

## Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Karol Paweł Jarocho

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

**2014/09** - tytuł zawodowy magistra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy.

Tytuł pracy: Ocena sprawności homologicznej rekombinacji w komórkach chomika chińskiego wrażliwego na czynniki wprowadzające wiązania krzyżowe do DNA, promotor dr n. med. Aneta Białkowska, Katedra i Zakład Genetyki Molekularnej Komórki

**2016/04** - tytuł zawodowy magistra Farmacji, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

Tytuł pracy: Badania cytotoksyczności oksazolowych pochodnych kombretastatyny, promotor dr n. farm Anna Sloderbach, Katedra i Zakład Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej

**2019/09** - stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

Tytuł pracy: Badania cytotoksyczności i metabolizmu kombretastatyny A4 oraz analizy metabolomiczne linii komórkowych z wykorzystaniem nowatorskich metod mikroekstrakcyjnych, promotor: dr hab. n. farm. Barbara Bojko, recenzenci: prof. dr hab. Hanna Piotrowska-Kempisty, dr hab. Michał Ciborowski

Praca została obroniona z wyróżnieniem

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

Zatrudnienie

- 2014/12-2021/05** asystent w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy
- 2020/01-2020/12** zatrudnienie na stanowisku postdoctoral fellow na Wydziale Chemii, Uniwersytet w Waterloo, Waterloo Kanada
- 2021/06-obecnie** adiunkt w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

Stáže naukowe

- 2016/02/27-2016/04/08** Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet w Oslo, Oslo, Norwegia  
Wyjazd realizowany w ramach programu „Staff Mobility for Training” finansowanego przez FSS/EEA & Erasmus+
- 2017/02/01-2017/03/22** Wydział Chemii, Uniwersytet w Waterloo, Waterloo Kanada  
Wyjazd realizowany w ramach realizacji grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, Konkurs Harmonia 7. Tytuł projektu: „Nowe rozwiązania analityczne w onkologii: od badań podstawowych do szybkiej diagnostyki śródoperacyjnej”, 2015/18/M/ST4/00059
- 2022/11/07-2022/11/22** Wydział Chemii, Uniwersytet Wiedeński, Wiedeń, Austria

Wyjazd realizowany w ramach realizacji grantu finansowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej. Tytuł projektu: „Standaryzowanie metod mikroekstrakcyjnych dla czasowo-rozdzielczej metabolomiki”, PPN/BAT/2021/1/00020/U/00001

**2023/01/05-2023/01/15**

Wydział Chemii, Środkowo-Wschodni Uniwersytet Techniczny, Ankara, Turcja

Wyjazd realizowany w ramach realizacji grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Tytuł projektu: „Innowacja w badaniach translacyjnych: biokompatybilne mikrosondy do badań nowotworów in vitro i in vivo”, POLTUR4/MicroIVIVE/5/2021

#### 4. Omówienie osiągnięć

Pierwsze osiągnięcie to cykl czterech prac powiązanych tematycznie, objętych wspólnym tytułem:

### Wykorzystanie metod mikroekstrakcyjnych w analizach próbek biologicznych o ograniczonej dostępności

#### Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe jest udokumentowane cyklem **4 artykułów naukowych** przedstawionych poniżej, które zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach obecnych w bazie Journal Citation Reports (JCR). Łączny wskaźnik oddziaływania (ang. impact factor, IF) wynosi **37.207**, natomiast punktacja Ministerstwa Nauki i Edukacji to **520 punktów**. We wszystkich publikacjach jestem pierwszym autorem oraz osobą odpowiedzialną za zaplanowanie oraz przeprowadzenie eksperymentów, analizę danych jak i pisanie manuskryptów.

[A-1] Jiang Runshan Will\*, **Jaroch Karol\***, Pawliszyn Janusz.

Solid-phase microextraction of endogenous metabolites from intact tissue validated using a Biocrates standard reference method kit.

J. Pharm. Anal. 2023 : Vol. 13, nr 1, s. 55-62. \*equal contribution

**IF:** 8.8

**MNiSW:** 140 punktów

[A-2] **Jaroch Karol**, Pawliszyn Janusz.

Time-course monitoring of in vitro biotransformation reaction via solid-phase microextraction-ambient mass spectrometry approaches.

J. Pharm. Anal. 2022 : Vol. 12, nr 1, s. 186-191.

**IF:** 8.8

**MNiSW:** 140 punktów

[A-3] **Jaroch Karol\***, Modrakowska Paulina\*, Bojko Barbara.

Glioblastoma metabolomics : in vitro studies.

Metabolites 2021 : Vol. 11, nr 6, s. 1-34;, 315. \*equal contribution

**IF:** 5.581

**MNiSW:** 100 punktów

[A-4] **Jaroch Karol**, Taczyńska Paulina\*, Czechowska Marta\*, Bogusiewicz Joanna,

Łuczykowski Kamil, Burlikowska Katarzyna, Bojko Barbara.

One extraction tool for in vitro-in vivo extrapolation? SPME-based metabolomics of in vitro 2D, 3D, and in vivo mouse melanoma models.

J. Pharmaceut. Anal. 2021 : Vol. 11, nr 5, s. 667-674.

**IF:** 14.026

**MNiSW:** 140 punktów

## Omówienie osiągnięcia naukowego będącego cyklem prac naukowych

W trakcie pracy nad rozprawą doktorską, w przypadku optymalizacji protokołu ekstrakcji prowadzonej z hodowli komórkowych, aby móc wyekstrahować badane związki w danym punkcie czasowym wielokrotnie stawałem przed koniecznością terminacji hodowli. Takie działanie jest nieoptymalne, gdyż powoduje konieczność multiplikacji badanego materiału, wymuszając tym samym zwiększenie nakładu pracy oraz zużycia i kosztów odczynników, co nie jest pozostaje bez wpływu na otaczające środowisko. Nawet w przypadku hodowli komórkowych linii ustalonych, występują różnice fenotypowe między kolejnymi pasażami, które mogą powodować zmienność w odpowiedzi komórek na badany czynnik. W przypadku hodowli pierwotnych, komórek nie można hodować bezterminowo, ponieważ każda z wyprowadzonych linii charakteryzuje się ograniczoną liczbą podziałów mitotycznych, po których następuje proces programowanej śmierci komórki. Dodatkowo, zmienność fenotypowa takich hodowli przebiega bardzo szybko. W zależności od pochodzenia tkankowego, komórki potrafią się odróżnicować i stracić cechy biochemiczne charakterystyczne dla stanu *in vivo* na przestrzeni kilku pasaży. Dlatego, w trakcie tego relatywnie krótkiego okresu, istotnym jest uzyskanie jak największej ilości danych z takiej hodowli. Można to osiągnąć stosując nowoczesne i wyrafinowane metody badawcze i/lub łącząc różne rodzaje oznaczeń. W drugim przypadku wybrane metody muszą być ze sobą kompatybilne, co oznacza, że jedno oznaczenie nie powinno interferować w kolejne. Jedną z relatywnie nowych dziedzin nauki w aplikacjach związanych z hodowlami komórkowymi jest metabolomika. Nauka ta zajmuje się opisywaniem związków niskocząsteczkowych, których profil w badanym układzie jest wynikiem czynników wewnętrznych – genomu, transkryptomu oraz zewnętrznych – wpływu środowiskowa. W standardowych protokołach metabolomicznych hodowli komórkowych stosuje się rozpuszczalniki organiczne, których podanie do badanego układu powoduje natychmiastowe uśmiercenie komórek. Po przeprowadzeniu takiego protokołu nie ma możliwości wykonania innych oznaczeń z tego samego materiału, dotyczy to zarówno prostych oznaczeń cytotoksyczności, jak i bardziej złożonych protokołów, np. immunochemicznych (w tym obrazowania morfologicznego czy badań biochemicznych danej hodowli). Należy też pamiętać, że prowadzenie badań na modelach *in vitro* ma na celu ominięcie oznaczeń na modelach zwierzęcych *in vivo* lub *ex vivo* albo zredukowanie liczby osobników, oraz w badaniach klinicznych. Dlatego opracowując nowe protokoły analityczne, w tym oznaczenia metabolomiczne, stosowane w hodowlach komórkowych należy porównywać je do badań na organizmach żywych. Dobór modelu komórkowego (rodzaj komórek, typ prowadzonej hodowli, stosowane media

komórkowe oraz dodatki do tychże) oraz odpowiedniej techniki analitycznej (hamowanie metabolizmu komórkowego, metoda preparatyki próbki, analiza instrumentalna, analiza danych) powinien cechować się wysokim poziomem ekstrapolacji *in vitro* - *in vivo* (ang. *in vitro* to *in vivo* extrapolation, IVIVE). W przypadku chorób nowotworowych najistotniejszym źródłem odniesienia dla hodowli komórkowych powinna być tkanka nowotworowa, dlatego tworząc nowy model *in vitro* należy zadbać o jak najwyższy poziom IVIVE względem tkanki *in vivo*.

Chcąc zaadresować problemy towarzyszące badaniom komórkowym rozpocząłem od przeglądu literatury, aby przeanalizować obecny stan wiedzy dotyczący badań metabolomicznych hodowli komórkowych. Dzięki temu zidentyfikowałem obszary do kontynuowania wdrażania nowatorskich rozwiązań analitycznych do badań *in vitro* [A-3]. W pracy pogładowej jako model wybrałem glejaki. Doświadczenie w pracy na tym modelu nabyłem jeszcze jako uczestnik studiów doktoranckich, w trakcie realizacji grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, konkurs: HARMONIA 7, o tytule: „Nowe rozwiązania analityczne w onkologii: od badań podstawowych do szybkiej diagnostyki śródoperacyjnej”. Projekt ten zakładał prowadzenie oznaczeń metabolomicznych *ex vivo* na tkance natywnej (nie poddanej homogenizacji), a protokół ekstrakcyjny miał być jak najmniej inwazyjny i destrukcyjny dla tej tkanki, tak aby mogła być wykorzystana w następczej analizie histopatologicznej.

W modelach *in vitro*, dobór protokołu preparatyki próbek rozpoczyna się od identyfikacji czy w danym eksperymencie badacze skupiają się na analizie metabolomu zewnątrzkomórkowego (egzometabolom) czy wewnątrzkomórkowego (endometabolom). W pierwszej opcji protokół jest zdecydowanie mniej skomplikowany i zaczyna się od pobrania medium komórkowego kondycjonowanego związkami wydzielonymi do niego przez komórki. Następnie dochodzi do zahamowania metabolizmu, najczęściej przez umieszczenie próbki w ciekłym azocie, rozmrożenie oraz dalszą preparatykę próbki wybraną metodą analityczną. Analiza wewnątrzkomórkowa jest trudniejsza ze względu na konieczność uwolnienia związków niskocząsteczkowych, aby były one dostępne dla wybranej metody ekstrakcji oraz szybkiego i skutecznego hamowania metabolizmu komórek. Podobnie jak w analizie egzometabolomu, pierwszy etap polega na zebraniu starego medium z nad komórek, następnie komórki są najczęściej przemywane zimnym roztworem PBS. Celem tego etapu są dwa główne elementy: zahamowanie metabolizmu przez niską temperaturę oraz dokładne wypłukanie medium komórkowego. Pozostałości mogłyby zaburzyć analizę, gdyż może dojść do „kontaminacji” metabolomem zewnątrzkomórkowym. Do tego momentu większość

protokołów jest bardzo zbieżna, wykazując jedynie subtelne różnice: prowadzenie dwóch płukań zamiast jednego, wykorzystanie 0,9% roztworu NaCl zamiast PBS. Natomiast w kolejnym etapie widać wyraźny podział na dwie główne strategie: 1) podanie roztworu organicznego bezpośrednio na płytkę/butlę hodowlaną lub 2) oderwanie komórek od płytki hodowlanej i następnie analiza wybraną metodą preparatyki próbek. W pierwszej opcji najczęściej wybierany jest metanol (lub jego mieszanina z wodą) lub acetonitryl (również czasami w połączeniu z wodą). Następnie, próbka poddawana jest ultrawiroowaniu i w kolejnym etapie przeprowadza się analizę instrumentalną. Do odklejania komórek najczęściej wykorzystywany jest 0,25% roztwór trypsyny, jest to enzym proteolityczny szeroko stosowany w hodowlach komórkowych, gdzie służy do prowadzenia pasażu komórek adherentnych. Drugą wykorzystywaną metodą do odklejenia komórek jest ich fizycznie odrywanie za pomocą specjalnych „skrobaczek” do komórek (ang. scrappers), to podejście powoduje niszczenie komórek, ale skoro celem jest analiza endometabolomu nie ma to większego znaczenia dla całego protokołu. Następnie próbka jest przenoszona do probówki, odwirowywana, a osad komórkowy zawieszany w roztworze organicznym. Ostatnim etapem jest wytrząsanie, ponowne wirowanie i poddanie supernatantu analizie instrumentalnej. W niektórych przypadkach łączono bezpośrednią analizę w naczyniu hodowlanych oraz odklejanie komórek, w tym celu opłukane z medium komórki zalewano roztworem organicznym, a następnie odrywano w/w skrobaczkami do komórek. Względnie częstą modyfikacją ekstrakcji ciecz-ciecz (ang. liquid-liquid extraction, LLE) było prowadzenie ekstrakcji trzema odczynnikami podawanymi konsekwentnie: woda, metanol, chloroform (w analizowanych pracach kolejność dodawania była zróżnicowana). Po ekstrakcji fazy były rozdzielane, chloroform zawierał głównie lipidy i związki niepolarnie, a faza wodno-metanolowa związki polarne. Wyżej opisane, metody preparatyki próbek stosowane w hodowlach komórkowych GBM, stosowane także w innych modelach komórkowych *in vitro*, mimo że zawierają kilka etapów, są raczej proste do wykonania, a najczęściej wybraną metodą ekstrakcyjną jest ekstrakcja ciecz-ciecz. Cechuje się ona bardzo szerokim spektrum ekstrahowanych związków, jednak z drugiej strony procedura są wieloetapowa oraz nie jest możliwe jej wykorzystanie w systemie wysokoprzepustowym. Dodatkowo, prowadzenie ekstrakcji jest terminalne dla hodowli co wymusza konieczność multiplikacji próbek oraz uniemożliwia wykorzystanie tej samej próbki do innych analiz. Pozostawia to szerokie pole do manewru dla wykorzystania nowszych, zużywających mniej rozpuszczalników organicznych i/lub rozpuszczalników, mniej toksycznych dla ludzi i środowiska metod preparatyki próbek. Dodatkowo oczyszczanie próbek tylko przez ultrawiroowanie jest

rozwiązaniem bardzo niebezpiecznym dla instrumentów analitycznych szeroko stosowanych w metabolomice czyli chromatografach cieczowych sprzężonych ze spektrometrią mas (ang. liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS). Nigdy nie jest pewne, że wszystkie białka, peptydy czy nawet pozostałości komórek bądź zostały odwirowane do osadu, a elementy te w bardzo łatwy sposób mogą negatywnie wpłynąć na instrumenty analityczne dostosowane do badań metabolomicznych. Ponadto nierozpuszczalne sole nieorganiczne, niezbędne składniki medium komórkowego, pozostają obecne w próbce i interferują oznaczenia metabolomu. Ich obecność w układzie LC-MS jest jedną z przyczyn występowania efektu przenoszenia matrycy (ang. matrix effect, ME), czyli zjawiska, które występuje gdy związki które nie są analizowane wpływają na stopień jonizacji związków analizowanych. Potencjalnie powoduje to niekontrolowane różnice w intensywności sygnału wynikające z supresji bądź nasilenia jonizacji danego związku. Sole również mogą się wytrącać w cienkich kapilarach układu LC czy w samym MS (najczęściej w źródle) stopniowo zmniejszając jakość odczytu spektrometru mas oraz wymuszając częstsze czyszczenie i kalibrację instrumentu. Jedną z możliwości rozwiązania tych problemów jest zastosowanie metodologii o wyższym stopniu oczyszczania próbki ze składników matrycy.

Jak pokazuje wykonany przeze mnie przegląd literatury [A-3], wykorzystanie odpowiedniego modelu hodowli komórkowych pozwala na osiągnięcie zadowalającego efektu IVIVE. Wśród związków drobnocząsteczkowych wytypowano: kwas  $\alpha$ -ketoglutazarowy ( $\alpha$ -KG), kwas 2-hydroksyglutarowy (2-HG), kwas N-acetylo-asparaginowy (NAA) oraz kwas glutaminowy (Glu), jako najbardziej dokładne biomarkery glejaka wielopostaciowego oznaczane *in vivo*. Wiele badań metabolomicznych hodowli komórkowych, gdzie platformą analityczną był LC-MS jak i NMR, wykazały obecność w/w związków w analizowanych ekstraktach. Związki te wykryto zarówno w liniach komórkowych ustalonych oraz w hodowlach komórek pierwotnych. Istnieje powiązanie między genomiką - mutacja IDH1 - a metabolomiką - Glu oraz 2-HG - co jest szczególnie istotne w trakcie optymalizacji protokołu chemioterapii czy oceną skuteczności nowych kandydatów na leki na etapie badań przed modelami zwierzęcymi. Porównując linię ustaloną T98G z pierwotnymi hodowlami komórek macierzystych GBM, zaobserwowano różnice w profilu metabolomicznym NAA, którego nie udało się zidentyfikować w linii ustalonej. Sugeruje to wyższość IVIVE linii komórkowej pierwotnej nad linią ustaloną. Profilowanie wymienionych onkometabolitów może być wskaźnikiem skuteczności działania chemioterapeutyków *in vitro*. Po podaniu temozolomidu, w hodowlach pierwotnych opornych komórek zaobserwowano niższe stężenie Glu w porównaniu do wrażliwych na ten chemioterapeutyk. Obniżone poziomy Glu były



obserwowane w przypadku traktowania komórek glejaka everolimusem, co jest powiązane z obniżeniem aktywności glutaminazy. W innym badaniu, stosowany inhibitor glutaminazy również spowodował zmniejszenie ilości Glu w badanym modelu *in vitro*. Jedyne związki, którego nie udało się znaleźć w modelach *in vitro*, a jest znanym onkometabolitem *in vivo*, jest  $\alpha$ -KG.

Bycie wykonawcą w grantach HARMONIA 7 było jedną z inspiracji rozwijania metodologii badań metabolomicznych w hodowlach komórek nowotworowych oraz walidacji tego protokołu modelem takiego samego nowotworu *in vivo*. Ze względów praktycznych wybrałem model mysiego czerniaka B16F10, ponieważ ta linia komórkowa umożliwia prowadzenie zarówno badań *in vitro* oraz wszczepu syngenicznego do myszy szczepu C57BL6 w celu wytworzenia modelu *in vivo* [A-4]. Jest to więc prosty oraz cenny model do badań IVIVE. Wyzwaniem dla obu modeli, *in vitro* oraz *in vivo*, jest niska objętość próbki, tj. około 100  $\mu$ L dla hodowli komórkowej oraz średnica tkanki guza wynosząca około 5 mm w modelu mysim. Dodatkowym założeniem, utrudniającym realizację, ale znacząco zwiększającym jakość otrzymywanych wyników, było konstruowanie profili czasowych zmian metabolomicznych zachodzących w trakcie rozwoju guza *in vivo* lub proliferacji komórek w modelu *in vitro*. Oznaczanie zmian zachodzących w czasie jest istotnym elementem poznawania patologii badanej jednostki chorobowej niezależnie od wybranej choroby i jej modelu. Jest to związane z faktem, że podobnie jak w rzeczywistości zmiany patologiczne, a w szczególności towarzyszące nowotworzeniu, są zazwyczaj procesem długoterminowym. Co więcej, takie podejście potencjalnie umożliwia rozpoznanie markera na wczesnym etapie rozwoju jednostki chorobowej. W modelu *in vitro*, aby zwiększyć moc statystyczną i przepustowość oznaczeń wybrałem płytki 96-dołkowe jako naczynia hodowlane. Z kolei, żeby zwiększyć poziom IVIVE, oprócz klasycznej hodowli tzw. monolayer (2D) wybrałem model hodowli przestrzennej (3D) w postaci sferoidów. Taka hodowla 3D jest coraz częściej stosowanym modelem dla badań w tematyce onkologicznej, gdyż w największym stopniu odzwierciedla wzrost guza *in vivo* niezależnie od wybranego rodzaju nowotworu. W warunkach *in vivo* tkanka guza jest niejednolita, gdyż komórki o charakterze nowotworowym współistnieją z komórkami prawidłowymi. Dodatkowo podczas procesu nowotworzenia dochodzi do neoangiogenezy, a w centrum guza dochodzi do wygenerowania stanu hipoksji. Dlatego w hodowlach *in vitro* linii ustalonych lub hodowli pierwotnych należy tak dobrać model hodowli, aby odtworzyć opisane warunki. Najczęściej, aby osiągnąć zadowalające odwzorowanie w/w elementów, dla modeli nowotworowych, wykorzystuje się hodowle 3D w postaci sferoidów. Najbardziej wymagającym elementem

prac ekstrapolacyjnych są oczywiście oznaczenia *in vivo*, które zgodnie z zasadą 3Rs: Replacement (zastąpienie), Reduction (ograniczenie) and Refinement (doskonalenie) oraz w trosce o zmniejszenie różnic międzyosobniczych chciałem wykonać na jak najmniejszej liczbie osobników. Dlatego istotnym jest dobranie takiej metody preparatyki próbki, która umożliwi wielokrotne prowadzenie ekstrakcji z tego samego osobnika *in vivo* z jak najmniejszą inwazyjnością, cierpieniem oraz dystresem. Jednocześnie metodologia powinna być komplementarna z najbardziej rozpowszechnionym oraz zaawansowanym instrumentem analitycznym stosowanym do analiz metabolomicznych czyli wysokosprawną chromatografią cieczową sprzężoną z wysoko rozdzielczym spektrometrem mas (ang. High Performance Liquid Chromatography- High Resolution Mass Spectrometry, HPLC-HRMS). W moim badaniu dodatkowym kryterium była możliwość wykorzystania tej samej metodyki w hodowlach *in vitro* w systemie wysokoprzepustowym opartym o płytki wielodołkowe, elastycznością aplikacyjną oraz prostotą protokołu.

Najczęściej protokół metabolomiki tkanek zaczyna się od igłowego lub przezskórnego pobrania bioptatu tkanki. Taki pobór jest wysoce niekomfortowy dla pacjentów bądź zwierząt laboratoryjnych. W przypadku badań na gryzoniach laboratoryjnych jest niemożliwy do wielokrotnej aplikacji w trakcie rozwoju guza, który osiąga niewielkie rozmiary w początkowych fazach eksperymentu. W badaniach nowotworowych dodatkowym minusem takiego poboru jest kontaminacja materiału innymi tkankami niż tkanka guza, np. tkanką łączną i tłuszczową oraz krwią. Kolejnym istotnym elementem jest konieczność szybkiego zamrożenia tkanki tak aby uchronić związki o bardzo szybkim rozkładzie enzymatycznym jak ATP, glutation czy NADPH. Następnie tkankę należy przeprowadzić w postać półpłynną a następnie, wykonywana jest ekstrakcja. Najczęściej stosowana jest ekstrakcja z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych, a cały protokół można opisać akronimem ekstrakcja ciało stałe-ciecz (ang. solid-liquid extraction, SLE) Jak widać w powyższym opisie metodologia jest wieloetapowa, a na każdym z etapów można dojść do wygenerowania błędu. Dodatkowo protokół wymusza wycięcie tkanki, a więc jest to badanie *ex vivo*, a nie *in vivo* oraz jej homogenizację, oba te procesy mają przełożenie na profil ekstrahowanych związków. Stosowana preparatyka próbek, ekstrakcja ciecz-ciecz jest możliwa do wykonania w hodowlach *in vitro*, ale przy konstruowaniu profilu czasowego, wymaga dużej ilości próbek, gdyż w każdym analizowanym punkcie czasowym trzeba pobrać reprezentatywną ilość materiału do analizy. Wykorzystanie nowoczesnych spektrometrów mas umożliwia analizę tkanek poddanych SLE w z wysoką przepustowością wykorzystując direct infusion-MS (DI-MS) lub Flow Injection Analysis-MS (FIA-MS). Należy podkreślić, że w tym przypadku

termin odnosi się do szybkiej analizy instrumentalnej, a nie szybkiej analizy tkanek. Jednym z minusów takich analiz jest wysoki efekt przenoszenia matrycy. Do bezpośredniej analizy tkanek można wykorzystywać również techniki bezpośredniego wprowadzania jonów do spektrometru mas. Wśród nich najbardziej popularne są Desorption Electrospray Ionization (DESI) oraz Matrix Assisted Laser Desorption (MALDI). Obie techniki umożliwiają bezpośrednią analizę próbek stałych, w tym tkanek w postaci natywnej. Jednakże w przypadku obu metod nie ma możliwości następczego rozdzielania wygenerowanych jonów, np. chromatografią cieczową, dlatego wszystkie jony docierają do detektora jednocześnie powodując spadek możliwości rozdzielczych instrumentu analitycznego. Dodatkowo w takim układzie nie ma możliwości rozróżnienia izomerów, a rozróżnienie izobarów może być problematyczne. DI-MS, FIA-MS, DESI oraz MALDI również były stosowane z sukcesem w hodowlach komórkowych, gdzie zalety oraz wady metod są takie same jak opisano wyżej dla badań tkanek.

Jako biotechnolog medyczny oraz farmaceuta w trakcie pracy zawodowej staram się połączyć zaawansowane modele komórkowe z nowoczesną chemią analityczną w celu jak najdokładniejszego poznania testowanego modelu. W ramach rozwoju zawodowego, jeszcze na etapie doktoratu, odbyłem dwa krótkoterminowe staże w renomowanych ośrodkach zajmujących się chemią analityczną, a w szczególności nowatorskimi metodami mikroekstrakcyjnymi. W 2016 roku odbyłem staż w Oslo w Norwegii, gdzie przeszedłem szkolenie z podstaw tzw. electromembrane extraction (EME) przez jednego z wynalazców tej techniki, Pana Profesora Stiga Pedersen'a-Bjergaard'a. W tym samym ośrodku zdobyłem też wiedzę dotyczącą mikroekstrakcji do fazy ciekłej (ang. liquid-phase microextraction, LPME). W 2017 roku byłem na stażu w Waterloo w Kanadzie, gdzie jako wykonawca wcześniej opisanego grantu odbyłem staż w ramach współpracy międzynarodowej. Na Uniwersytecie w Waterloo ugruntowałem swoją wiedzę w zakresie nowatorskiej metody mikroekstrakcyjnej – mikroekstrakcji do fazy stałej (ang. solid-phase microextraction, SPME) od wynalazcy tej techniki Pana Profesora Janusza Pawliszyna. Do tej jednostki naukowej trafiłem ponownie, już po obronie rozprawy doktorskiej, na roczne zatrudnienie na stanowisku „postdoctoral fellow” gdzie zaangażowany byłem w rozwój SPME w aplikacjach medycznych oraz współpracę z firmą Shimadzu Corporation – producentem spektrometrów mas. Dzięki odbytym stażom, zdobytej wiedzy oraz umiejętnościom, zdecydowałem się na wykorzystanie SPME w postaci cienkich włókien do badań aplikacyjnych próbek o limitowanej ilości bądź dostępności. O tym wyborze zdecydowały liczne właściwości SPME, dzięki którym ta relatywnie nowa technika preparatyki próbek jest idealnym narzędziem analitycznym do

skutecznej realizacji zadania, które sam sobie postawiłem. Z biologicznego punktu widzenia, ta technika analityczna umożliwia prowadzenie bezpośredniej ekstrakcji z tkanki w postaci natywnej (*in vivo* lub *ex vivo*). Ze względu na wymiary włókna SPME - średnica około 250  $\mu\text{m}$  - protokół ekstrakcji *in vivo* nie powoduje znacznego uszkodzenia tkanek, a sama procedura ekstrakcji w ogóle nie wymaga poboru materiału do badań. Poliakrylonitryl (PAN) stosowany jako klej do wytwarzania sond SPME jest materiałem w pełni kompatybilnym z tkankami, w aplikacjach medycznych jest on wykorzystywany w dializach oraz ultrafiltracjach. Dzięki powyższym cechom ten sam osobnik może być poddawany protokołowi SPME wielokrotnie. Z punktu widzenia chemii analitycznej, SPME wytworzone w oparciu o PAN są kompatybilne z odczynnikami organicznymi stosowanymi w LC-MS, dzięki czemu jest możliwość bezpośredniego nastrzykiwania ekstraktów SPME na instrument analityczny. Platforma LC-MS jest obecnie złotym standardem w badaniach metabolomicznych. Ponadto, SPME wielokrotnie oraz w różnych formatach było stosowane w bezpośrednim połączeniu ze spektrometrami mas. Oprócz wcześniej opisanych technik SPME-DESI oraz SPME-MALDI, jest wiele innych możliwości połączeń SPME-MS: Coated Blade Spray-MS (CBS-MS), SPME-nanoESI, SPME-Direct Analysis in Real Time (SPME-DART), SPME-Microfluidic Open Interface (SPME-MOI), SPME-Probe Electrospray Ionization (SPME-PESI). Wszystkie wyżej wymienione techniki są kompatybilne ze spektrometrami mas standardowo stosowanymi w połączeniu z LC. Metody bezpośredniego wprowadzania próbek, oparte o SPME, do spektrometrów kompatybilnych z GC zostały pominięte. Przechodząc do oznaczeń *in vitro*, dokładnie takie same włókna SPME można wykorzystać do analizy hodowli komórkowych, powoduje to zwiększenie wartości ekstrapolacyjnej modelu *in vitro*. Podobnie jak w przypadku analizy tkanek, w przypadku badań metabolomicznych hodowli komórkowych tą metodą nie dochodzi do fizycznego poboru próbki, a prócz tego możliwe jest prowadzenie SPME bezpośrednio z płytek wielodołowych w systemie wysoko przepustowym (ang. high throughput screening, HTS). Sam protokół SPME jest tak bardzo nieinwazyjny dla komórek, że możliwe jest stosowanie go w hodowlach komórkowych w postaci sferoidów, które są bardzo wrażliwe na wszelkie manipulacje.

Podsumowując, analizując dostępną literaturę, uznałem, że właśnie SPME jest najlepszą techniką analityczną, która umożliwi badanie próbek o limitowanej dostępności w sposób generujący bardzo dużą ilość informacji.

Zasada ekstrakcji w metodologii SPME opiera się na wytworzeniu stanu równowagi

między stężeniem badanych związków w próbce a warstwą ekstrakcyjną. Wykorzystany do wiązania cząsteczek sorbentu PAN jest substancją porowatą, a rozmiary tych porów uniemożliwiają transport cząsteczek większych od 1500 Da, dlatego gdy urządzenie do pobierania próbek – włókno lub cienka blaszka, zostanie zanurzone w materiale zawierającym makrocząsteczki takie jak białka (np. enzymy), związki te nie są w stanie przeniknąć do fazy ekstrakcyjnej. W związku z tym wygaszanie metabolizmu następuje równocześnie z ekstrakcją związku dlatego można z powodzeniem ekstrahować małe cząsteczki o krótkim okresie półtrwania, związanym z ich enzymatyczną degradacją. To wygaszanie metabolizmu jest kluczowym elementem badań metabolomicznych, który w klasycznym protokole SLE dla tkanek lub LLE dla hodowli komórkowych osiągnąć jest poprzez umieszczenie badanego materiału w zamrażarce  $-80^{\circ}\text{C}$  lub w ciekłym azocie. Co jest oczywiste, tkankę przed mrożeniem należy wyciąć, a w czasie między wycięciem a mrożeniem wpływa na profil związków drobnocząsteczkowych, jednocześnie jeżeli czas ten nie jest dostarczony kontrolowany może dojść do dużych błędów obniżających moc statystyczną generowanych wyników. Jak wspomniano wcześniej, SPME jest techniką przygotowania próbek opartą na wytworzeniu stanu równowagi między substancją a sondą SPME, co w połączeniu z niskim współczynnikiem odzysku może prowadzić do ekstrakcji niewyczerpującej złoża. Oznacza to, że spadek zawartości w próbce analizowanych związków jest bardzo niski i pomijalny. Dodatkowo, brak fizycznego poboru próbki umożliwia prowadzenie wielokrotnej ekstrakcji z tej samej próbki, nawet jeżeli jej ilość jest bardzo mała, dlatego często SPME określane jest jako „biopsja chemiczna”. Opisane powyżej właściwości SPME umożliwiają konstruowanie profili czasowych reakcji biochemicznych lub reakcji biotransformacji leków w badanych matrycach bez konieczności powielania próbek. To z kolei prowadzi do minimalizacji zmienności próbek biologicznych, co jest w szczególności istotne dla badań z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych, które mogą być prowadzone zgodnie z zasadą 3R (zastąpienie, ograniczenie, doskonalenie), bądź hodowli pierwotnych i minimalizacji zmienności fenotypowej związanej z prowadzeniem hodowli *in vitro*.

Dobre narzędzie analityczne wykorzystywane w badaniach metabolomicznych powinno charakteryzować się zdolnością do ekstrakcji związków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, zarówno o niskiej jak i wysokiej polarności. SPME spełnia ten warunek, gdyż w równomiernym stopniu ekstrahuje związki polarne oraz niepolarne. Fenomen ten (ang. *balanced coverage*) jest związany z różnicą powinowactwa związków do fazy ekstrakcyjnej w zależności od ich właściwości fizykochemicznych oraz faktem, że SPME ekstrahuje tylko poprzez wolną (niezwiązaną z matrycą) frakcję danej

cząsteczki. Związki polarne, np. aminokwasy, charakteryzują się niskim powinowactwem do fazy ekstrakcyjnej, natomiast stężenie ich wolnej frakcji w matrycach biologicznych jest wysokie. Związki niepolarne, np. lipidy, mają wysokie powinowactwo do fazy sorpcyjnej, ale ich stężenie niezwiązane z składnikami matrycy jest niskie. Ostatecznie, oba rodzaje związków są odzyskiwane z próbki w podobnej ilości, co przekłada się na szeroki panel badanych związków.

Kolejnym istotnym aspektem badań metabolomiki tkanek jest stabilność badanych analitów związana ze stanem tkanki. W standardowym protokole badań metabolomicznych tkanek konieczna jest ich izolacja, hamowanie metabolizmu oraz homogenizacja celem przeprowadzenia ekstrakcji niskocząsteczkowych związków. Oba te etapy przygotowywania tkanki powodują zmiany jakościowe oraz ilościowe występujących związków. Wykorzystanie SPME w postaci cienkich włókien, o średnicy około 250  $\mu\text{m}$ , umożliwia prowadzenie biopsji chemicznej na nienaruszonej tkance w warunkach *in vivo* lub *ex vivo*. Brak procesu homogenizacji wydaje się bardziej optymalny, gdyż jako jedyny umożliwia zobrazowanie prawdziwego stanu biochemicznego badanego narządu a tym bardziej konstruowania profilu zmian w czasie. Oczywiście, oprócz SPME istnieją inne techniki poboru próbek umożliwiające badania tkanki natywnej, jednakże SPME charakteryzuje się prostotą procedury, możliwością optymalizacji ekstrakcji względem poszukiwanych związków oraz mnogością połączeń z instrumentami analitycznymi, w tym z LC, GC, czy elektroforezą kapilarną (ang. capillary electrophoresis, CE) połączonych ze spektrometrią mas. Dzięki licznym modyfikacjom źródeł jonów możliwe jest bezpośrednie połączenie sond SPME ze spektrometrem mas umożliwiając szybką, nawet w czasie poniżej jednej minuty, analizę badanych związków.

Jednym z celów rozwoju metod hodowli *in vitro* jest zaprojektowanie takiej platformy badań, aby testy *in vivo* - z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych lub w badaniach klinicznych - nie były już konieczne w procesie opracowywania nowych leków. Takie założenie jest również wymagane przez agencje rządowe, takie jak Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency, EMA), czy Agencja Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA), kontrolujące badania nad kandydatami na leki. W kontekście wykorzystania zwierząt laboratoryjnych kluczowe jest takie planowanie badań aby spełniać regułę 3Rs, która jest wymagana przez Unię Europejską (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych) Rozwój technik *in vitro*, o wysokim poziomie IVIVE, pozytywnie przyczynia się do spełnienia wszystkich wymienionych aspektów tej

reguły. Badania metabolomiczne hodowli komórkowych są coraz istotniejszym elementem zdobywania wiedzy dotyczącej mechanizmów działania czy monitorowania skuteczności terapii leków bądź kandydatów na leki. Niemniej jednak, istotnym elementem stanowiącym czy dany model komórkowy spełnia oczekiwania, jest jego zdolność do IVIVE, dlatego nadal obserwuje się silny rozwój i poszukiwania nowych technik hodowania komórek oraz analizy hodowli komórkowych.

W pracy [A-4], wykorzystałem SPME w celu badania egzometabolomu linii komórkowej mysiego modelu czerniak B16F10 hodowanego *in vitro* w klasycznej hodowli tzw. monolayer (model 2D) oraz w postaci sferoidów (model 3D). Egzometabolom obu hodowli porównałem do modelu *in vivo*, w którym te same komórki wszczepiłem podskórnice myszom szczepu C57BL/6. Najważniejszą przewagą SPME nad innymi metodami ekstrakcyjnymi jest wielofunkcyjność i elastyczność aplikacyjna związana z mnogością form sond SPME - włókna, cienkie blaszki, siatka materiałowa, plastik - umożliwiające dopasowanie do badanej aplikacji. Dodatkowo właściwości ekstrakcyjne mogą łatwo kontrolowane i modyfikowane podczas procesu wytwarzania sond analitycznych. Ilość ekstrahowanych związków, a co za tym idzie pewność że ekstrakcja nie będzie powodowała zubożenia próbki, jest kontrolowana poprzez długość oraz grubość pokrycia sorbentem. Selektywność względem analitów jest związana z wyborem chemii sorbentu. W pracy zdecydowałem się na sorbent HLB (ang. hydrophilic-lipophilic balance), którym pokryłem drut z stopu niklu i tytanu na długość 2 mm – wykonałem dwie warstwy takiego pokrycia. Wybór sorbentu związany był z poprzednimi badaniami, gdzie wykazano bardzo szeroki zakres ekstrahowanych związków przez HLB, co przekłada się na bardzo dobry tzw. metabolome coverage, czyli możliwość ekstrakcji związków z wielu różnych grup chemicznych o zróżnicowanej polarności: aminy biogenne, aminokwasy, kwasy organiczne, lipidy etc. Krótkie oraz cienkie pokrycie gwarantuje brak zubożenia próbki w przypadku ekstrakcji w płytkach 96-dołkowych przystosowanych do hodowli komórkowych *in vitro* – czyli 100µl. Właściwości SPME umożliwiły mi prowadzenie wielokrotnej ekstrakcji z tych samych dołków (próbek). Dla hodowli 2D oznaczenia wykonywałem trzykrotnie, w odstępach 24 godzinnych, natomiast dla hodowli 3D dwukrotnie po 5 i 8 dniach od zainicjowania hodowli. Różnica wynika z tempa wzrostu danej hodowli. W opisanych punktach czasowych prowadziłem SPME poprzez zanurzenie włókien w medium hodowlanym. W tym celu zmodyfikowałem system służący do odparowywania próbek z 96-dołkowych płytek, co umożliwiło mi przeprowadzenie ekstrakcji SPME w systemie HTS. Dzięki temu, że protokół jest niskoinwazyjny oraz nie wymaga poboru materiału do badań,

nawet delikatne sferoidy nie uległy dezintegracji podczas obu prowadzonych ekstrakcji.

Przeszukując bazy danych Scopus oraz Google Scholar do dnia dzisiejszego (29.09.2023, słowa kluczowe: B16F10 metabolomics) nie znaleziono artykułu naukowego jednocześnie spełniającego warunki wykorzystane w niniejszej pracy: tj. wielokrotna ekstrakcja z dokładnie tych samych próbek prowadzona w systemie wysokoprzepustowym z późniejszą analizą LC-HRMS. Oczywiście w literaturze opisane są metody badań HTS hodowli komórkowych, ale wtedy analiza prowadzona jest tylko w jednym punkcie czasowym, lub analiza biochemiczna prowadzona w czasie, ale wtedy analizowane są pojedyncze próbki bez systemu HTS.

Kolejnym, niezmiernie istotnym elementem tego projektu, było wykorzystanie dokładnie takiej samej platformy analitycznej (SPME-LC-HRMS) w analizie modelu *in vivo*. Jest to bardzo istotne z punktu widzenia metabolomiki, ponieważ sam pobór materiału tkankowego do badań powoduje zmiany w metabolomie. Dodatkowo, jeśli planowana jest analiza LC-MS konieczna jest homogenizacja tkanki, a dopiero potem ekstrakcja wybraną metodą. Homogenizacja tkanek, również jest czynnikiem wpływającym na obecność związków, szczególnie te związane z niszczeniem błon komórkowych, ale także związki endogenne, które niejako „wylewają” się na zewnątrz stając się dostępne do analizy. Z drugiej strony, związki niestabilne mogą ulec enzymatycznej degradacji podczas procesu homogenizacji.

Wykorzystanie przeze mnie SPME w pracy [A-4] było również unikatowym podejściem, gdyż ten sam osobnik był analizowany aż trzykrotnie: 1) przed wszczepieniem guza, 2) 10 dnia po wszczepie oraz 3) 14 dni po wszczepie. Jest to istotne z punktu widzenia różnorodności międzyosobniczej, która występuje nawet w szczepach wsobnych zwierząt (model C57BL6), a tym bardziej w szczepach niekrewniaczych (np. myszy CD1), czy wszczepach komórek ludzki do zwierząt laboratoryjnych o obniżonej odporności. Naturalna różnica między osobnikami może być potencjalnie znormalizowana i zniwelowana poprzez prowadzenie analizy linii bazowej oraz w wybranym punkcie czasowym (lub punktach) badania, np. przed oraz po wszczepie czy w badaniach farmakometabolomicznych na modelu tkankowym przed, w trakcie oraz po zakończeniu terapii.

Niezmiernie istotnym elementem wykorzystania SPME w badaniach na modelu zwierzęcym jest bardzo niska inwazyjność protokołu ekstrakcyjnego. Średnica włókna SPME jest na tyle mała (około 250  $\mu\text{m}$ ), że włókna te bez problemu mieszczą się w igle do iniekcji przezskórnych, która służy do wprowadzania włókna SPME bezpośrednio w tkankę guza. W związku z tym każda wykonana biopsja chemiczna nie wymagała ode mnie w ogóle



fizycznego poboru materiału do badań, a tym bardziej nie wymaga poświęcenia osobnika przed wykonaniem procedury ekstrakcyjnej. Biopsja pozostawia tylko niewielkie nakłucie na skórze, które bardzo szybko ulega zagojeniu. Dzięki temu nowatorskiemu podejściu SPME jest bardzo cennym narzędziem pozytywnie spełniającym zasadę 3Rs. W szczególności dotyczy to zasady ograniczenia - w badaniu wykorzystano tylko 2 osobniki podczas gdy analogiczne podejście przy wykorzystaniu tradycyjnych metod wymagałoby wykorzystania 6-ciu osobników. W moim badaniu zasada doskonalenia również była spełniona, gdyż pobór próbek polegał tylko na nakłuciu pachwiny igłą oraz odczekaniu 15-stu minut a podczas całego protokołu badane osobniki całą procedurę były pod narkozą izofluranem.

W badaniu, w hodowlach 2D, 3D oraz w modelu *in vivo* zaobserwowano odpowiednio 810, 680 oraz 785 związków. Hodowle 3D mają o wiele bardziej zwartą strukturę przez co wymiana ze środowiskiem zewnętrznym jest ograniczona. Dlatego sugeruje się, że większa ilość związków w hodowlach 2D w porównaniu do hodowli sferoidów wynika prawdopodobnie z wyższego tempa wzrostu, szybszego metabolizmu a przede wszystkim zwiększonej sekrecji związków do medium hodowlanego. Prawdopodobnie dlatego w naszej analizie badania egzometabolomu wykazały, że model 2D jest lepszą platformą pod względem IVIVE od modelu 3D. Dlatego w kolejnych badaniach będziemy skupiać się na metodach niszczenia komórek oraz sferoidów w celu porównania endometabolomu z modelem zwierzęcym.

Z punktu widzenia biologicznego w badanym eksperymencie byłem w stanie zaobserwować 42 biologicznie istotne związki, z czego 21 które w literaturze wielokrotnie były łączone z modelem czerniaka, zarówno ludzkim jak i zwierzęcym. Wśród 14 prac (dostępnych w bazach Scopus, Google Scholar i PubMed w czasie pisania manuskryptu) innych autorów skupiających się na czerniaku tylko jedna wykorzystywała model *in vivo* komórek B16F10, ale jako matrycę do badań wybrano surowicę. W innych modelach czerniaka tylko w 3 z tych prac analizowano tkanki: wątroby, śledziony oraz żołądka. Żadna z prac nie skupiła się na analizie tkanki nowotworowej. Ten krótki przegląd literatury pokazuje brak kompleksowego podejścia - brak walidacji metod *in vitro* modelem *in vivo* - w celu odkrycia oraz zwalidowania biomarkera czerniaka.

Moja praca pokazała możliwość wykorzystania dokładnie tego samego narzędzia analitycznego do hodowli *in vivo* oraz do modelu *in vivo*. Jest to unikatowe podejście dzięki któremu występuje pewność, że różnica w wynikach między próbkami *in vitro* a *in vivo* związana jest z wybranym modelem, a nie jest wypadkową wybranego modelu oraz manipulacji nad tkanką jeszcze przed samą ekstrakcją. W kolejnych badaniach można będzie

tak optymalizować hodowle *in vitro* aby metabolom był jak najbliższy modelom *in vivo*.

Kontynuując badania w tematyce IVIVE, obecnie jestem wykonawcą bilateralnego grantu realizowanego we współpracy z Uniwersytetem Środkowo-Wschodnim w Ankarze, w Turcji gdzie odpowiadam za: aplikacje SPME w hodowlach komórkowych (2D oraz 3D), bezpośrednią analizę metodą tychże modeli przez CBS oraz współprowadzenie badań na modelu zwierzęcym. Badania wstępne prowadzone przez magistranta, którego byłem promotorem, wykazały brak wpływu SPME na tempo wzrost linii komórkowych mysiego czerniaka oraz mysiego nowotworu płuc. Wyniki tej pracy zostały opublikowane na międzynarodowej konferencji Eurobiotech, która miała miejsce w 2022 roku w Lublaniu w Słowenii.

Ważnym aspektem współczesnej metabolomiki jest próba normalizacji otrzymywanych wyników, która w przypadku użycia spektrometrii mas w analizie instrumentalnej, opiera się o wykorzystanie związków znakowanych izotopowo. Takie podejście zmniejsza błąd eksperymentalny redukując szansę na wystąpienie wyników fałszywie dodatnich lub ujemnych. Dodatkowo, wykorzystanie normalizacji umożliwia korekcję dużych kohort badawczych, których analiza instrumentalna jest długotrwała i/lub czasami wielośrodkowa. Najczęściej komercyjnie dostępne zestawy do analiz metabolomicznych zawierają krzywą kalibracyjną, gdzie stężenia związków są dopasowane do poziomów oczekiwanych w organizmach żywych. Podejście ilościowe powoduje zwiększenie jakości otrzymywanych wyników oraz wyciąganych wniosków. Wykorzystanie profilowania metabolomicznego gwarantuje pewność przypisania konkretnej wartości m/z do danego związku. W podejściu niecelowanym identyfikacja struktury na podstawie wartości m/z (ang. annotation) związków jest identyfikowana jako wąskie gardło procesu opisywania badanego układu. Nadal w podejściu niecelowanym prawidłowe przypisywanie do zaobserwowanej wartości m/z struktury chemicznej, a co za tym idzie nazwy związku oraz w dalszej kolejności szlaku metabolicznego, jest najczęstszym źródłem niepowodzeń. Dlatego coraz większą popularność zyskuje podejście profilowania metabolomicznego, gdzie jednocześnie monitoruje się kilkadziesiąt do kilkuset związków. Takie podejście, mimo że zawęża ilość wykrywanych związków, prowadzi do wygenerowania danych o bardzo wysokiej jakości. Dodatkowo, znając wcześniej związki które będą poddawane detekcji przez spektrometr mas istnieje możliwość wykorzystania izotopowo znakowanych analogów związków oraz prowadzenia pełnej analizy ilościowej. Te dwa elementy są niezwykle istotne w przypadku bardzo długich sekwencji analizowania próbek na instrumencie analitycznym, co bardzo często ma miejsce w projektach biologicznych i medycznych. Podczas takiej

sekwencji może dojść do stopniowego zanieczyszczenia platformy analitycznej, co powoduje zmianę czułości i negatywnie wpływa na jakość wyników. Jeszcze większym wyzwaniem jest analiza wielośrodkowa, która ma miejsce w przypadku badań klinicznych. Oba te wyzwania są niwelowane przez wcześniej opisane metody umożliwiające w pełni ilościową analizę.

Istnieje wiele komercyjnie dostępnych zestawów umożliwiających profilowanie metabolomiczne próbek pochodzenia biologicznego. Jednak metody te skupiają się na analizie próbek w postaci płynów: krew, surowica, mocz itd. W przypadku konieczności badań metabolomicznych tkanek, stałą próbkę biologiczną należy poddać homogenizacji, a dopiero potem można prowadzić ekstrakcję oraz analizą instrumentalną. Oczywiście przeprowadzenie tkanki w postać płynną powoduje nieodwracalne zmiany w metabolomie. Wielokrotnie udowodniono skuteczne wykorzystanie SPME w badaniach metabolomicznych tkanek, jednakże badania te opierały się o porównywanie poziomów związków między badanymi grupami, np. tkanki pochodzące od pacjentów zdrowych i pacjentów chorych, tkanki guza o różnym stopniu złośliwości, różnicowanie *in vivo* kory białej od szarej. Jak pokazują powyższe przykłady badania metabolomiczne tkanek z użyciem SPME mogą być prowadzone *ex vivo* na tkankach natywnych (nie poddanych homogenizacji), a nawet *in vivo* w organizmie żywym. Badania stężeń leków z wykorzystaniem SPME wykazały możliwość kalibracji, a co za tym idzie pełnego oznaczania ilościowego wybranych analitów w tkance. Takie podejście było możliwe dzięki wykorzystaniu standardów izotopowych, które przed ekstrakcją tkanki zostały zaadsorbowane na włóknie SPME. W trakcie ekstrakcji związki te ulegają niejako desorpcji do tkanki, podczas gdy badany związek ulega ekstrakcji. Dzięki oznaczeniu jak bardzo spadła ilość standardu można precyzyjnie określić stężenie leku w tkance.

W ramach zatrudnienia na stanowisku postdoctoral fellow podczas pobytu na Uniwersytecie w Waterloo moim głównym zadaniem było zwiększenie jakości otrzymywanych informacji w biomedycznych aplikacjach SPME. Analizując dostępną literaturę, doszedłem do wniosku, że jednym z najbardziej rozpowszechnionych zestawów do celowanego profilowania metabolomicznego, który jednocześnie umożliwia ilościowe oznaczenia są zestawy firmy Biocrates Life Sciences AG (Innsbruck, Austria). Praca [A-1] jest pierwszą próbą połączenia właściwości ilościowej analizy profilu metabolomicznego komercyjnie dostępnego zestawu z możliwością prowadzenia ekstrakcji z tkanki natywnej dzięki SPME. Dodatkowym celem badania było pokazanie różnicy w metabolomie tkanki natywnej oraz tkanki która została poddana homogenizacji. Aby mieć pewność, że różnica

między metabolomem tkanki natywnej i homogenatu wynika z postaci próbki, do obu celów badania wykorzystaliśmy ten sam fragment tkanki, czyli najpierw przeprowadziliśmy ekstrakcję SPME tkanki natywnej a potem ten sam fragment poddaliśmy homogenizacji i podzieliliśmy na porcje wykorzystywane w głównym protokole badania.

Aby osiągnąć podstawowy cel homogenat został podzielony, jedna część została nastrzyknięta na 96-dołkową płytkę zestawu komercyjnego, w objętości 10 $\mu$ l, natomiast w drugiej części umieściliśmy włókna SPME. Następnie wyekstrahowane związki drobnocząsteczkowe zdesorbowaliśmy z włókna mieszaniną acetonitrylu i wody (4:1, v/v, objętość 80 $\mu$ l). Następnie 40 $\mu$ l uzyskanej próbki podaliśmy na płytkę zestawu komercyjnego. W kolejnym etapie prowadziliśmy wszystkie procedury zgodnie z zaleceniami producenta. Aby zrealizować drugi cel projektu włókna SPME umieściliśmy w tkance natywnej, kolejny etapy wykonywaliśmy tak samo jak opisano wyżej. Pozostałą ilość materiału, w opisywanym przypadku 40 $\mu$ l, można analizować z wykorzystaniem niecelowanego podejścia opartego o LC-HRMS.

Analiza pierwszych składowych wykazała, że wszystkie trzy rodzaje próbek: bezpośrednio SPME z tkanki (SPME-tkanka), SPME z tkanki poddanej homogenizacji (SPME-homogenat) oraz ekstrakcja homogenatu metodą ciało stałe-ciecz (SLE-homogenat) wyraźnie różnicują się między sobą. Świadczy to zarówno o zmianach ilościowo/jakościowych między tkanką natywną a homogenatem (SPME-tkanka vs SPME-homogenat), jak również między wykorzystanymi metodami (SPME-homogenat vs SLE-homogenat). Ze względu na fenomen ekstrakcji równowagowej SPME, wyekstrahowana ilość związku jest niewielka w porównaniu z metodą wyczerpującą złożę (ang. exhaustive extraction) opartą o zestaw komercyjny. Jednocześnie, ze względu na brak ekstrakcji komponentów matrycy wpływających na jonizację spektrometru mas - sole, peptydy, białka - SPME wykazuje bardzo niski sygnał tła oraz niski efekt przenoszenia matrycy. Mimo że wartość bezwzględna wielkości pików chromatograficznych dla danego analitu jest niska, to sygnał tła jest jeszcze niższy, powodując dużą rozpiętość wartości sygnał-szum (ang. signal-to-noise, S/N). W przypadku metod SLE zarówno sygnał związku oraz tła są relatywnie wyższe niż dla metod mikroekstrakcyjnych. W badaniach metabolomicznych za graniczną wartość S/N zwyczajowo przyjmuje się 3, natomiast za graniczną wartość odchylenia standardowego w grupie uznaje się 30%. W naszym badaniu oba te warunki zostały spełnione dla 102 oraz 90 związków odpowiednio dla SLE-homogenat oraz SPME-homogenat. Oczywiście, ze względu na różnice w charakterze ekstrakcji, dla większości związków wyższa ilość została wyekstrahowana metodą SLE, jednak dla 8 związków wartości

bezwzględne były takie same. Z kolei dla 4 związków - serotoniny oraz trzech acetylokarnityn - tylko SPME spełniło wymagane parametry jakościowe. Powyższa analiza obrazuje brak znaczącej różnicy w tzw. metabolome coverage między metodami SLE i SPME czyli obie techniki można stosować jako równocenne, ale tylko w przypadku SPME możliwe jest prowadzenie badań na tkance natywnej.

W drugiej części tego projektu skupiliśmy się na pokazaniu różnic między tkanką natywną a homogenatem. Z oczywistych względów w tej części nie było możliwości bezpośredniego nastrzyku tkanki na płytkę zestawu komercyjnego, dlatego analizowaliśmy wyłącznie ekstrakcje SPME. Zgodnie z oczekiwaniami zaobserwowano istotne różnice, które związane są głównie z rozpadem błon biologicznych oraz uwolnieniem związków zakotwiczonych w tych błonach oraz związków obecnych wewnątrzkomórkowo. Wśród różnic wykazano wyższe ilości 30 związków z różnych grup biologicznych, głównie lipidów i ich pochodnych: fosfatydylocholin, czy sfingomielin oraz innych związków drobnocząsteczkowych, takich jak metionina, serotonina. Jednocześnie, prawdopodobnie ze względu na niską stabilność, w trakcie homogenizacji utracono 17 związków z grup: lysofosfatydylocholin, fosfatydylocholin, acetylokarnityn, sfingomielin oraz tryptofan.

Powyższy projekt w bardzo prosty sposób pokazuje, że można połączyć unikatowe cechy SPME, czyli analizę tkanki natywnej *ex vivo* oraz potencjalnie analizy *in vivo* organizmów żywych z komercyjnie dostępnymi zestawami służącymi do profilowania metabolomicznego. Głównym minusem SPME w powyższym badaniu jest zdecydowanie niższy odzysk w porównaniu do metody wyczerpującej złoża. Jednak istnieje szereg rozwiązań umożliwiających skuteczne rozwiązanie tego problemu: 1) istnieje możliwość podania większej ilości próbki SPME na płytkę zestawu komercyjnego, 2) próbkę SPME można zatężyć poprzez odparowanie i zawieszenie w mniejszej ilości rozpuszczalnika przed podaniem na płytkę zestawu komercyjnego, 3) można desorbować więcej niż jedno włókno SPME do tej samej próbki. Ostatnie podejście było wykorzystywane w literaturze w analizie celowanej gdzie wykazano liniową zależność między stężeniem analizowanych próbek a ilością włókien wykorzystanych do desorpcji. W niecelowanym podejściu metabolomicznym, tkanek *in vivo* również wykorzystano więcej niż jedno włókno celem zwiększenia całkowitego odzysku związków drobnocząsteczkowych w protokole. Dodatkowo, wybierając narzędzia SPME o różnych fazach ekstrakcyjnych można niejako rozszerzać profil ekstrahowanych związków znacznie zwiększając tzw. metabolome coverage. Oprócz możliwości analiz *in vivo*, kolejną niewątpliwą zaletą SPME jest możliwość analizy przestrzennej tkanki (ang. spatial resolution), ponieważ włókna można umieszczać w różnych

jej częściach, takie badania również zostały prowadzone oraz udowodniono ich sensowność w oznaczaniu obecności leku w trakcie chemioterapii „miejscowej”. Należy również pamiętać o niskiej inwazyjności protokołu SPME, co umożliwia prowadzenie innych oznaczeń z tej samej tkanki, której ilość może być limitowana, np. biopaty tkanek pobranych do badań immunohistochemicznych w celu wykonania diagnostyki nowotworowej. Nawet w tej pilotażowej pracy wykorzystano dokładnie ten sam fragment do analizy tkanki natywnej, a później tkanki pólplynnej.

W celu kontynuacji opracowywania połączenia SPME z metodami profilowania metabolomicznego opartymi o izotopowo znakowane standardy, po powrocie z Kanady, zostałem wykonawcą w bilateralnym grantie finansowanym przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej. W grantie planowane jest połączenie opracowanej w Uniwersytecie Wiedeńskim rozcieńczania izotopowego bazującego na wykorzystaniu mieszaniny znakowanych izotopów. W tej mieszaninie jest ponad 90 izotopowych analogów związków endogennych, a w planowanych eksperymentach chcemy skupić się na analizie hodowli komórkowych przy pomocy SPME-LC-MS oraz SPME-MOI-LC.

W ramach współpracy z sektorem przemysłowym, drugim z moich zadań podczas pobytu w Kanadzie, była współpraca z firmą Shimadzu Corporation (Kyoto, Japonia). Firma jest producentem spektrometrów mas, w której skomercjalizowano PESI-MS. Oprócz zadań związanych z tą współpracą, wykonywanych na polecenie Prof. Pawliszyna, dodatkowo postanowiłem zbadać oraz potwierdzić obserwacje, które zaobserwowałem podczas pracy do mojego doktoratu. Analizując wyniki metabolomiczne próbek hodowli komórkowych, po podaniu proleku fosforanu kombretastatyny A4 (CA4P) do dołek kontrolnych - kompletne medium bez komórek nowotworowych - zarejestrowałem tylko pik chromatograficzny aktywniej formy kombretastatyny A4 (CA4). Dlatego aby potwierdzić tę biotransformację jako matrycę do badań wykorzystałem kompletne medium komórkowe składające się z Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementowanego płodową surowicą bydlęcą (ang. Fetal Bovine Serum, FBS) ogrzane do 37°C. Aktywność biologiczną CA4 wykazuje poprzez blokowanie domeny kolchicynowej w mikrotubulach powodując: 1) hamowanie polimeryzacji tubulin podczas podziałów komórkowych komórek nowotworowych oraz 2) negatywnie wpływając na zbudowany z mikrotubul cytoszkielet komórek śródbłonna naczyń formowanych podczas neoangiogenezy guza. Podwójny mechanizm działania powoduje, że związki z grupy kombretastatyn są interesujące do badań zarówno na modelach komórek nowotworowych *in vitro* oraz organizmach żywych. CA4 bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie, dlatego aby podawać ten związek *in vivo* ludziom lub zwierzętom, należało

zsyntetyzować prolek o zadowalającej rozpuszczalności w wodzie czyli CA4P. W organizmach żywych, konwersja CA4P do CA4 przebiega z udziałem szeroko obecnych w próbkach biologicznych niespecyficznym fosfataz, które szybko hydrolizują wiązanie estrowe. Okres połowicznego półtrwania CA4P, związany również z tą biotransformacją, w badaniach klinicznych oznaczono na 33 minuty.

W trakcie pracy nad wprowadzeniem nowej cząsteczki do obrotu jako lek wykonywanych jest wiele oznaczeń jeszcze na etapie badań przedklinicznych oraz przed modelem zwierzęcym. Jednym z takich badań prowadzonych jest na modelach komórkowych oraz wykorzystując izolowane enzymy jest badanie metabolizmu leków. Proces ten jest, obok wchłaniania, kluczowym parametrem farmakokinetycznym odpowiedzialnym za biodostępność danego związku, a także przyczynia się do eliminacji badanej cząsteczki niezależnie od drogi jej podania. Natomiast w przypadku proleków, konieczna jest ich bioaktywacja aby uzyskać efekt terapeutyczny. Enzymy frakcji mikrosomalnej lub innego rodzaju, nawet kupowane z komercyjnych źródeł, są izolowane od dawców, zwierzęcych bądź ludzkich, w związku z tym należy spodziewać się różnic w wynikach między różnymi seriami produktu. Jedną z opcji rozpoznawania czy reakcja metabolizmu ma miejsce jest charakterystyczny, asymptotyczny spadek ilości związku wyjściowego z jednoczesnym wzrostem ilości jego metabolitów. Aby nie multiplikować badanego materiału można stosować nowe metody preparatyki próbek. W takiej aplikacji SPME również wydaje się być odpowiednim narzędziem analitycznym, którego zalety w analizie celowanej leków są takie same jak wyżej opisałem w ramach oznaczeń metabolomicznych.

W związku z powyższym w ramach pracy [A-2] wybrałem SPME aby zbadać jak szybko zachodzi konwersja CA4P do CA4 w układzie imitującym badania z wykorzystaniem hodowli komórkowych. Oczywiście do tego celu wystarczyłoby użycie metody PPT-LC-MS, jednak takie ograniczenie czyniłoby pracę z punktu widzenia chemii analitycznej, z wielu względów bardzo nieatrakcyjną: brak nowoczesnych metod, brak wykorzystania metod tzw. „zielonej chemii”, ograniczona możliwość bezpośredniej analizy z ominięciem LC, brak oczyszczania ekstraktów ze składników matrycy, przede wszystkim z soli. Dlatego postanowiłem rozszerzyć metodykę o dwie metody bezpośredniego wprowadzania jonów do spektrometru mas.

Ze względu na niską objętość próbki w przypadku ekstrakcji całkowitej, np. metodą LLE, ekstrakcją do fazy stałej (ang. solid phase extraction, SPE) lub innymi technikami analiza instrumentalna może charakteryzować się niską czułością metody. W przypadku gdy objętość próbki jest niska całkowita ilość odzyskanego związku również jest niska.

Dodatkowo związki przed detekcją MS ulegają dalszemu rozcieńczaniu fazami ruchomymi stosowanymi podczas separacji LC. Jedną z możliwości przezwyciężenia tego problemu jest bezpośrednio wprowadzanie analitów do MS. Nowoczesna oraz zaawansowane spektrometry mas ze względu na szybkość oraz wysoką rozdzielczość detekcji jonów umożliwiają skuteczne prowadzenie analiz z ominięciem procesu separacji. Bezpośrednia jonizacja próbki niesie jednak ryzyko zanieczyszczenia instrumentu analitycznego elementami matrycy, które mogą w drastyczny sposób wpływać na jonizację badanych związków i/lub powodować zaburzenie instrumentu generującego spadek czułości. Wykorzystanie metody preparatyki próbek o wysokim stopniu selektywności względem analizowanych związków korzystnie przyczynia się do zwiększenia stopnia oczyszczania próbki. Wybierając odpowiedni format sond SPME, dobierając fazę ekstrakcyjną wobec której analizowane związki wykazują wysokie powinowactwo oraz stosując optymalną dla danej aplikacji technikę bezpośredniej analizy instrumentalnej można osiągnąć wysoki współczynnik wzbogacenia próbki.

W pracy [A-2] wykorzystałem jedną z najbardziej powszechnych technik połączenia SPME czyli Coated Blade Spray (CBS). Podstawą narzędzia CBS jest blaszka ze stali nierdzewnej o ostro zakończonym czubku, która kształtem przypomina miecz. Część blaszki pokryta jest sorbentem ekstrahującym związki organiczne z próbki. W pracy jako fazę ekstrakcyjną wykorzystałem HLB czyli ko-polimer di-winylobenzenu z N-winylopirolidonem), który uprzednio samodzielnie zsyntetyzowałem. Pracę nad aplikacją CBS rozpocząłem od samodzielnego zaprojektowania oraz wydrukowania w technice 3D adaptera umożliwiającego zamontowanie urządzenia CBS w komercyjnie dostępnym źródle PESI-MS (ang. probe electrospray ionization) kompatybilnym z instrumentem DPiMS-8060 firmy Shimadzu. Warto dodać, że jest to pierwsza aplikacja CBS na instrumencie analitycznym tej firmy. Protokół ekstrakcyjny zmodyfikowałem w oparciu o analizę kropli krwi, ponieważ w tej konfiguracji fizyczny pobór materiału do badań jest najmniejszy. W wybranym punkcie czasowym 10 $\mu$ L próbki nakropiłem na sondę CBS, następnie dodałem 2,5 $\mu$ L acetonitrylu w celu zmniejszenia lepkości oraz zmniejszenia stopnia połączenia proleku z białkami. Ekstrakcję prowadziłem przez 5 minut, następnie po opłukaniu CBS wodą zamontowałem urządzenie w adapterze i zwilżyłem 10 $\mu$ L mieszaniny metanol:woda (95:5) z dodatkiem kwasu mrówkowego (0,1%). Po 20 sekundach desorpcji do CBS przyłożono napięcie w celu wygenerowania elektrorozpylenia oraz detekcji jonów.

Do celów optymalizacyjnych wykorzystałem urządzenie CBS (proces ekstrakcji jak wyżej), ale związki wyekstrahowane zdesorbowałem do mieszaniny acetonitryl:woda (4:1) przez dwugodzinne wytrząsanie i następującą analizę systemem LC-MS. Takie podejście



zostało przeze mnie wybrane ze względu na wykorzystanie analogicznego roztworu do prowadzenia oznaczeń metodą precypitacji białek (ang. protein precipitation, PPT), którą w przedstawianym badaniu wykorzystałem jako metodę odniesienia. Wykazałem brak różnic w ilości ekstrahowanych związków: CA4P, CA4 oraz kolchicyny służącej jako standard wewnętrzny między CBS-LC-MS a PPT-LC-MS.

Drugim nowatorskim rozwiązaniem zawartym w tej pracy było wykorzystanie techniki Coated-PESI. W klasycznej wersji PESI próbka jest zaaplikowana w specjalnym adapterze, a cienka igła na kilkadziesiąt milisekund zanurza się w próbce, po czym jest unoszona przed wlot spektrometru mas. W tym położeniu następuje przyłożenie napięcia na kilkadziesiąt-kilkaset milisekund, co generuje elektrorozpylanie jonów do wnętrza spektrometru mas. Sondę Coated-PESI (igła PESI pokryta sorbentem HLB) umieściłem w próbce w celu ekstrakcji badanych związków, a następnie była ona zanurzana w roztworze organicznym służącym jednocześnie jako roztwór desorpcyjny oraz jonizacyjny. Roztwór desorpcyjno/jonizacyjny, 10 $\mu$ L roztworu izopropanol:woda (1:1) z dodatkiem kwasu mrówkowego (0,1%), umieszczony był w tym samym adapterze co próbka w klasycznym protokole PESI-MS. Wykorzystanie sorbentu i ekstrakcji na pokrytą nim igłę PESI powoduje wysokie zwiększenie czułości protokołu analitycznego, jest to związane z faktem, że wyekstrahowana ilość związku jest desorbowana do bardzo niskiej objętości roztworu, tj. około 10pL, dzięki czemu związki są wysoce zateżone. Fenomen ten został nazwany mikrodesorpcją. W przedstawionej pracy umożliwiło mi to obserwowanie biotransformacji proleku CA4P do aktywnej formy CA4 w dwie minuty: 1 minuta ekstrakcji plus 1 minuta desorpcji/jonizacji. Dodatkowym atutem metody Coated-PESI jest całkowity brak poboru próbki do badań, ponieważ urządzenie zanurzałem w bezpośrednio w badanej próbce tylko na czas ekstrakcji. W celu sprawdzenia czy protokół ekstrakcyjny nie powoduje nadmiernej ekstrakcji CA4P i/lub CA4 prowadziłem ekstrakcję sondą Coated-PESI w warunkach jak wyżej, ale następnie urządzenie poddałem desorpcji mieszaniną acetonitryl:woda (4:1) oraz poddałem analizie LC. W tak przygotowanych próbkach w ogóle nie zarejestrowałem pików chromatograficznych badanych związków, mimo że czułość spektrometru mas oscyluje dla tych związków poniżej 1 ppb. Porównanie wyników Coated-PESI-MS 2400z Coated-PESI-LC-MS świadczy to o wysokim współczynniku wzbogacenia analizą Coated-PESI-MS a jednocześnie o tym, że ekstrakcja z wykorzystaniem Coated-PESI prowadzona przez wskazany czas nie powoduje wyczerpywania badanych związków, co jest argumentem świadczącym o tym, że można wielokrotnie prowadzić oznaczania z tej samej próbki biologicznej wielokrotnie.

Obie opisane metody bezpośredniego wprowadzenia próbki do spektrometru mas ze względu na bardzo niskie zużycie odczynników organicznych można zaliczyć do metod tzw. „zielonej chemii”. Troska o środowisko oraz osoby wykonujące oznaczenia jest coraz częściej podnoszonym tematem w chemii analitycznej dlatego obecnie zaleca się i promuje stosowanie technik wpisujących się w zasady zielonej chemii. Dla obu protokołów bezpośredniego wprowadzania jonów metodami SPME zużyłem po około 10 $\mu$ L rozpuszczalników organicznych, natomiast dla metody referencyjnej było to około 80 $\mu$ L plus 2400 $\mu$ L podczas rozdziału chromatograficznego.

W pracy wykazałem, że niezależnie od wybranej metody analitycznej reakcja biotransformacji CA4P do CA4 przebiega przez około 20 minut. Jednocześnie metody oparte o mikroekstrakcje do fazy stałej - Coated-PESI oraz CBS - charakteryzują się znacznie zmniejszonym zużyciem odczynników organicznych oraz skróconym czasem analizy. Wykorzystując Coated-PESI wyniki generowane są w 2 minuty - minuta ekstrakcji i minuta desorpcji/jonizacji, przy użyciu CBS w 7 minut - 5 minut ekstrakcji i 2 minuty desorpcji/jonizacji, a dla metody PPT czas analizy to 5 minutowe wirowanie próbki, następnie przeniesienie supernatantu do próbki do HPLC oraz rozdzielanie chromatograficzne trwające 6 minut, co łącznie wynosi około 11 minut na próbkę. Podobnie jak w przypadku badań SPME na modelach komórkowych w przypadku biotransformacji leków możliwe jest wykonanie protokołów ekstrakcyjnych w systemie HTS. Natomiast analiza instrumentalna CBS-MS jest obecnie możliwa do wykonania w pełni automatycznie znacząco zwiększając przepustowość analiz. W przypadku Coated-PESI póki co należy ręcznie zmieniać próbki z czasem, a czas na zmianę wynosi mniej niż minutę.

### Podsumowanie

Podsumowując, w cyklu prezentowanych prac wykazałem, że mikroekstrakcja do fazy stałej jest bardzo uniwersalnym narzędziem analitycznym, które może być stosowane w wielu aplikacjach biologicznych, a szczególnie gdy analizowanym materiałem jest cenny, limitowany i/lub jest go mało. Przeprowadzony przeze mnie przegląd literatury w tematyce oznaczeń metabolomicznych hodowli komórkowych glejaka wskazał na brak rozpowszechnienia nowych technik ekstrakcyjnych. Zwyczajowo, do analiz wykorzystane są hodowle prowadzone w butlach lub szalkach Petriego, brakuje natomiast wdrażania systemów wysokoprzepustowych, np. płytek wielodołkowych. Dodatkowo, protokoły wymagają dużej ilości materiału do badań oraz są terminalne dla hodowli komórkowych, co uniemożliwia ich

dalsze wykorzystanie w innych analizach [A-3]. Wśród prezentowanych przeze mnie prac najbardziej unikatowa jest analiza metabolomiczna mysiego modelu czerniaka. W tej pracy wykazałem unikalną możliwość wielokrotnego prowadzenia analiz z dokładnie tych samych próbek, których objętość i dostępność jest limitowana, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Jest to szczególnie istotne dla badań na modelu zwierzęcym, ponieważ agencje międzynarodowe wymagają minimalizowania cierpienia oraz ilości wykorzystywanych zwierząt laboratoryjnych. Dzięki bardzo niskiej inwazyjności całego protokołu SPME mogłem przeprowadzić wielokrotne ekstrakcje na tym samym osobniku w modelu *in vivo*. Dodatkowo, zastosowanie identycznego protokołu między platformami *in vivo* oraz *in vitro* zagwarantowało, że różnice w wynikach są związane z różnicami biologicznymi lub modelem, a nie przeprowadzonym przeze mnie protokołem analitycznym [A-4]. Połączenie zestawu komercyjnego, dzięki któremu generowane są wyniki wysokiej jakości, z SPME umożliwia bezpośrednią analizę tkanek w postaci natywnej. Takie podejście jest preferowane bardziej niż przeprowadzanie tkanki w formę półpłynną z wielu względów. Jednym z nich jest zmiana metabolomu następująca w wyniku niszczenia tkanek, zaobserwowana w naszym badaniu oraz potwierdzona dostępną literaturą. Kolejnym istotnym elementem projektu była niska inwazyjność protokołu SPME, w którym w ogóle nie dochodzi do fizycznego poboru tkanki [A-1]. W trakcie projektowania nowych leków, związki badane przechodzą szereg oznaczeń. Część z nich dotyczy ich biotransformacji, która szczególnie ważna jest gdy badana cząsteczka nie wykazuje aktywności biologicznej i podlega aktywacji dopiero w układzie biologicznym. Dzięki zastosowaniu dwóch metod opartych o SPME: Coated-PESI oraz Coated Blade Spray mogłem wykonać swoje analizy w czasie krótszym od techniki referencyjnej PPT-LC-MS. Prowadzenie ekstrakcji zaproponowanymi metodami wpisuje się również w założenia zielonej chemii, czyli trendu promującego zmniejszanie negatywnego wpływu analiz laboratoryjnych na środowisko. Coated-PESI w ogóle nie wymaga poboru materiału do badań, a ze względu na bardzo niski odzysk badanych związków nie powoduje zubażania próbki [A-2].

Oświadczenia o wkładzie w artykuły będące podstawą autoreferatu:

[A-1]

W ramach zatrudnienia na stanowisku postdoctoral fellow podczas pobytu w Uniwersytecie w Waterloo moim głównym zadaniem było zwiększenie jakości otrzymywanych informacji w biomedycznych aplikacjach SPME. Analizując dostępną literaturę, doszedłem do wniosku, że jednym z najbardziej rozpowszechnionym zestawem do celowanego profilowania metabolomicznego, który jednocześnie umożliwia ilościowe oznaczenia są zestawy firmy Biocrates Life Sciences AG (Innsbruck, Austria). Przedstawiłem plan badania Panu Prof. Pawliszynowi, po uzyskaniu jego akceptacji wraz z doktorantem (Pan Runshan Will Jiang) wspólnie wykonaliśmy zaplanowane przeze mnie eksperymenty. Następnie, pokierowałem doktoranta w jaki sposób prawidłowo analizować część danych (tzw. data preprocessing), sam zajmując się analizą statystyczną tych oraz wspólnie napisaliśmy manuskrypt. Po akceptacji przez Pana Profesora Pawliszyna praca została wysłana do redakcji.

[A-2]

Będąc zatrudnionym na pozycji postdoctoral fellow na Uniwersytecie w Waterloo w Kanadzie, postanowiłem zbadać zaobserwowaną podczas pracy nad rozprawą doktorską konwersję CA4P do CA4 w próbkach medium komórkowego. Po uzyskaniu zgody od Prof. Janusza Pawliszyna, zaprojektowałem oraz wykonałem wszystkie eksperymenty, następnie opracowałem dane i napisałem manuskrypt, który po akceptacji Prof. Pawliszyna został wysłany do redakcji.

[A-3]

Wraz z uczestniczką studiów doktorskich, Panią mgr Pauliną Modrakowską, wspólnie opracowaliśmy cały zarys manuskryptu, który przedstawiliśmy Pani dr.n farm Barbarze Bojko, Prof. UMK. Rozdziały za które byłem osobiście odpowiedzialny dotyczyły metod preparatyki próbek (rozdział: 2. Sample Preparation for In Vitro Studies), możliwości ekstrapolacji wyników *in vitro* na modele *in vivo* (5. In Vitro-In Vivo Extrapolation of Oncometabolites) oraz wspólnie z Panią mgr Pauliną Modrakowską rozdział dotyczący metabolomiki glejaków w badaniach *in vitro* (3. Metabolomics of GBM In Vitro). Manuskrypt przedstawiono Pani Prof. Bojko, i po otrzymaniu akceptacji został wysłany do redakcji czasopisma.

[A-4]

Praca jest bezpośrednią kontynuacją oraz rozszerzeniem mojej rozprawy doktorskiej. Jestem głównym pomysłodawcą tego artykułu. Przegląd literatury, który wykonałem przed rozpoczęciem prac, umożliwił znalezienie modelu nowotworu dla którego możliwe były oznaczenia *in vitro* oraz *in vivo*. W trakcie projektu uczyłem, a potem nadzorowałem prace dwóch magistrantek (Pani Paulina Taczyńska oraz Pani Marta Czechowska), które zajmowały się prowadzeniem hodowli podstawowej 2D oraz uczestnika studiów doktoranckich (Pan mgr Kamil Łuczykowski), który zajmował się hodowlą 3D. Optymalizowałem protokół ekstrakcji z hodowli komórkowych (2D oraz 3D), eksperyment metabolomiczny dla hodowli 2D wykonywałem samodzielnie, natomiast dla hodowli 3D wraz z Panem mgr Kamilem Łuczykowskim. Zaprojektowałem eksperyment na modelu mysim, a przy procedurach związanych z badanymi osobnikami (wszczep komórek oraz ekstrakcja SPME) współuczestniczyła Pani doktor Katarzyna Burlikowska. Samodzielnie wykonałem dalsze etapy protokołu SPME. W analizie instrumentalnej współuczestniczyła uczestniczka studiów doktoranckich (Pani mgr Joanna Bogusiewicz). Samodzielnie analizowałem dane metabolomiczne oraz napisałem manuskrypt. Po akceptacji manuskryptu przez wszystkich współautorów został on wysłany do redakcji.

Przegląd najważniejszych osiągnięć będące podstawą autoreferatu:

[A-1]

- Modyfikacja protokołu analitycznego opartego o komercyjny zestaw do oznaczeń metabolomicznych w celu jego połączenia z SPME
- Wykazanie możliwości profilowania metabolomicznego tkanki natywnej z wykorzystaniem połączenia SPME oraz komercyjnego zestawu
- Wykazanie różnic między tkanką natywną oraz poddaną homogenizacji

[A-2]

- Modyfikacja instrumentu analitycznego celem wykonywania oznaczeń opartych o Coated Blade Spray (CBS)
- Wykorzystanie dwóch technik SPME-MS do analizy biokonwersji proleku w formę aktywną
- Pozytywne porównanie w/w technik z standardową techniką analityczną celem ich walidacji

[A-3]

- Wytypowanie najczęściej stosowanych metod preparatyki próbek stosowanych do badań metabolomicznych hodowli komórkowych *in vitro*
- Wskazanie jakie modele komórkowe cechują się wysokim poziomem ekstrapolacji *in vitro in vivo*

[A-4]

- Adaptacja systemu SPME opartego o włókna do monitorowania zmian metabolomu linii komórkowych mysiego czerniaka B16F10 w czasie ich wzrostu w modelach *in vitro* 2D oraz 3D
- Analiza metabolomu modelu mysiego czerniaka B16 F10 *in vivo* z wykorzystaniem szczepu modelowego C57BL/6
- Porównanie modeli *in vitro* 2D oraz 3D celem wytypowania dokładniejszego modelu ekstrapolacyjnego (ang. *in vitro to in vivo extrapolation, IVIVE*)

#### Omówienie drugiego osiągnięcia naukowego – współpraca z partnerami nieakademickimi w ramach współpracy nauki z biznesem

Objęta przeze mnie pozycja postdoctoral fellow na Uniwersytecie w Waterloo w Kanadzie wiązała się, oprócz prowadzenia badań naukowych, z komunikacją z partnerami biznesowymi w celu rozwijania techniki SPME w aplikacjach biomedycznych. Dzięki analizie literatury wybrałem firmę **Biocrates Life Sciences AG** posiadającą w portfolio kilka zestawów do ilościowego profilowania metabolomicznego opartego o normalizację izotopowo znakowanych analogów związków endogennych. Po rozmowach z przedstawicielami firmy oraz dzięki przekazanej przez nich wiedzy dotyczącej informacji jak funkcjonuje ich zestaw, wraz z doktorantem Pana Prof. Pawliszyna, opracowaliśmy protokół umożliwiający połączenie SPME z tym zestawem w celu analizy tkanki w formie natywnej. Artykuł wynikający z tej współpracy [A-1] jest pierwszym, który wskazuje na możliwość wykorzystania zaproponowanej strategii do poprawy jakości badań metabolomicznych na tkance nie poddanej homogenizacji, a w przyszłości także *in vivo*. Wcześniejsze artykuły i noty aplikacyjne, gdzie analizowano tkanki przy pomocy zestawu Biocrates zawsze wymagały jej homogenizacji, ponieważ zestaw jest przystosowany jedynie do próbek płynnych.

Drugą firmą, z którą miałem możliwość bezpośredniej współpracy jest producent spektrometrów mas, firma **Shimadzu Corporation**. Jednym z kierunków badań w grupie Profesora Pawliszyna jest rozwijanie szybkich metod detekcji wykorzystujących mikroekstrakcję do fazy stałej do efektywnej preparatyki próbek w celu utrzymania wysokiej czystości ekstraktów, a tym samym wysokiej jakości analiz. Jednym z rozwiązań jest połączenia metody Probe Electrospray Ionization – Mass Spectrometry (PESI-MS) z SPME, w którym igłę służącą do poboru próbki i jako emiter elektrorozpylania pokryto polimerem o właściwościach ekstrakcyjnych. Zarówno PESI-MS, jak i Coated-PESI-MS ma szerokie możliwości aplikacyjne, dlatego jednym z powierzonych mi zadań było zademonstrowanie potencjału tej techniki w przemyśle farmaceutycznym. Bazując na wcześniejszych doświadczeniach z SPME w analizach biotransformacji leków zaproponowałem oraz wykonałem takie właśnie badanie. Jednak oprócz już dostępnej na tym instrumencie techniki Coated-PESI zaproponowałem możliwość połączenia innej metody opracowanej w University of Waterloo, tj. Coated Blade Spray (CBS), z interfejsem dedykowanego PESI, ze względu na jego komercyjną dostępność (obecnie stosowane interfejsy CBS wymagają składania zamówień specjalnych, co znacznie ogranicza stosowanie technologii). W tym celu zaprojektowałem w programie graficznym oraz wydrukowałem na drukarce 3D specjalny adapter, który umożliwia pozycjonowanie sondy CBS przed linią desolwatacyjną spektrometru mas. Jednocześnie zmodyfikowałem parametry źródła PESI tak aby jonizacja trwała nieprzerwanie przez cały czas niezbędny do procesu CBS-MS zamiast pracy w około 250 milisekundowych cyklach jak w przypadku standardowego protokołu PESI. Praca [A-2] tego cyklu jest pierwszym połączeniem techniki CBS z spektrometrem mas tej firmy i pokazuje potencjał komercjalizacyjny tegoż połączenia.

#### Analiza bibliometryczna

Całość dorobku naukowego:

Łączna wartość punktacji KBN/MEiN: 2469.000

Wartość wskaźnika IF: 117.639

Cytowania (Web of Science Core Collection): 259

Cytowania bez autocytowań (Web of Science Core Collection): 237

Index H=7 (Web of Science Core Collection)

Cytowania (Scopus): 284

Cytowania bez autocytowań (Scopus): 265

Index H=8 (Scopus)

Dorobek po uzyskaniu stopnia doktora:

Łączna wartość punktacji KBN/MEiN: 2010.000

Wartość wskaźnika IF: 93.950

### **Podsumowanie pozostałego dorobku i osiągnięć naukowych poza cyklem habilitacyjnym**

Będąc uczestnikiem studiów doktoranckich byłem wykonawcą grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, konkurs: HARMONIA 7, Tytuł projektu: „Nowe rozwiązania analityczne w onkologii: od badań podstawowych do szybkiej diagnostyki śródoperacyjnej”, 2015/18/M/ST4/00059. Kierownik projektu: dr n farm. Barbaja Bojko, Prof. UMK. W ramach tego grantu opublikowano następujące artykuły:

Goryńska Paulina Zofia, Chmara Kamila\*, Kupcewicz Bogumiła, Goryński Krzysztof, **Jaroch Karol**, Paczkowski Dariusz\*, Furtak Jacek, Harat Marek, Bojko Barbara.

Metabolomic phenotyping of gliomas : what can we get with simplified protocol for intact tissue analysis?

Cancers

2022 : Vol. 14, nr 2, s. 1-20;, 312.

**IF:** 5.200

**MNiSW:** 140.000

Bogusiewicz Joanna, Kupcewicz Bogumiła, Goryńska Paulina Zofia, **Jaroch Karol**, Goryński Krzysztof, Birski Maciej, Furtak Jacek, Paczkowski Dariusz, Harat Marek, Bojko Barbara.

Investigating the potential use of chemical biopsy devices to characterize brain tumor lipidomes.

Int. J. Mol. Sci.

2022 : Vol. 23, nr 7, s. 1-15;, 3518.

**IF:** 5.600

**MNiSW:** 140.000



Bogusiewicz Joanna, Gaca-Tabaszewska Magdalena\*, Olszówka Dominik\*, **Jaroach Karol**, Furtak Jacek, Harat Marek, Pawliszyn Janusz, Bojko Barbara.

Coated blade spray-mass spectrometry as a new approach for the rapid characterization of brain tumors.

Molecules

2022 : Vol. 27, nr 7, s. 1-13, 2251.

**IF:** 4.600

**MNiSW:** 140.000

Bogusiewicz Joanna, Burlikowska Katarzyna, **Jaroach Karol**, Goryńska Paulina Zofia, Goryński Krzysztof, Birski Maciej, Furtak Jacek, Paczkowski Dariusz, Harat Marek, Bojko Barbara.

Profiling of carnitine shuttle system intermediates in gliomas using solid-phase microextraction (SPME).

Molecules

2021 : Vol. 26, nr 20, s. 1-11;, 6112.

**IF:** 4.927

**MNiSW:** 140.000

Bogusiewicz Joanna, Goryńska Paulina Zofia, Gaca Magdalena\*, Chmara Kamila\*, Goryński Krzysztof, Jaroach Karol, Paczkowski Dariusz, Furtak Jacek, Harat Marek, Bojko Barbara.

On-site sampling and extraction of brain tumors for metabolomics and lipidomics analysis.

Jove-J. Vis. Exp.

2020, nr 159, s. 1-9, e61260.

**IF:** 1.355

**MNiSW:** 70.000

Byłem wykonawcą grantu finansowanego przez Ministerstwo Obrony Narodowej, Konkurs: Kościuszko edycja II, Tytuł projektu: "Profilowanie metabolomiczne i lipidomiczne substancji białej i szarej kory mózgowej z wykorzystaniem nowoczesnej technologii opartej na biopsji chemicznej połączonej ze spektrometrem mas", 508/2017/DA. Kierownik projektu: Prof. Janusz Pawliszyn. W ramach tego grantu opublikowano następujące artykuły:

Bogusiewicz Joanna, Burlikowska Katarzyna, Łuczykowski Kamil, **Jaroch Karol**, Birski Maciej, Furtak Jacek, Harat Marek, Pawliszyn Janusz, Bojko Barbara.

New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo.

Sci. Rep.

2021 : Vol. 11, nr 1, s. 1-10;, 19522.

**IF:** 4.997

**MNiSW:** 140.000

Uczestniczyłem w pracach eksperymentalnych związanych z oznaczeniami cytotoksyczności związków o potencjalnym charakterze przeciwnowotworowym z wykorzystaniem różnych modeli nowotworowych *in vitro*:

Pałkowski Łukasz, Karolak Maciej, Skrzypczak Andrzej, Wojcieszak Marta, Walkiewicz Filip, Podemski Jonasz, **Jaroch Karol**, Bojko Barbara, Materna Katarzyna, Krysiński Jerzy.

Antimicrobial and cytotoxic activity of novel imidazolium-based ionic liquids.

Molecules

2022 : Vol. 27, nr 4, s. 1-16;, 1974.

**IF:** 4.600

**MNiSW:** 140.000

Pluskota Robert, **Jaroch Karol**, Kośliński Piotr, Ziomkowska Blanka, Lewińska Agnieszka, Kruszewski Stefan, Bojko Barbara, Koba Marcin.

Selected drug-likeness properties of 2-Arylidene-indan-1,3-dione derivatives : chemical compounds with potential anti-cancer activity.

Molecules

2021 : Vol. 26, nr 17, s. 1-20;, 5256.

**IF:** 4.927

**MNiSW:** 140.000

Piechowska Katarzyna, Mizerska-Kowalska Magdalena, Zdzisińska Barbara, Cytarska Joanna, Baranowska-Łączkowska Angelika, **Jaroch Karol**, Łuczykowski Kamil, Płaziński Wojciech, Bojko Barbara, Kruszewski Stefan, Misiura Konrad, Łączkowski Krzysztof.

Tropinone-derived alkaloids as potent anticancer agents : synthesis, tyrosinase inhibition, mechanism of action, DFT calculation, and molecular docking studies.

Int. J. Mol. Sci.

2020 : Vol. 21, nr 23, s. 1-24;, 9050.

**IF:** 5.924

**MNiSW:** 140.000

Piechowska Katarzyna, Świtalska M., Cytarska Joanna, **Jaroch Karol**, Łuczykowski Kamil, Chałupka Joanna\*, Wietrzyk Joanna, Misiura Konrad, Bojko Barbara, Kruszewski Stefan, Łączkowski Krzysztof.

Discovery of tropinone-thiazole derivatives as potent caspase 3/7 activators, and noncompetitive tyrosinase inhibitors with high antiproliferative activity : rational design, one-pot tricomponent synthesis, and lipophilicity determination.

Eur. J. Med. Chem.

2019 : Vol. 175, s. 162-171.

**IF:** 5.572

**MNiSW:** 140.000

Uczestniczyłem w pracach eksperymentalnych związanych z profilowaniem metabolomicznym hodowli komórkowych *in vitro*, analizami metabolomicznymi zwierząt laboratoryjnych oraz ludzi:

Jaroch Alina, Kozakiewicz Mariusz, **Jaroch Karol**, Głowczewska-Siedlecka Emilia, Bojko Barbara, Kędziora-Kornatowska Kornelia.

Untargeted metabolomic assay of prefrail older adults after nutritional intervention.

Metabolites

2022 : Vol. 12, nr 5, s. 1-12;, 378.

**IF:** 4.100

**MNiSW:** 100.000

Filipiak Wojciech, Jaroch Karol, Szeliska Paulina, Żuchowska Karolina\*, Bojko Barbara.

Application of thin-film microextraction to analyze volatile metabolites in A549 cancer cells.

Metabolites

2021 : Vol. 11, nr 10, s. 1-16., 704.

**IF:** 5.581

**MNiSW:** 100.000

Burlikowska Katarzyna, Stryjak Iga, Bogusiewicz Joanna, Kupcewicz Bogumiła, Jaroch Karol, Bojko Barbara.

Comparison of metabolomic profiles of organs in mice of different strains based on SPME-LC-HRMS.

Metabolites

2020 : Vol. 10, nr 6, s. 1-17;, 255.

IF 4.932

MNiSW: 100.000

### **Realizacja grantów o zasięgu krajowym i międzynarodowym**

**Kierownik projektu** finansowanego przez KUBUS 2.0-Komercjalizacja Uniwersyteckich Badań i Usług, Tytuł Projektu: „Wytwarzanie uniwersalnej platformy analityczna opartej o mikroekstrakcję do fazy stałej służąca do analiz w systemie wysokoprzepustowym”, 2019.02.01-2020.06.30. Grant został rozliczony pozytywnie.

**Kierownik projektu** finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, Konkurs: PRELUDIUM 12, Tytuł projektu: „Uniwersalna platforma analityczna oparta o mikroekstrakcję do fazy stałej służąca do badań metabolizmu generowanego w warunkach in vitro”, 2016/23/N/NZ7/01929, 2017.07.13-2020.07.12. Grant został rozliczony pozytywnie a jego efekty oprócz wkładu w rozprawę doktorską dotyczą również zdobytej wiedzy i umiejętności stosowanych w publikacji będącej włączoną w cykl osiągnięcia opisywanego w niniejszym autoreferacie [A-2].

**Wykonawca w międzynarodowym** grantie finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, (w ramach programu "Development of new analytic tools and pathways to accelerate diagnosis and diagnostic monitoring of rare diseases"), Tytuł projektu: „Test metaboliczny in vivo na hipertermię złośliwą”, EJPRD22-173, 2023-obecnie. Kierownik Projektu: dr n. farm Barbara Bojko, Prof UMK.

**Wykonawca w międzynarodowym** projekcie finansowanym przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej, Tytuł projektu: „Standaryzowanie metod mikroekstrakcyjnych dla

czasowo-rozdzielczej metabolomiki”, PPN/BAT/2021/1/00020/U/00001, 2022-obecnie  
Kierownik Projektu: dr n. farm Barbara Bojko, Prof UMK.

**Wykonawca w międzynarodowym** grantie finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Tytuł projektu: „Innowacja w badaniach translacyjnych: biokompatybilne mikrosondy do badań nowotworów in vitro i in vivo”, POLTUR4/MicroIVIVE/5/2021, 2019-obecnie, Kierownik Projektu: dr n. farm Barbara Bojko, Prof UMK.

**Wykonawca** w projekcie finansowanym przez Ministerstwo Obrony Narodowej, Konkurs: Kościuszko edycja II, Tytuł projektu: "Profilowanie metabolomiczne i lipidomiczne substancji białej i szarej kory mózgowej z wykorzystaniem nowoczesnej technologii opartej na biopsji chemicznej połączonej ze spektrometrem mas”, 508/2017/DA. Kierownik projektu: Prof. Janusz Pawliszyn.

**Wykonawca** w grantie finansowanym finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, konkurs: HARMONIA 7, Tytuł projektu: „Nowe rozwiązania analityczne w onkologii: od badań podstawowych do szybkiej diagnostyki śródoperacyjnej, 2015/18/M/ST4/00059. Kierownik projektu: dr n farm. Barbaja Bojko, Prof. UMK.

### **Recenzje projektów badawczych, panele eksperckie**

Recenzja grantu Preludium dla NCN, konkurs Preludium 18. Numer wniosku: 2019/35/N/ST4/03896.

### **Recenzje artykułów naukowych**

Recenzje artykułów naukowych dla czasopisma

Trends in Analytical Chemistry (IF 13.1), 2 prace

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (IF 3,4), 1 praca

### **Wyróżnienia i nagrody**

Nazwa nagrody: Zespołowa nagroda Rektora

Rok przyznania: 2023

Nazwa jednostki przyznającej nagrodę: Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Nazwa nagrody: Stypendium Ministra Edukacji i Nauki

Rok przyznania: 2022

Nazwa jednostki przyznającej nagrodę: Minister Edukacji i Nauki

Nazwa nagrody: Zespołowa nagroda Rektora

Rok przyznania: 2022

Nazwa jednostki przyznającej nagrodę: Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Nazwa nagrody: Zespołowa nagroda Rektora

Rok przyznania: 2020

Nazwa jednostki przyznającej nagrodę: Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Nazwa nagrody: Zespołowa nagroda Rektora

Rok przyznania: 2019

Nazwa jednostki przyznającej nagrodę: Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Nazwa nagrody: Nico Nibbering Travel Award

Rok przyznania: 2018

Nazwa jednostki przyznającej nagrodę: komitet organizacyjny międzynarodowej konferencji "XXII International Mass Spectrometry Conference", Florencja, Włochy

Nazwa nagrody: Travel Grant and Lightning Talk

Rok przyznania: 2018

Nazwa jednostki przyznającej nagrodę: komitet organizacyjny międzynarodowej konferencji „Mass spectrometry applications to the clinical lab”, Salzburg, Austria

Nazwa nagrody: Best Poster Award

Rok przyznania: 2017

Nazwa jednostki przyznającej nagrodę: komitet organizacyjny międzynarodowej konferencji „HPLC 2017 symposium”, Praga, Republika Czeska

Nazwa nagrody: Trzecie miejsce za prezentację ustną

Rok przyznania: 2017

Nazwa jednostki przyznającej nagrodę: komitet organizacyjny międzynarodowej konferencji „International Medical Congress iMEDIC 2017”, Bydgoszcz, Polska

### **Organizacja oraz udział w kursach i szkoleniach**

Organizacja i prowadzenie **międzynarodowego** kursu pt. „Shift in bioanalysis: micro-methods as a new alternative in drug analysis and discovery of biomarkers”, Bydgoszcz, Polska, 2022

Organizacja i prowadzenie **międzynarodowego** kursu pt. „Sample Prep Course”, Bydgoszcz, Polska, 2021

Organizacja i prowadzenie **międzynarodowego** kursu pt. „Sample Prep Course”, Bydgoszcz, Polska, 2019

Organizacja i prowadzenie **międzynarodowego** kursu pt. „Sample Preparation for MS Bioanalysis: Theory, Practice, and Applications Course”, Bydgoszcz, Polska, 2018

Organizacja i prowadzenie **międzynarodowego** kursu pt. „Solid-Phase Microextraction (SPME): Theory, Practice and Applications”, Bydgoszcz, Polska, 2017

Organizacja i prowadzenie **międzynarodowego** kursu pt. „Solid-Phase Microextraction (SPME): Theory, Practice and Applications”, Bydgoszcz, Polska, 2016

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

**Wykonawca w międzynarodowym** grantie finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, (w ramach programu "Development of new analytic tools and pathways to accelerate diagnosis and diagnostic monitoring of rare diseases"), Tytuł projektu: „Test metaboliczny in vivo na hipertermię złośliwą”, 2023-obecnie. Kierownik Projektu: dr n. farm Barbara Bojko, Prof UMK.

W ramach realizacji tego grantu odbywać się będą krótkie wyjazdy do partnerów zagranicznych w celu wspólnego analizowania próbek oraz szkolenia z zakresu wykorzystania SPME w analizie tkanek.

**Wykonawca w międzynarodowym** grantie finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Tytuł projektu: „Innowacja w badaniach translacyjnych: biokompatybilne mikrosondy do badań nowotworów in vitro i in vivo”, POLTUR4/MicroIVIVE/5/2021, 2019-obecnie, Kierownik Projektu: dr n. farm Barbara Bojko, Prof UMK.

W ramach realizacji tego grantu opiekowałem się studentami programu Erasmus Panem Enes Çetin oraz Panią Kübra Kahremanoğlu. Obydwoje byli studentami zaangażowanymi w pracę nad w/w w ośrodku partnera zagranicznego, Uniwersytet Środkowo-Wschodni w Ankarze, w Turcji. W ramach ich wizyty uczyłem ich podstaw metabolomiki hodowli komórkowych oraz badań tkanek z wykorzystaniem SPME. W ramach tego samego projektu obyłem staż o ośrodku partnera w Ankarze, gdzie zostałem przeszkolony z metod wytwarzania nowych sond SPME.

**Zatrudnienie na stanowisku postdoctoral fellow** na Uniwersytecie w Waterloo, w Kanadzie gdzie zajmowałem się wykorzystaniem mikroekstrakcji do fazy stałej w aplikacjach biologicznych. Po odbyciu krótkie terminowego stażu w ramach realizacji Grantu HARMONIA oraz uzyskaniu stopnia naukowego doktora dostałem ofertę pracy w w/w ośrodku zagranicznym. W ramach umowy o pracę moim zadaniem była praca związana z medycznym zastosowaniem SPME oraz współpraca z zewnętrzną firmą Shimadzu.

Efektom tego zatrudnienia jest publikacja dwóch prac, które są uwzględnione w niniejszym cyklu habilitacyjnym:

Jiang Runshan Will\*, **Jaroch Karol\***, Pawliszyn Janusz.

Solid-phase microextraction of endogenous metabolites from intact tissue validated using a Biocrates standard reference method kit.

J. Pharmaceut. Anal. 2023 : Vol. 13, nr 1, s. 55-62. \*equal contribution

**IF:** 8.8

**MNiSW:** 140 punktów

**Jaroch Karol**, Pawliszyn Janusz.



Time-course monitoring of in vitro biotransformation reaction via solid-phase microextraction-ambient mass spectrometry approaches.

J. Pharmaceut. Anal. 2022 : Vol. 12, nr 1, s. 186-191.

**IF:** 8.8

**MNiSW:** 140 punktów

**Wykonawca** w projekcie finansowanym przez Ministerstwo Obrony Narodowej pt. „Profilowanie metabolomiczne i lipidomiczne substancji białej i szarej kory mózgowej z wykorzystaniem nowoczesnej technologii opartej na biopsji chemicznej połączonej ze spektrometrem mas”, Kościuszko- edycja II (508/2017/DA), 2019.06.2019.12. Kierownikiem grantu jest Profesor Janusz Pawliszyn, u którego realizowałem staż naukowy w 2017 roku.

**Staż na Uniwersytecie w Waterloo**, Waterloo, Kanada. Dzięki temu wyjazdowi związanemu z realizacją grantu HARMONIA 7 możliwe było nawiązanie kontaktu naukowego z Panem Profesorem Pawliszynem, który po zakończeniu mojej rozprawy doktorskiej umożliwił mi rozpoczęcie pracy na etacie post-doc. Dodatkowo zdobyte umiejętności podczas tego stażu pozwoliły na skuteczną realizację i rozliczenie grantu PRELUDIUM 12, którego byłem kierownikiem.

**Staż na Uniwersytecie w Oslo**, Oslo, Norwegia. Staż naukowy u Pana Profesora Stiga Pedersen-Bjergaard pozwolił mi na poznanie podstaw metod preparatyki próbek opartych o mikroekstrakcję.

**Staż na Uniwersytecie Wiedeńskim**, Wiedeń, Austria stanowi kontynuację oraz rozszerzenie metod normalizacji oraz analizy ilościowej tkanek przy pomocy SPME.

**Staż na Środkowo-Wschodnim Uniwersytecie Technicznym**, Ankara, Turcja. Dzięki temu stażowi poznałem nowe techniki wytwarzania oraz wykorzystywania sond SPME.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

**2022/09** Rozpoczęcie szkolenia specjalizacyjnego dla farmaceutów pt. „Farmakologia”, Ośrodek ds. kształcenia podyplomowego na Wydziale Farmaceutycznym, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

W ramach pracy naukowo-dydaktycznej od 2014 roku prowadziłem ćwiczenia, seminaria oraz wykładów, byłem zaangażowany w tworzenie skryptów, aktualizowanie sylabusów, tworzenie prezentacji oraz przygotowywanie ćwiczeń praktycznych dla następujących przedmiotów i kierunków:

1. Farmakologia i Farmakodynamika I na kierunku Farmacja
2. Farmakologia i Farmakodynamika II na kierunku Farmacja
3. Biotechnologia Farmaceutyczna na kierunku Farmacja
4. Farmakoterapia i informacja o lekach na kierunku Farmacja
5. Farmakologia na kierunku Zielarstwo i fitoterapia (kierunek prowadzony w ramach współpracy z Politechniką Bydgoską im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich)
6. Farmakologia z Toksykologią na kierunku Kosmetologia
7. Pharmacology with Pharmacodynamics II w ramach programu Erasmus
8. Pharmaceutical Biotechnology w ramach programu Erasmus

W ramach ankiet studenckich zawsze otrzymuję wysokie oceny: 4.28, 4.97, 5.0, 4.62, 4.72, 4.86, 5.0, 4.82. Przedstawione są wyniki od roku akademickiego 2021/22 do roku 2014/15. Skala oceniania 1-5 (1-najniższa ocena, 5- najwyższa ocena).

#### Opieka nad stażystami:

Mgr Patrycja Janiszek, wykonująca staż w ramach specjalizacji z Farmacji Klinicznej

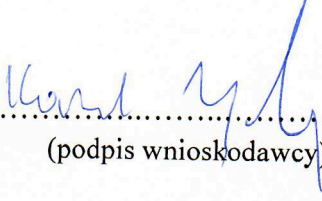
Enes Çetin, student wizytujący w ramach programu Erasmus

Kübra Kahremanoğlu, studentka wizytująca

#### Opieka nad magistrantami:

2021/2022 Bartłomiej Charemski, praca pt. „Ocena wpływu mikroekstrakcji do fazy stałej na wzrost linii komórkowych”

Od 2022 roku jestem członkiem Zespołu ds. Promocji Wydziału Farmaceutycznego, Collegium Medicum, UMK w Toruniu. W ramach tego zespołu prowadziłem wykład podczas Warsztatów praktyczne dla Uczniów szkół ponadpodstawowych – III edycja

  
.....  
(podpis wnioskodawcy)