Łuczykowskiego, której podstawą były 4 spójne tematycznie publikacje stanowi nowatorskie rozwiązanie problemu zdefiniowanego w tytule pracy, a nowo opracowane przez Doktoranta metody mogą być z powodzeniem wykorzystane w rutynowej diagnostyce medycznej do oceny profili kwasów żółciowych w matrycach biologicznych w schorzeniach wątroby i dróg żółciowych, jak również do oceny jakości wątroby przeznaczonej do celów transplantologii. Doktorant wykazał się dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością planowania i prowadzenia badań. Rozprawę doktorską autorstwa Pana mgr Kamila Mateusza Łuczykowskiego pt. *„Nowe możliwości diagnostyczne w monitorowaniu funkcji wątroby od pobrania narządu do przeszczepienia”* oceniam pozytywnie. Rozprawa spełnia

warunki formalne określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (z późniejszymi zmianami) i mam zaszczyt wnosić do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu o jej przyjęcie i dopuszczenie Pana mgr Kamila Mateusza Łuczykowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej, potwierdzoną wysokim współczynnikiem oddziaływania prac wchodzących w skład cyklu publikacji, stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej, zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

A D I U N K T
Zakładu Chemii Analitycznej
Katedry Chemii Ogólnej i Analitycznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
dr hab. n. farm. Małgorzata Dolowy