

**Załącznik nr 3 do wniosku o wszczęcie
postępowania habilitacyjnego z dnia
14.05.2025 r.**

Autoreferat

dr n. farm. Piotr Kośliński

Katedra Toksykologii i Bromatologii

Wydział Farmaceutyczny

Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 2025

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	4
4. Omówienie osiągnięć naukowych	4
4.1. Osiągnięcie habilitacyjne (cykl pięciu powiązanych tematycznie artykułów):	4
„Wykorzystanie celowanej analizy metabolomicznej do poszukiwania związków markerowych w chorobach neurologicznych o podłożu autoimmunologicznym oraz w chorobach nowotworowych	4
4.1.1. Tytuł cyklu osiągnięcia	4
4.1.2. Cykl publikacji wchodzący w skład osiągnięcia naukowego	4
4.1.3. Wstęp do tematyki badań.....	7
4.1.4. Cele naukowe i omówienie wyników zawartych w cyklu publikacji	12
4.1.5. Podsumowanie cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego	35
4.1.6. Bibliografia	36
4.2. Dodatkowe osiągnięcie naukowe:	45
„Celowana analiza metaboliczna profili aminokwasów jako potencjalna metoda diagnostyki i monitorowania procesów chorobowych”	45
4.3. Dodatkowe osiągnięcie naukowe:	48
„Opracowanie i zastosowanie metod chromatografii cieczowej do analizy związków psychoaktywnych”	48
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	50
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	56
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej	59

1. Imię i nazwisko

Piotr Kośliński

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

1. **Menedżer Systemu Zarządzania Jakością Wyrobów Medycznych.**

Dyplom ukończenia studiów podyplomowych nr 16154/137066, Szkoła Główna Handlowa, 13.02.2025 r.

2. **Specjalista Laboratoryjnej Toksykologii Medycznej.**

Dyplom uzyskania tytułu specjalisty w dziedzinie: laboratoryjna toksykologia medyczna nr 026/2021.1/471. Centrum Egzaminów Medycznych, Łódź, 15.04.2021 r.

3. **Doktor Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu w Dyscyplinie Nauki Farmaceutyczne.**

Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny, 4 listopad 2014 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Oznaczanie profili metabolicznych związków pterynowych w moczu jako potencjalnych biomarkerów nowotworów pęcherza moczowego”*.

Praca realizowana w Katedrze i Zakładzie Toksykologii CM UMK oraz w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki GUMED.

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Michał Markuszewski.

4. **Magister Analityki Medycznej.**

Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; 29 czerwca 2009 r.

Tytuł pracy magisterskiej: *„Analiza zawartości 8-oksydgu w DNA leukocytarnym u nosiciela genu BRCA1 - wpływ słaby modyfikatorów ryzyka nowotworzenia”*.

Praca realizowana w Katedrze Biochemii Klinicznej CM UMK.

Promotor: dr hab. Tomasz Dziaman, prof. UMK.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

2016 – obecnie	Adiunkt Katedra Toksykologii i Bromatologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;
2019 - 2024	Adiunkt Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii;
2012 - 2015	Asystent Katedra i Zakład Toksykologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;
2011 – 2012	Pracownik Naukowo-Techniczny Katedra i Zakład Toksykologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;

4. Omówienie osiągnięć naukowych

(Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.)

4.1. Osiągnięcie habilitacyjne (cykl pięciu powiązanych tematycznie artykułów): „Wykorzystanie celowanej analizy metabolomicznej do poszukiwania związków markerowych w chorobach neurologicznych o podłożu autoimmunologicznym oraz w chorobach nowotworowych

4.1.1. Tytuł cyklu osiągnięcia

Wykorzystanie celowanej analizy metabolomicznej do poszukiwania związków markerowych w chorobach neurologicznych o podłożu autoimmunologicznym oraz w chorobach nowotworowych.

4.1.2. Cykl publikacji wchodzący w skład osiągnięcia naukowego

Zgodnie z analizą bibliometryczną łączna punktacja MNIŚW prezentowanego cyklu składającego się z 5 prac wynosi 520 pkt., a sumaryczny współczynnik Impact Factor: 15,906

pkt. (IF_{5-letni} = 16,5). We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem, w czterech pracach jestem autorem korespondencyjnym. Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w załącznikach.

P1. Kośliński P.; Rzepiński Ł.; Koba M.; Gackowski M.; Maciejek Z.; *Amino acids levels as a potential biomarker in myasthenia gravis*. Folia Neuropathol. 2022;60(1):122-127.

doi: 10.5114/fn.2022.114053. [Wskaźnik IF=2,0; IF_{5-letni}=2,1; MNiSW_{pkt.} = 70]

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w postanie pracy to: przygotowanie koncepcji i metodologii badania, współpraca w zakresie pozyskania materiału biologicznego do analiz, wykonanie oznaczeń profili aminokwasów metodą HPLC-FL, współpraca w zakresie analizy statystycznej zgromadzonych danych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie i napisanie manuskryptu, zarządzanie i koordynacja działalności badawczej. Swoj udział procentowy w powstaniu publikacji szacuję na 80%.

P2. Kośliński P*; Rzepiński Ł.; Daghir-Wojtkowiak E.; Koba M.; Maciejek Z.; *Serum amino acid profiles in patients with myasthenia gravis*. Amino Acids. 2023 Sep;55(9):1157-1172.

doi: 10.1007/s00726-023-03303-3. [Wskaźnik IF=3,0; IF_{5-letni} = 3,3; MNiSW_{pkt.}: 100]

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w postanie pracy to: przygotowanie koncepcji i metodologii badania, współpraca w zakresie pozyskania materiału biologicznego do analiz, wykonanie oznaczeń profili aminokwasów metodą HPLC-MS/MS, współpraca w zakresie analizy statystycznej zgromadzonych danych, przegląd piśmiennictwa, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie i napisanie manuskryptu, korespondencja z redakcją i recenzentami, korekta manuskryptu, zarządzanie i koordynacja działalności badawczej. Swoj udział procentowy w powstaniu publikacji szacuję na 75%.

P3. Kośliński P*; Rzepiński Ł.; Koba M.; Maciejek Z.; Kowalewski M.; Daghir-Wojtkowiak E.; *Comparative Analysis of Serum Amino Acid Profiles in Patients with Myasthenia Gravis and Multiple Sclerosis*. J Clin Med. 2024 Jul 12;13(14):4083.

doi: 10.3390/jcm13144083. [Wskaźnik IF=3,0; IF_{5-letni} = 3.4; MNiSW_{pkt.}: 140]

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w postanie pracy to: przygotowanie koncepcji i metodologii badania, współpraca w zakresie pozyskania materiału biologicznego do analiz, wykonanie oznaczeń profili

aminokwasów metodą HPLC-MS/MS, współpraca w zakresie analizy statystycznej zgromadzonych danych, przegląd piśmiennictwa, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie i napisanie manuskryptu, korespondencja z redakcją i recenzentami, korekta manuskryptu, zarządzanie i koordynacja działalności badawczej. Swoj udział procentowy w powstaniu publikacji szacuję na 70%.

P4. Kośliński P*.; Pluskota R.; Mądra-Gackowska K.; Gackowski M.; Markuszewski M.J.; Kędziora-Kornatowska K.; Koba M.; *Comparison of Pteridine Normalization Methods in Urine for Detection of Bladder Cancer*. *Diagnostics* (Basel). 2020;10(9):612. doi:10.3390/diagnostics10090612 [Wskaźnik IF=3,706 ;IF_{5-letni} = 3,1; MNiSW_{pkt}: 70]

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w postanie pracy to: przygotowanie koncepcji i metodologii badania, współpraca w zakresie pozyskania materiału biologicznego do analiz, wykonanie oznaczeń profili związków pterynowych metodą HPLC-FL, współpraca w zakresie analizy statystycznej zgromadzonych danych, przegląd piśmiennictwa, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie i napisanie manuskryptu, korespondencja z redakcją i recenzentami, korekta manuskryptu, zarządzanie i koordynacja działalności badawczej. Swoj udział procentowy w powstaniu publikacji szacuję na 80%.

P5. Kośliński P*.; Pluskota R.; Koba M.; Siedlecki Z.; Śniegocki M.; *Comparative Analysis of Amino Acid Profiles in Patients with Glioblastoma and Meningioma Using Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry* (LC-ESI-MS/MS). *Molecules*. 2023 Nov 22;28(23):7699.

doi: 10.3390/molecules28237699. [Wskaźnik IF=4,2; IF_{5-letni} = 4,6; MNiSW_{pkt}: 140]

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w postanie pracy to: przygotowanie koncepcji i metodologii badania, współpraca w zakresie pozyskania materiału biologicznego do analiz, wykonanie oznaczeń profili aminokwasów metodą HPLC-MS/MS, współpraca w zakresie analizy statystycznej zgromadzonych danych, przegląd piśmiennictwa, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie i napisanie manuskryptu, korespondencja z redakcją i recenzentami, korekta manuskryptu, zarządzanie i koordynacja działalności badawczej. Swoj udział procentowy w powstaniu publikacji szacuję na 80%.

*** – autor korespondencyjny**

4.1.3. Wstęp do tematyki badań

Metabolomika to jedna z dziedzin nauki biologii systemowej zajmująca się analizą jakościową i ilościową wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych metabolitów w organizmach żywych. Metabolomika, podobnie jak inne nauki -omiczne (tj. genomika, proteomika), służy do badania złożonych interakcji w układach biologicznych [1].

Metabolom, który odnosi się do kompletnego zestawu małych cząsteczek metabolitów (takich jak produkty pośrednie metabolizmu, hormony i inne cząsteczki sygnałowe oraz metabolity wtórne) występujących w organizmie, może wykazywać różnice zależne od stanu fizjologicznego, stopnia rozwoju bądź obecności zaburzeń w funkcjonowaniu komórki, tkanki, narządu czy całego organizmu. To właśnie możliwy wpływ stanów patofizjologicznych na zaburzenia równowagi wewnętrznej w układzie biologicznym, który manifestuje się zmianami na poziomie metabolomu, stał się motorem napędowym rozwoju metabolomiki w badaniach biomedycznych. O ile zmiany na poziomie genomu czy proteomu określają predyspozycje do wystąpienia reakcji na różne czynniki biologiczne i środowiskowe, zmiany na poziomie metabolomu odzwierciedlają aktualny stan danego układu biologicznego, zarówno fizjologiczny jak i patofizjologiczny. Ponadto bardzo istotny z klinicznego punktu widzenia jest fakt, że zmiany metaboliczne mogą pojawiać się szybciej niż charakterystyczne dla danego stanu patofizjologicznego obserwowane objawy kliniczne [2,3].

Próby wykorzystania zmian składu płynów biologicznych mają swoją wielowiekową historię sięgającą starożytnej medycyny chińskiej i greckiej, która w diagnostyce pacjenta wspomagała się obserwacjami zmiany koloru, zapachu czy smaku moczu [4]. Koncepcja „profilu metabolicznego” sięga lat 40. XX wieku i została zainicjowana przez Rogera Williamsa. Zasugerowano wówczas, że charakterystyczny wzorec metaboliczny człowieka, który można zidentyfikować w płynach ustrojowych, takich jak mocz czy ślina, jest związany z chorobą. Stosunkowo proste metody analityczne nie pozwalały jednak na szybki rozwój tej koncepcji. Zmiana z analizy jakościowej na ilościową miała miejsce w latach 70. XX wieku, kiedy to Horning, Pauling i Robinson wykorzystali chromatografię gazową z spektrometrią masową, co pozwoliło na dynamiczny rozwój metabolomiki. To właśnie rozwój technik analitycznych i zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych zmienił współczesne spojrzenie na prowadzenie prac badawczych, a innowacyjne badania metaboliczne coraz częściej stają się codzienną praktyką kliniczną.

W literaturze funkcjonują takie pojęcia jak metabolomika i metabonomika, które znajdują swoje definicyjne rozróżnienie. Zgodnie z przyjętą definicją, metabolomika kładzie

większy nacisk na profilowanie metaboliczne na poziomie komórkowym lub narządowym i zajmuje się przede wszystkim metabolizmem endogennym. Metabonomika rozszerza profilowanie metaboliczne o informacje o zaburzeniach metabolizmu spowodowanych czynnikami środowiskowymi czy procesami chorobowymi. W praktyce jednak w dziedzinie badań nad chorobami człowieka terminy te w dużym stopniu nakładają się na siebie i często w praktyce są synonimami [4].

Wraz z rozwojem koncepcji medycyny spersonalizowanej można obserwować rozwój kolejnych gałęzi metabolomiki obejmujących np. metabolomikę kliniczną, która ma na celu ocenę i przewidywanie ryzyka zdrowotnego i chorobowego [5] czy farmakometabolomikę, która w oparciu o wykorzystanie zarówno podstawowych profili metabolicznych przed leczeniem, jak i skutków leczenia farmakologicznego w czasie leczenia pozwala na lepsze zrozumienie mechanizmów działania leku lub ksenobiotyku i zwiększa zdolność przewidywania indywidualnej zmienności odpowiedzi na lek [6,7].

W zależności od zamierzeń oraz charakteru badań metabolomicznych, można wyróżnić dwie podstawowe strategie: celowaną oraz niecelowaną analizę metabolomiczną [2]. Niecelowana analiza metabolomiczna pełni przede wszystkim funkcję poznawczą opierającą się na jakościowym lub ilościowym oznaczeniu możliwie jak największej liczby małocząsteczkowych metabolitów. Podejście to jest z zasady wolne od stawianych *a priori* hipotez i skupia się na analizie możliwie jak największego panelu metabolitów, aby ze zgromadzonych danych wybrać te związki, które w sposób istotny statystycznie różnicują badane grupy. Takie podejście naukowe pozwala na wytyczanie nowych kierunków badawczych, które następnie są weryfikowane z wykorzystaniem celowanej analizy metabolomicznej [8].

Celowana analiza metabolomiczna stanowi wyspecjalizowane podejście, które skupia się na badaniu konkretnych metabolitów w organizmach, komórkach lub tkankach, które zostały wybrane w oparciu o dane literaturowe lub wyniki badań niecelowanych. W przeciwieństwie do analiz niecelowanych, które obejmują szeroki wachlarz metabolitów, celowana metabolomika koncentruje się na wyselekcjonowanej grupie związków chemicznych, co umożliwia dokładniejsze zbadanie ich funkcji oraz interakcji [8,9].

Kluczowym aspektem skutecznej analizy celowanej jest dobór odpowiedniego materiału biologicznego. W zależności od celów badania, można wykorzystać różnorodne próbki, takie jak krew, mocz, ślina, tkanki lub komórki. Przygotowanie próbki jest krytycznym etapem w metabolomice, mającym bezpośredni wpływ na końcowy wynik analizy. Prawidłowe przygotowanie próbki zapewnia, że metabolity będące przedmiotem zainteresowania są

zachowane, ekstrahowane wydajnie i wolne od zanieczyszczeń, które mogłyby zakłócać dalsze procedury analityczne. Badania metabolomiczne często obejmują złożone matryce biologiczne, co sprawia, że skrupulatne przygotowanie próbki jest niezbędne do uzyskania znaczących wyników.

Główne cele przygotowania próbek do celowanej analizy metabolomicznej obejmują:

- zachowanie oryginalnego profilu metabolitów (pewność, że skład metabolitów odzwierciedla prawdziwy stan biologiczny próbki);
- maksymalizację wydajności ekstrakcji (osiągnięcie wysokich wskaźników odzysku dla szerokiego zakresu metabolitów);
- minimalizację degradacji i zanieczyszczenia próbki (zapobieganie utracie lub zmianie metabolitów podczas przygotowywania);
- zapewnienie zgodności z technikami analitycznymi (przygotowanie próbek w formie odpowiedniej do późniejszych procedur analitycznych, takich jak chromatografia i spektrometria mas) [10].

Kluczowym etapem jest także dobór odpowiedniej techniki analitycznej, która umożliwia dokładne pomiary metabolitów. Ostateczny wybór techniki powinien być uzależniony od rodzaju metabolitów, ich stężenia oraz wymagań dotyczących czułości i precyzji pomiaru [11].

Metabolity o zdefiniowanych właściwościach fizykochemicznych jak związki lotne, termostabilne o niskiej polarności mogą być analizowane z wykorzystaniem chromatografii gazowej (GC). Wysokosprawna chromatografia gazowa jest efektywną i wszechstronną metodą, co czyni ją jedną z kluczowych technik analitycznych stosowanych w celowanej analizie metabolomicznej. Jej zastosowanie pozwala na rozdzielenie metabolitów o podobnych właściwościach w stosunkowo krótkim czasie, co pozwala na analizowanie dużej liczby próbek. Łatwość integracji z różnymi metodami detekcji, takimi jak spektrometria mas pozwala na identyfikację nawet subtelnych zmian w poziomach metabolitów, co czyni ją wartościowym narzędziem do analizy biomarkerów chorób oraz innych związków biologicznych. Standaryzacja badań oraz opracowane protokoły wykorzystania chromatografii gazowej, zapewniają wysoką powtarzalność uzyskanych wyników, co jest kluczowe w celowanej analizie metabolomicznej. Mimo wielu zalet aplikacyjnych chromatografia gazowa posiada również pewne ograniczenia związane m.in. z analizą związków nielotnych czy termolabilnych, przez co wiele metabolitów wymaga przeprowadzenia reakcji derywatyzacji przed analizą GC, aby zwiększyć ich lotność i stabilność termiczną. Ten dodatkowy krok może

być czasochłonny i prowadzić do utraty części analitów. Problematyczne może być również rozdzielanie związków polarnych wykazujących niską retencję na kolumnach GC. Pomimo tych ograniczeń, wysokosprawna chromatografia gazowa pozostaje cenną techniką w celowanej analizie metabolomicznej. Jej zastosowanie należy jednak rozważyć w kontekście specyfiki danego projektu badawczego i potrzeb analitycznych[12].

Jedną z bardziej efektywnych i wszechstronnych metod w celowanej analizie metabolomicznej jest elektroforeza kapilarna (CE). Wysoka rozdzielczość CE pozwala na rozdzielanie szerokiego zakresu metabolitów znacznie szybciej niż tradycyjnymi technikami, przy jednoczesnym niskim zużyciu zarówno samej próbki jak i odczynników chemicznych. Trudności związane z wykorzystaniem CE w celowanej analizie metabolomicznej związane są m.in. z dużą wrażliwością na warunki eksperymentalne (pH, temperatura, stężenie buforu) czy efektami matrycowymi co stwarza pewne przeszkody w jej powszechnym zastosowaniu [13,14].

Najczęściej wybieraną techniką separacyjną w badaniach obejmujących celowaną analizę metabolomiczną pozostaje jednak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), która dzięki swojej elastyczności i możliwości dostosowania się do różnych potrzeb badawczych jest jednym z najbardziej efektywnych rozwiązań analitycznych. HPLC umożliwia analizę szerokiego zakresu analitów, dzięki czemu może być wykorzystywana w badaniach nad różnorodnymi metabolitami izolowanymi z różnych matryc biologicznych. Możliwość wyboru szerokiego spektrum faz stacjonarnych i ruchomych umożliwia optymalizację warunków analizy dla konkretnych związków. To, co jednak jest szczególnie istotne w kontekście celowanej analizy metabolomicznej, to możliwości integracji z różnymi technikami detekcji. Wykorzystanie spektrometrii mas (MS), detekcji UV-Vis czy detekcji fluorescencyjnej (FL) pozwala na uzyskanie bardziej szczegółowych informacji o analizowanych metabolitach, co zwiększa ilość i jakość uzyskiwanych danych. Na szczególną uwagę zasługuje spektrometria mas, której połączenie z technikami separacyjnymi jak HPLC stanowi użyteczne narzędzie w celowanej analizie metabolomicznej. Jedną z głównych zalet spektrometrii mas jest zdolność do precyzyjnej identyfikacji metabolitów. Zastosowanie standardów wewnętrznych i zaawansowanych metod kalibracyjnych umożliwia również bardzo dokładną analizę ilościową. MS stanowi cenną platformę analityczną dla metabolomiki, w tym celowanej analizy metabolomicznej, również ze względu na wysoką czułość i możliwość monitorowania zmian dynamicznych w czasie. Ciągły rozwój spektrometrii mas i wprowadzanie nowych technologii jak połączenie kwadrupola z analizatorem czasu przelotu (ang. *quadrupole time of flight mass spectrometry* QTOF/MS) czy połączenie kwadrupola z analizatorem typu Orbitrap lub

analizatora typu potrójny kwadrupol (ang. *triple quadrupole mass spectrometry*, QqQ/MS) zwiększają możliwości analityczne [14–16].

Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) jest również zaliczana do głównych technik analitycznych wykorzystywanych w metabolomice. Mimo że NMR jest mniej czuły w porównaniu ze spektrometrią mas, liczne cechy NMR, w tym jego wysoka powtarzalność i zdolności ilościowe, nieselektywna i nieinwazyjna natura oraz zdolność do identyfikowania nieznanych metabolitów w złożonych mieszaninach, są często wykorzystywane w badaniach metabolomicznych [17].

Walidacja metody analitycznej jest niezbędnym krokiem, który zapewnia wiarygodność i powtarzalność otrzymywanych wyników. Walidacja to proces ustalania parametrów charakteryzujących sprawność działania i ograniczeń metody oraz sprawdzenie jej przydatności do określonych celów. Podczas wykonywania walidacji należy określić, które parametry charakteryzujące metodę powinny być wyznaczone, wyznaczyć wartości tych parametrów i na tej podstawie określić czy metoda spełnia stawiane jej wymagania związane z zamierzonym zastosowaniem wyników analitycznych. W efekcie wykonania walidacji można uzyskać pewność, że proces analizy przebiega w sposób rzetelny i precyzyjny oraz daje wiarygodne wyniki. Walidację wykonujemy zarówno gdy opracowywana jest nowa metoda analityczna, jak i wtedy gdy prowadzone są próby rozszerzenia zakresu stosowalności znanej metody analitycznej (np. do oznaczania znanego analitu do próbek o innej matrycy), gdy kontrola jakości stosowanej metody wykazała zmienność jej parametrów w czasie lub dana metoda analityczna ma być wykorzystywana w innym laboratorium. Proces walidacji obejmuje ocenę różnych parametrów, takich jak: specyficzność/selektywność, precyzja (powtarzalność i odtwarzalność), dokładność, zakres metody, liniowość, granica wykrywalności, granica oznaczalności czy stabilność metody. Zakres walidacji jest ściśle związany z naturą oraz celem konkretnej metody analitycznej. Należy zauważyć, że im więcej parametrów walidacyjnych poddaje się ocenie, tym wyższa będzie wiarygodność proponowanej procedury analitycznej. Istnieje wiele wytycznych dotyczących ustalania parametrów walidacyjnych, z których najczęściej wykorzystywane to zalecenia Agencji Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration* FDA) oraz Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicine Agency* EMA) [18,19].

Wyniki przeprowadzonych analiz ilościowych prowadzą do powstania zestawienia danych, które zawiera stężenia zidentyfikowanych związków. Bardzo istotnym uzupełnieniem tych danych są wyniki z ocen klinicznych, analiz laboratoryjnych oraz badań histopatologicznych, które w połączeniu tworzą często skomplikowane zbiory informacji,

wymagające zastosowania zaawansowanych technik statystycznych. Analiza danych jest procesem wieloetapowym, obejmującym odpowiednie przygotowanie danych poprzez zastosowanie np. normalizacji czy skalowania. Kolejne etapy obejmują zastosowanie analiz jednowymiarowych umożliwiających wstępne wskazanie istotnych statystycznie metabolitów lub sygnałów analitycznych o największym potencjale klasyfikacyjnym w odniesieniu do porównywanych grup. Zgromadzone dane, zawierające zarówno informacje ilościowe, jak i jakościowe, wymagają zastosowania statystycznych analiz wielowymiarowych. Analizy te umożliwiają jednoczesne badanie wielu zmiennych w kontekście badanych czynników, co pozwala na identyfikację lub wyjaśnienie relacji między nimi, a tym samym na pełną ocenę i interpretację uzyskanych wyników. Do najczęściej stosowanych testów wielowymiarowych w analizach metabolomicznych należą: analiza głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA), analiza dyskryminacyjna cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. *partial least square discriminant analysis*, PLS-DA), metoda lasów losowych (ang. *random forest*, RF), regresja liniowa i logistyczna, czy modelowanie bayesowskie oraz hierarchiczne [20–22].

W rezultacie, celowana analiza metabolomiczna jest złożonym, wieloaspektowym procesem, który wymaga staranności i precyzji na każdym etapie, od wyboru materiału biologicznego po interpretację uzyskanych wyników, co czyni ją potężnym narzędziem w badaniach biologicznych oraz medycznych.

4.1.4. Cele naukowe i omówienie wyników zawartych w cyklu publikacji

Głównym celem badań opisanym w pięciu oryginalnych pracach eksperymentalnych zgłoszonych jako osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym było zastosowanie celowanej analizy metabolomicznej do poszukiwania związków markerowych w chorobach neurologicznych o podłożu autoimmunologicznym (**P1-P3**) oraz w chorobach nowotworowych (**P4-P5**).

Cząstkowe cele w ramach osiągnięcia naukowego obejmowały:

- a) Optymalizację oraz walidację metod analitycznych oznaczania profili aminokwasów z wykorzystaniem chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC-FL) oraz chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją spektrometrii mas (HPLC-MS/MS) (**P1, P2**);
- b) Oznaczenia oraz porównanie profili metabolomicznych aminokwasów u pacjentów z miastenią gravis oraz grupą kontrolną (**P1, P2**);

- c) Oznaczenie oraz porównanie profili metabolomicznych aminokwasów u pacjentów z miastenią gravis, stwardnieniem rozsianym oraz grupą kontrolną (**P3**);
- d) Oznaczenie oraz porównanie profili metabolomicznych związków pterynowych u pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego oraz grupą kontrolną ze szczególnym uwzględnieniem czynników normalizujących stężenie oznaczanych analitów tj. ciężaru właściwego moczu i stężenia kreatyniny (**P4**);
- e) Oznaczenie oraz porównanie profili metabolomicznych aminokwasów u pacjentów z nowotworami ośrodkowego układu nerwowego (oponiak, glejak) oraz grupą kontrolną (**P5**).

Zagadnienia z zakresu poszukiwania nowych wskaźników diagnostycznych w obrębie chorób neurologicznych o podłożu autoimmunologicznym stanowią temat przewodni trzech przedstawionych prac (**P1-P3**).

W pracach **P1-P2** do grupy badanej zakwalifikowano pacjentów ze zdiagnozowaną miastenią gravis (MG). MG jest chorobą autoimmunologiczną, która prowadzi do dysfunkcji złącza nerwowo-mięśniowego [23]. Patogeneza miastenii opiera się na odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko postsynaptycznym elementom złącza nerwowo-mięśniowego. Komercyjne testy – immunoenzymatyczny ELISA lub radioimmunologiczny RIA – pozwalają na identyfikację przeciwciał przeciwko receptorom acetylocholino (anty-AChR-ab) u około 75-80% pacjentów z miastenią, u 5-10% wykrywane są przeciwciała skierowane przeciwko kinazie swoistej dla mięśni (anty-MuSK-ab), natomiast przeciwciała przeciw białku związanemu z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości (anty-LRP4-ab) stwierdza się u 20-30% uprzednio podwójnie seronegatywnych (niewykrywalne przeciwciała anty-AChR-ab ani antyMUSK-ab). Rzadko celami ataku immunologicznego w miastenii są inne białka kluczowe dla sformowania struktury przestrzennej i utrzymania funkcji złącza nerwowomięśniowego, tj. agryna, LRP4 czy rapsyna. Zakłócenie normalnej komunikacji między nerwami i mięśniami powoduje zmienne osłabienie różnych grup mięśniowych [24].

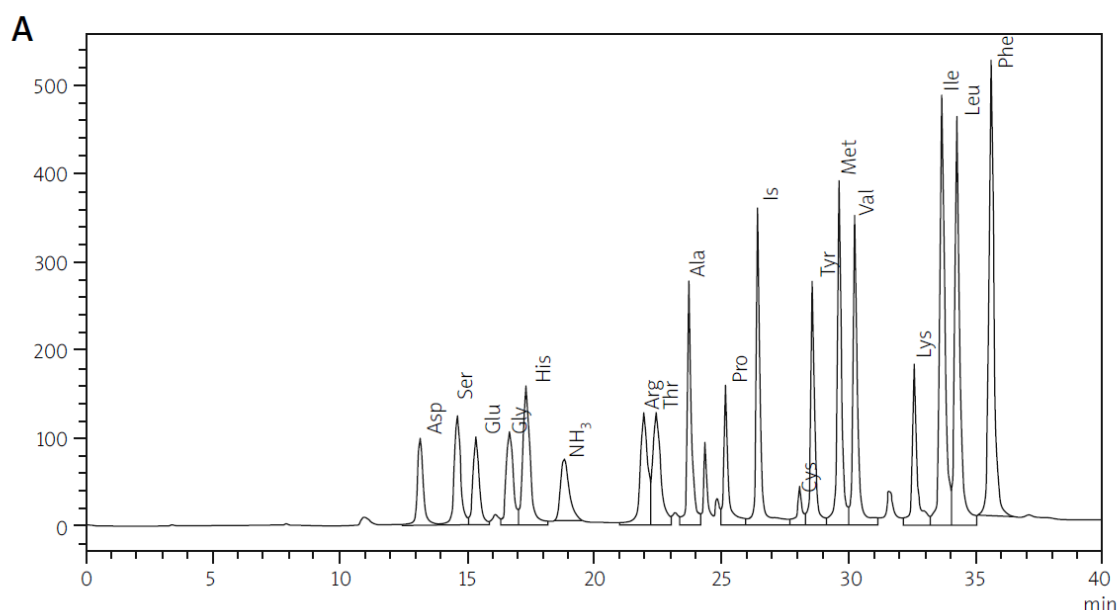
Biomarkery obecnie stosowane w MG należą przede wszystkim do kategorii diagnostycznej. Wykrywanie przeciwciał przeciwko receptorowi acetylocholino (AChR) lub przeciwciała przeciwko swoistej kinazie tyrozyn (MuSK) jest wysoce specyficzne dla potwierdzenia rozpoznania MG. Jednak dostępne dane wskazują, że około 15% pacjentów z uogólnioną postacią MG i 50% pacjentów z typem ocznym pozostaje seronegatywnych zarówno dla AChR, jak i MuSK. Ponadto poziomy klinicznie stosowanych biomarkerów MG nie korelują z ciężkością choroby lub odpowiedzią kliniczną [25]. Ze względu na fakt, że

stosowane metody diagnostyczne nie są rozstrzygające i zadowalające w przypadku MG, zwłaszcza we wczesnych stadiach, konieczne jest opracowanie niezawodnych narzędzi, które pomogą zdiagnozować MG tak wcześnie, jak to możliwe [26].

Metabolomika oferuje możliwości identyfikacji potencjalnych markerów związanych z postępem choroby i odpowiedzią na leczenie złożonych chorób neurologicznych [27]. Zainteresowanie aminokwasami (AA) jako potencjalnymi biomarkerami MG wynika z ich roli w procesie autoimmunizacji i zaburzeniach w budowie białek mięśniowych. Obecne dane sugerują, że komórki immunoregulacyjne mogą odgrywać znaczącą rolę w patogenezie MG. Aminokwasy są ważne w funkcjonowaniu m.in komórek T, a ich zaburzony metabolizm może być powiązany z autoimmunizacją. Profilowanie metaboliczne aminokwasów ma wiele potencjalnych zastosowań. Prowadzone badania skupiają się na ich wykorzystaniu w badaniach przesiewowych, diagnostyce i monitorowaniu leczenia. Ostatnie badania wskazują, że analiza profili aminokwasów może być potencjalnym markerem wspomagającym diagnostykę takich grup chorób, jak choroby neurodegeneracyjne [28], choroba Alzheimera [29], choroba Parkinsona [30], choroby autoimmunologiczne [31] i nowotwory [32].

Celem badań opisanych w publikacji **P1** było porównanie profilu aminokwasów pacjentów z MG o różnym stopniu zaawansowania choroby z grupą kontrolną. Do badania włączono pacjentki konsultowane w Neurologicznej Poradni Ambulatoryjnej z rozpoznaniem MG. MG rozpoznano na podstawie cech klinicznych (zmienne, męczliwe osłabienie mięśni oczu i/lub mięśni zewnątrz gałkowych) oraz co najmniej jednego z następujących kryteriów: dodatni wynik testu na obecność autoprzeciwciał AChR lub MuSK, badania elektrofizjologiczne potwierdzające dysfunkcję postsynaptycznego złącza nerwowo-mięśniowego (powtarzająca się stymulacja i/lub elektromiografia pojedynczego włókna) oraz odpowiedź kliniczna na inhibitory cholinoesterazy. Średni czas trwania choroby w grupie badanej wynosił $9,6 \pm 5,7$ roku. Biorąc pod uwagę typ kliniczny choroby, wszystkie pacjentki sklasyfikowano jako uogólnioną postać MG. Autoprzeciwciała przeciwko AChR wykryto u 7 pacjentek, a pozostałe 3 sklasyfikowano jako podwójnie seronegatywne (ujemny wynik testu na obecność przeciwciał anty-AChR i anty-MuSK). Nieprawidłowości grasicy wykryto u 4 pacjentek. U żadnej z osób w grupie badanej nie zdiagnozowano grasiczaka.

U pacjentek oznaczono profil stężeniowy 17 aminokwasów (Ryc. 1).



Ryc. 1. Chromatogram przedstawiający rozdział aminokwasów metodą HPLC-FL: kwas asparaginowy (Asp), seryna (Ser), kwas glutaminowy (Glu), glicyna (Gly), histydyna (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), cysteina (Cys), tyrozyna (Tyr), walina (Val), metionina (Met), lizyna (Lys), izoleucyna (Ile), leucyna (Leu), fenyloalanina (Phe).

Zoptymalizowana przeze mnie metodyka przygotowania próbki do oznaczania profilu aminokwasów obejmowała odbiałczanie oraz derywatyzację. Do odbiałczania zastosowałem kolumnienki Phree Phospholipid Removal Solutions z zestawem do ekstrakcji fazy stałej. Tak przygotowane próbki poddawałem procedurze derywatyzacji zgodnie z metodą Waters AccQ Tag, a następnie analizowałem z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją fluorescencyjną.

Rezultatem przeprowadzonych badań była identyfikacja znaczących różnic w stężeniach dwóch aminokwasów endogennych u pacjentów z MG w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenia kwasu asparaginowego (Asp) oraz kwasu glutaminowego (Glu) były istotnie wyższe u pacjentów z MG w porównaniu do grupy kontrolnej.

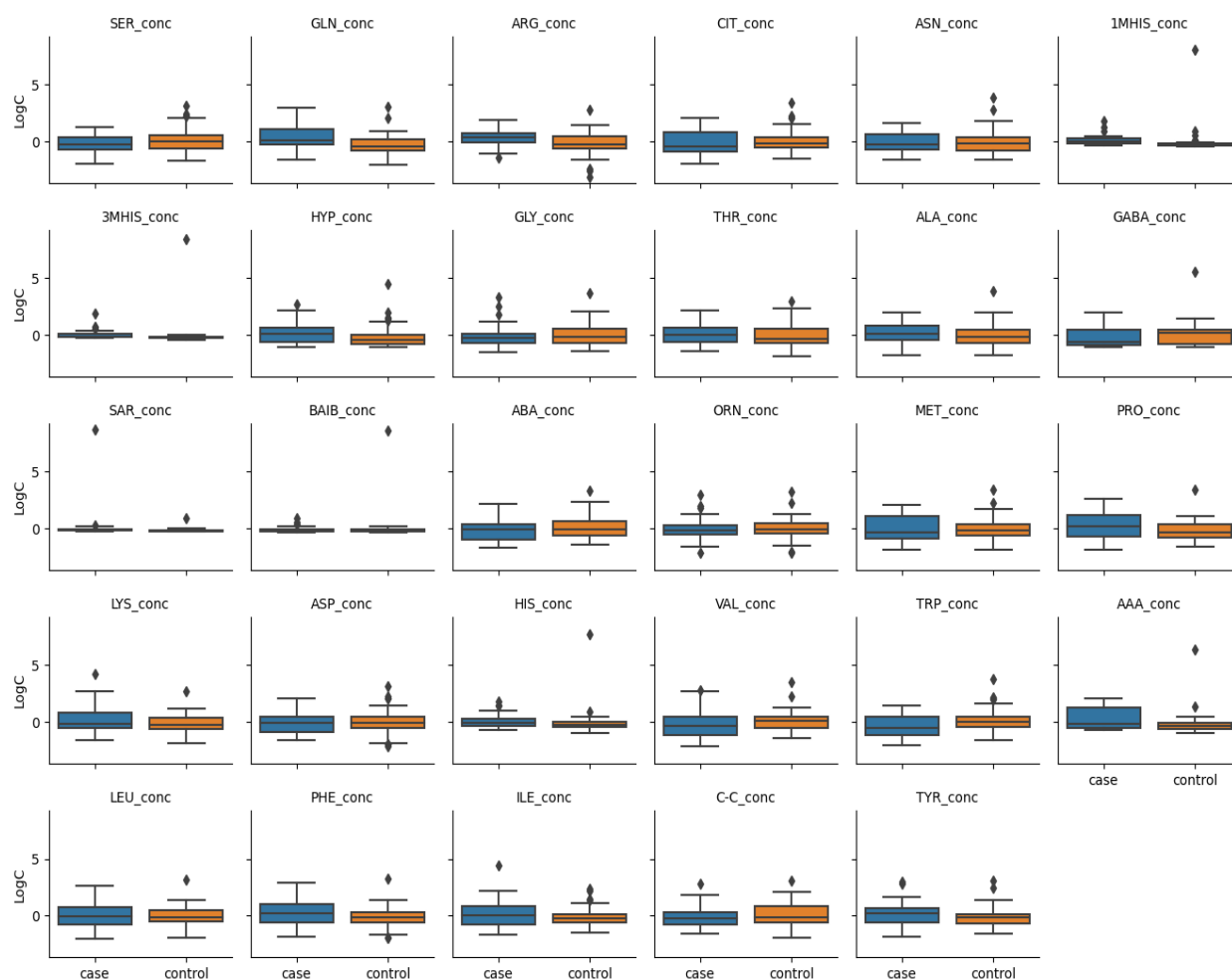
Publikacja **P1** stanowi przykład badań wstępnych. Kontynuacją opisanego celowanego podejścia metabolomicznego do poszukiwania związków markerowych w chorobach neurologicznych o podłożu autoimmunologicznym są badania opisane w publikacjach stanowiących osiągnięcie habilitacyjne **P2** oraz **P3**.

W badaniach opisanych w publikacji **P2** zastosowałem wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z detekcją spektrometrii mas (HPLC-MS/MS) oraz badania statystyczne, aby zidentyfikować zmiany w stężeniach aminokwasów u pacjentów z miastenią gravis w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo przeanalizowałem potencjalny wpływ różnych schematów leczenia, stanu klinicznego oraz typów MG na zaobserwowane zmiany w profilach aminokwasowych. Do badania zakwalifikowano łącznie 81 uczestników, podzielonych na dwie grupy: 53 zdrowych ochotników bez historii chorób autoimmunologicznych, stanowiących grupę kontrolną, oraz 28 pacjentów z uogólnioną lub oczną postacią miastenii, tworzących grupę badaną. Przygotowanie próbek biologicznych do analizy aminokwasów obejmowało ekstrakcję do fazy stałej, po której następowała derywatyzacja oraz ekstrakcja ciecz-ciecz. Analizę aminokwasów w surowicy przeprowadziłem za pomocą chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas LCMS-8045, z potrójnym kwadrupolem i jonizacją elektrorozpylaniem (ESI) w trybie dodatnim. Metoda analityczna, którą zastosowałem, została uprzednio przeze mnie zoptymalizowana i poddana walidacji. Opracowanie optymalnych warunków analizy przy użyciu spektrometru mas obejmowało określenie jonów macierzystych i fragmentacyjnych. Jako wzorce wewnętrzne zastosowałem homoargininę (HARG), metioninę-d3 (Met-d3) oraz homofenyloalaninę (HPHE) w zależności od czasu elucji analizowanych aminokwasów. Tabela 1 zawiera podsumowanie analizowanych aminokwasów metodą HPLC-MS/MS.

Tabela 1. Zestawienie aminokwasów analizowanych metodą HPLC-MS/MS. Tabela wykonana na podstawie P2.

L.p.	Nazwa związku	Skrót	L.p.	Nazwa związku	Skrót
1.	Seryna	SER	16.	Kwas α -aminomasłowy	ABA
2.	Glutamina	GLN	17.	Ornityna	ORN
3.	Arginina	ARG	18.	Metionina	MET
4.	Cytrulina	CIT	19.	Metionina-d3	Met-d3 (IS)
5.	Homoarginina	HARG (IS)	20.	Prolina	PRO
6.	Asparagina	ASN	21.	Lizyna	LYS
7.	1-metylo-L-histydyna	1MHIS	22.	Kwas asparaginowy	ASP
8.	3-metylo-L-histydyna	3MHIS	23.	Histydyna	HIS
9.	4-hydroksypolina	HYP	24.	Walina	VAL
10.	Glicyna	GLY	25.	Kwas glutaminowy	GLU
11.	Treonina	THR	26.	Tryptofan	TRP
12.	Alanina	ALA	27.	Kwas α -aminoadypinowy	AAA
13.	Kwas gamma-aminomasłowy	GABA	28.	Leucyna	LEU
14.	Sarkozyna	SAR	29.	Fenylalanina	PHE
15.	Kwas beta-aminoizomasłowy	BAIB	30.	Izoleucyna	ILE

Porównanie profili stężeńowych aminokwasów między pacjentami z miastenią a grupą kontrolną umożliwiło identyfikację aminokwasów, które statystycznie istotnie różnicowały obie grupy. Do aminokwasów, które wykazały istotne różnice przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$, zaliczono GLN, ARG, 1MHIS, 3MHIS, HYP oraz SAR (Ryc. 2).



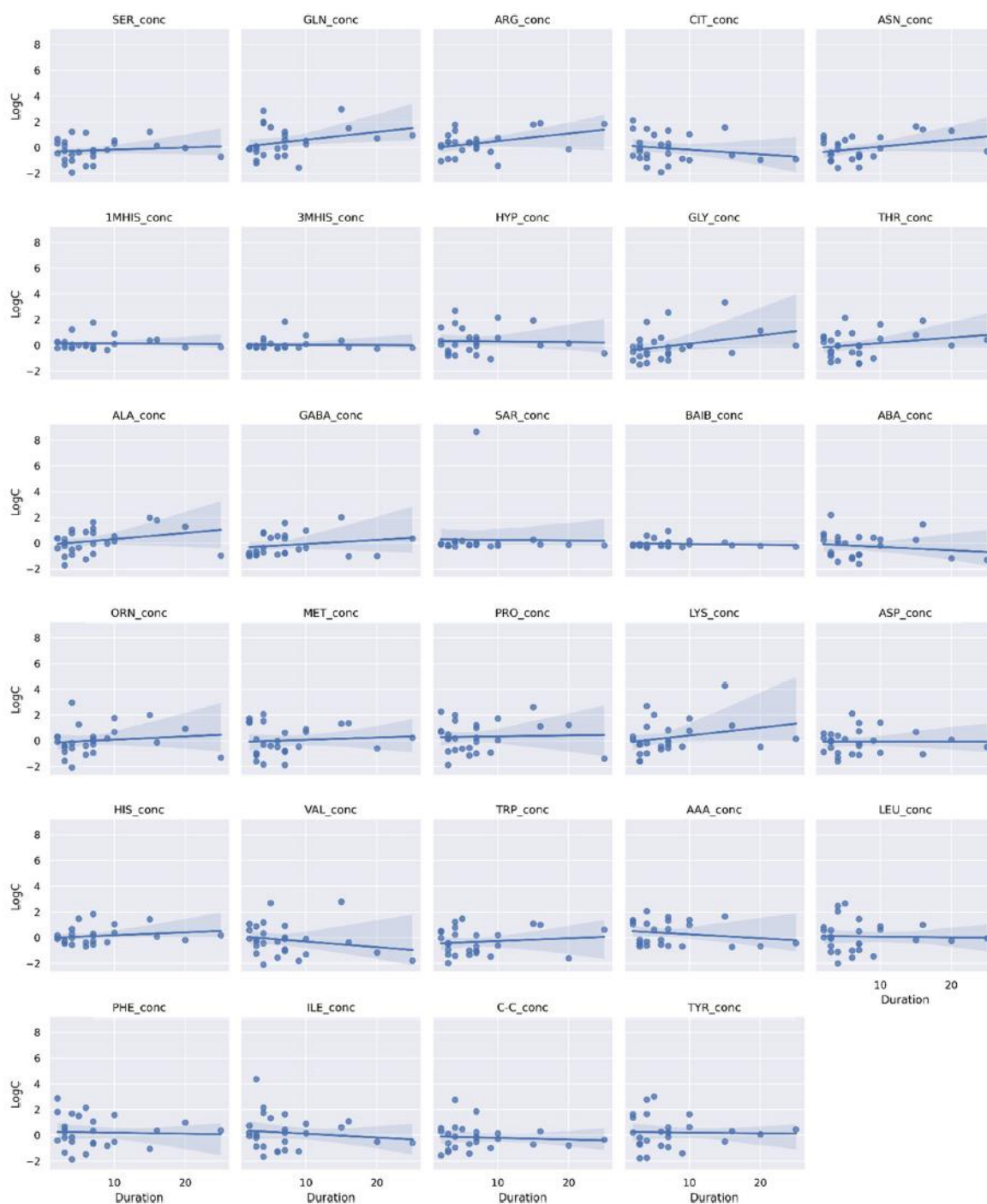
Ryc. 2. Porównanie stężenia profili aminokwasów pomiędzy pacjentami z miastenią (MG) (kolor niebieski) i grupą kontrolną (kolor pomarańczowy). Rycina wykonana na podstawie **P2**.

Zaobserwowane różnice w stężeniach glutaminy u pacjentów z MG w porównaniu do grupy kontrolnej mogą być spowodowane zmianami w tkance mięśniowej oraz aktywnością układu odpornościowego. Glutamina jest ściśle związana z tkanką mięśni szkieletowych, która jest głównym miejscem jej gromadzenia, syntezy i uwalniania. W związku z tym mięśnie szkieletowe odgrywają kluczową rolę w metabolizmie glutaminy [33]. Ponadto, metabolizm glutaminy jest istotny dla produkcji energii w proliferujących komórkach, w tym komórkach T [31]. Zarówno badania *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, że glutamina jest niezbędnym składnikiem odżywczym dla proliferacji limfocytów, produkcji cytokin, a także dla aktywności fagocytarnej i wydzielniczej makrofagów. Szczególnie istotna w kontekście autoimmunizacji jest rola glutaminolizy w produkcji prozapalnych limfocytów T, takich jak Th1 i Th17 [34,35].

Arginina, której stężenie w badaniu **P2** pozwoliło na różnicowanie grupy badanej od grupy kontrolnej, odgrywa istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej. Biorąc udział w syntezie związków niebiałkowych, takich jak tlenek azotu (NO) i poliaminy, arginina wpływa na rozszerzenie naczyń krwionośnych, uwalnianie wapnia, neurotransmisję oraz odpowiedź immunologiczną. Choć zakłada się, że arginina bierze udział w różnych fizjologicznych i patologicznych reakcjach immunologicznych, szczegóły molekularne tych procesów nie są jeszcze w pełni zrozumiałe [36]. Istnieją jednak dowody naukowe potwierdzające kluczową rolę mechanizmów zależnych od tlenku azotu w wielu chorobach autoimmunologicznych i przewlekłych stanach zapalnych. Uwalnianie dużych ilości NO, silnego środka prozapalnego, poprzez aktywację NOS2, może nasilać stan zapalny. Badania nad autoimmunologicznymi chorobami demielinizacyjnymi, takimi jak stwardnienie rozsiane, wykazały obecność wolnych rodników tlenowych i azotowych w płynie mózgowo-rdzeniowym [37].

Zastosowanie poprawki Bonferroniego dla wielokrotnych testów, umożliwiło identyfikację dwóch aminokwasów pochodzących z histydyny (1MH i 3MH) jako najbardziej istotnie różnicujących pacjentów z MG od grupy kontrolnej pod względem istotności statystycznej. L-Histydyna (HIS) jest aminokwasem względnie egzogennym, charakteryzującym się szerokim zakresem właściwości biochemicznych i fizjologicznych. 3-metylohistydyna (3MH) powstaje w wyniku potranslacyjnej modyfikacji reszt histydyny i jest obecna w aktynie oraz miozynie jako element białek miofibrylarnych. Obecność wolnej 3MH w organizmie jest wynikiem m.in. rozpadu tych białek. Ponieważ 3MH nie jest metabolizowana ani ponownie wykorzystywana do syntezy białek, uznaje się ją za nieinwazyjny marker katabolizmu białek miofibrylarnych [38,39]. Wzrost szybkości rozpadu białek miofibrylarnych jest obserwowany w różnych patologiach związanych z zanikiem mięśni (dystrofia mięśniowa Duchenne'a, dystrofia mięśniowa Beckera) [40].

Kolejnym etapem projektu było zbadanie, czy można zaobserwować zależność między stężeniem aminokwasów a wiekiem pacjentów z MG, czasem trwania choroby, jej podtypem, metodami klasyfikacji oraz stosowanymi terapiami. Badanie zmian stężeń aminokwasów w kontekście długości trwania miastonii ujawniło widoczny wzrost poziomów GLN, ARG i ASN wraz z czasem trwania choroby. Z kolei stężenie CIT wykazało niewielką tendencję spadkową. Należy zaznaczyć, że ze względu na ograniczoną liczbę badanych próbek i rozpiętość pomiarów, przedziały ufności wokół linii regresji są szerokie (Ryc. 3).

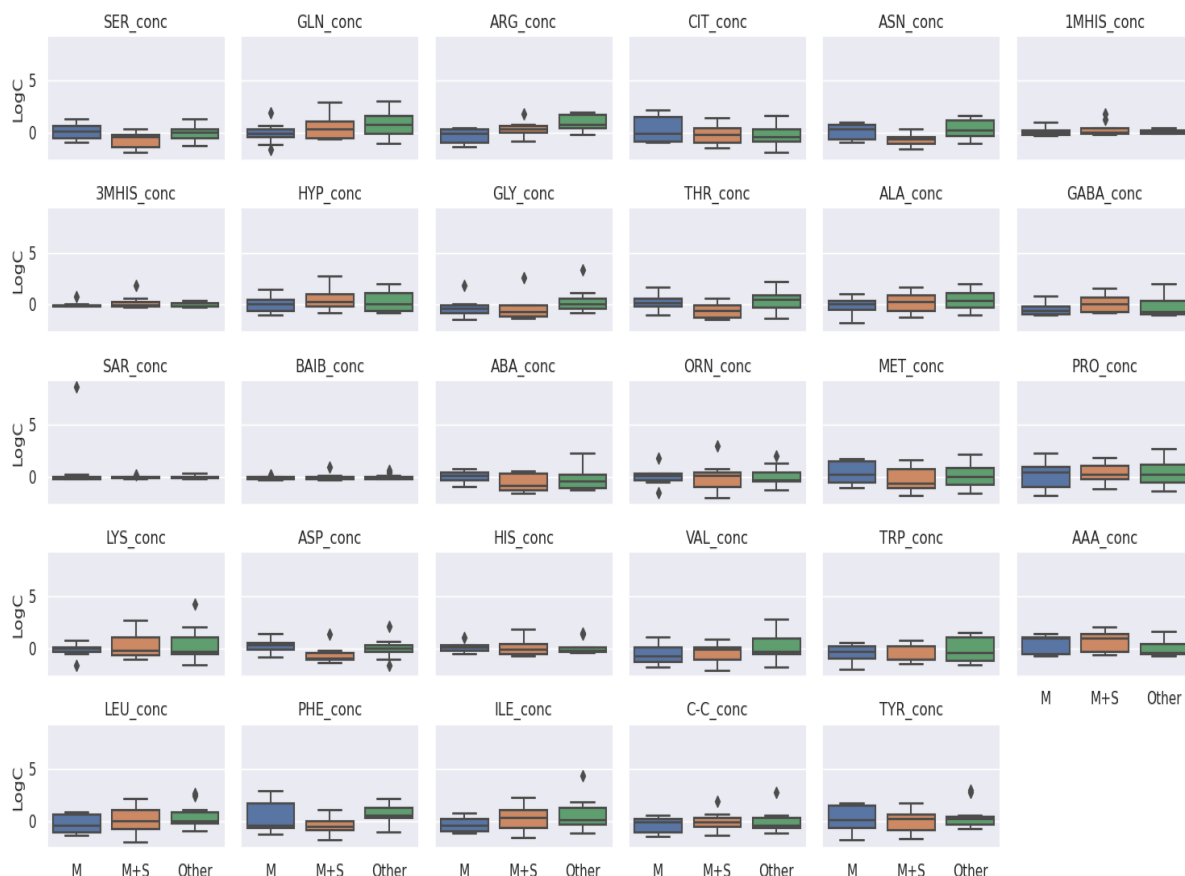


Ryc. 3. Stężenie aminokwasów u pacjentów z miastenią w odniesieniu do czasu trwania choroby. Niebieska linia przedstawia linię regresji liniowej. Rycina wykonana na podstawie P2.

Pomimo znaczących różnic w liczebności pacjentów z MG zakwalifikowanych do grupy z postacią uogólnioną i oczną, uwagę zwracają istotne różnice w profilach stężeńowych dotyczące dwóch aminokwasów: ABA ($p = 0,025$) i AAA ($p = 0,024$) w analizowanych grupach.

Przeprowadzone porównanie profili aminokwasów między poszczególnymi grupami w grupie badanej według klasyfikacji MGFA (ang. Gravis Foundation of America) wskazało na niewielkie różnice w stężeniach aminokwasów między tymi grupami, lecz analiza post hoc nie ujawniła różnic istotnych statystycznie. Klasyfikacja kliniczna opracowana przez MGFA dzieli miastenię na główne kategorie i różnorodne podkategorie, co pozwala na wyodrębnienie podgrup pacjentów z różnymi cechami klinicznymi lub stopniem zaawansowania choroby, co wspomaga przewidywać m.in. rokowanie czy odpowiedź na leczenie.

W badaniu **P2** podjęto próbę zidentyfikowania aminokwasów reagujących na terapię, które mogłyby pełnić rolę biomarkerów efektywności leczenia lub skutków ubocznych. Analiza post hoc ujawniła różnice w poziomach ARG między pacjentami stosującymi wyłącznie pirydostygminę (mestinon, M) a tymi, którzy otrzymywali terapię sklasyfikowaną jako „Inne”, zawierającą mestinon, steroidy i inne leki, takie jak azatiopryna czy cyklofosfamid. Uzyskane wyniki ujawniły także różnice między leczeniem mestinonem ze steroidami (M + S) a terapiami obejmującymi dodatkowe leki immunosupresyjne dotyczące aminokwasu ASN ($p = 0,044$) (Ryc. 4).



Ryc. 4. Stężenia aminokwasów u pacjentów z miastenią według schematu leczenia. Na osi x przedstawiono 3 kategorie: „M”, „M + S”, „Inne”. „M” oznacza leczenie mestinonem, „M + S” oznacza leczenie mestinonem + sterydem, a „Inne” to leczenie składające się z mestinonu, sterydu i innych leków, takich jak azatiopryna, mykofenolan mofetylu, cyklofosfamid, metotreksat. Rycina wykonana na podstawie **P2**.

W badaniu nie wykryto różnic w poziomach AA w kontekście danych klinicznych, takich jak obecność lub brak grasicy, przeprowadzenie tymektomii, występowanie grasiczaka czy obecność przeciwciał przeciwko receptorom AChR.

W porównawczej analizie metabolomicznej bardzo ważne jest uwzględnienie zarówno grupy pacjentów i grupy kontrolnej osób zdrowych, jak i porównanie profili metabolicznych pacjentów z tej samej grupy chorób. Taki sposób analizy umożliwia identyfikację bardziej specyficznych zmian towarzyszących określonym jednostkom chorobowym. Dlatego celem kolejnego badania opisanego w pracy **P3**, będącej elementem osiągnięcia habilitacyjnego, było wykorzystanie przeze mnie HPLC-MS/MS w połączeniu z wielowymiarową analizą danych do porównania profili metabolicznych aminokwasów u pacjentów ze zdiagnozowanym

stwardnieniem rozsianym (SM) oraz miastenią gravis (MG) w celu identyfikacji możliwych specyficznych zmian profili aminokwasów.

Mechanizmy autoimmunologiczne są związane zarówno z rozwojem MG, jak i SM. Choroby te charakteryzują się stanem zapalnym oraz deregulacją układu immunologicznego. Mimo różnic w patologiach SM i MG, można dostrzec pewne podobieństwa immunologiczne. Uważa się, że zarówno rozwój SM, jak i MG w znacznym stopniu zależą od limfocytów T [41]. Chociaż główną przyczyną rozwoju MG są autoprzeciwciała przeciwko receptorom acetylocholino w złączy nerwowo-mięśniowym, mechanizm odpowiedzi autoimmunologicznej może być inicjowany przez aktywację limfocytów T. Alternatywnie, chociaż w stwardnieniu rozsianym pośredniczą głównie limfocyty T, istnieją dowody na to, że komórki B i przeciwciała autoreaktywne również odgrywają rolę w patogenezie stwardnienia rozsianego [42]. Mimo że SM i MG są różnymi chorobami autoimmunologicznymi, ich wspólne występowanie jest obserwowane. Dodatkowo, nakładanie się niektórych objawów, zwłaszcza opuszkowych i ocznych, w których MG i SM mogą się nawzajem naśladować, może prowadzić do niedoszacowania częstości ich współwystępowania [42]. W szczególności dwa wczesne objawy choroby – zmęczenie i podwójne widzenie – wymagają ostrożności przy diagnozowaniu choroby podstawowej. Jest to szczególnie istotne w kontekście wczesnych objawów SM, gdy może występować brak lub tylko pojedyncza zmiana demielinizacyjna w mózgu i/lub rdzeniu kręgowym, a także istniejące przeciwwskazania do wykonania nakłucia lędźwiowego. Dodatkowo, wraz ze wzrostem częstości występowania późno ujawniającej się MG, u pacjentów mogą pojawiać się ogniska uszkodzeń naczyniowych w ośrodkowym układzie nerwowym, które mogą być trudne do odróżnienia od zmian demielinizacyjnych. W takich sytuacjach pacjenci są szczególnie narażeni na błędną diagnozę, a posiadanie markera obwodowego, który pozwala odróżnić MG od SM, może stanowić istotne wsparcie dla lekarzy [43].

Zainteresowanie aminokwasami w SM podobnie jak w MG wynika z ich roli w procesie autoimmunologicznym. AA są ważne dla funkcjonowania limfocytów T, a ich zaburzony metabolizm może być związany z procesem autoimmunizacji [44–46]. Dostępne dane literaturowe wskazują, że obserwowane nieprawidłowości w szlakach metabolicznych AA mogą być związane z różnymi aspektami klinicznymi (tj. etiologią, patogenezą, diagnostyką, rokowaniem i leczeniem) zarówno stwardnienia rozsianego [47–49], jak i miastennii [50].

W badaniu opisanym w publikacji **P3** porównując profile aminokwasowe pacjentów z chorobami neurologicznymi o podłożu autoimmunologicznym (MG, MS) z grupą kontrolną, zaobserwowałem statystycznie istotne różnice w stężeniach aminokwasów, takich jak ARG,

CIT, 1MHIS, ABA, PRO oraz TRP. Spośród nich cztery aminokwasy: ARG, PRO, TRP oraz CIT zachowały istotność po zastosowaniu korekty Bonferroniego dla wielokrotnych testów. Spośród zidentyfikowanych AA arginina i tryptofan wydają się szczególnie interesujące ze względu na ich udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej [51]. Arginina, uczestnicząc w syntezie związków niebiałkowych, takich jak tlenek azotu lub poliaminy, odgrywa ważną rolę w rozszerzeniu naczyń krwionośnych, uwalnianiu wapnia, neurotransmisji i odpowiedzi immunologicznej. Wyniki badań wskazują na ważną rolę procesów zależnych od NO zarówno w chorobach autoimmunologicznych, jak i przewlekłym zapaleniu. Zwiększenie ilości NO w organizmie wiąże się z zaostrzeniem stanu zapalnego. Katabolizm ARG zachodzi poprzez wiele ścieżek, w tym degradację przez iNOS do tlenku azotu (NO) i CIT, a także degradację za pośrednictwem arginazy w celu wytworzenia PRO, mocznika, ornityny i poliamin. Dlatego stwierdzone wyższe stężenia ARG i PRO w surowicy przy niższym stężeniu CIT mogą wskazywać na przesunięcie metabolizmu ARG w kierunku zmniejszonej degradacji przez iNOS [52].

Porównując stężenia aminokwasów u pacjentów z SM i MG, zidentyfikowałem trzy aminokwasy (CIT, GABA i AAA), których stężenia różnicowały badane grupy po zastosowaniu korekty Bonferroniego. Wyższe stężenia tych aminokwasów zaobserwowałem w grupie pacjentów z miastenią. Wiedza na temat funkcji kwasu α -aminoadypinowego (AAA), który różnicuje grupy pacjentów z SM i MG, oraz potencjalnych mechanizmów łączących AAA z procesami chorobowymi, jest ograniczona. AAA powstaje w wyniku rozpadu lizyny i jest metabolizowany głównie w mitochondriach. Strukturalnie przypomina glutaminian, a badania na modelach zwierzęcych wykazały, że zmniejsza wychwyt glutaminianu. AAA indukuje produkcję reaktywnych form tlenu i azotu, peroksydację lipidów oraz utlenianie białek, osłabiając obronę antyoksydacyjną. Zaburzenia neurotransmisji glutaminergicznej i homeostazy redoks związane z AAA mogą wpływać na objawy neurologiczne, obserwowane w kwasicy α -ketoadypinowej [53]. Wyniki badania opisane w publikacji **P3** wskazują również na obniżone stężenie CIT u pacjentów z SM w porównaniu do pacjentów z MG. Badania Rzepińskiego i wsp. potwierdziły niższy poziom CIT u pacjentów z SM w porównaniu z grupą kontrolną, co może być związane z zaburzeniami metabolizmu Arg [48]. Obniżony poziom Arg u pacjentów z SM w porównaniu do MG może potwierdzać tę hipotezę. Warto również zauważyć, że demielinizacja w stwardnieniu rozsianym może prowadzić do zwiększonego uwalniania CIT z mózgu do krwiobiegu [54]. Innym aminokwasem, który umożliwił statystycznie istotne zróżnicowanie grupy pacjentów z SM od MG, jest kwas gamma-aminomasłowy (GABA). Wyniki badania **P3** wskazują na wyższe stężenia GABA u pacjentów

z MG w porównaniu do pacjentów z SM. GABA pełni rolę głównego neuroprzekaźnika hamującego w ośrodkowym układzie nerwowym, bezpośrednio odpowiadając za regulację napięcia mięśniowego. Ponadto, GABA działa jako modulator układu odpornościowego [55]. Obniżony poziom GABA w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z SM w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych osób został również potwierdzony w innych badaniach [49,56]. W celu porównania jednorodnych grup pod kątem zaawansowania choroby SM w kolejnym etapie badania **P3** pacjentów podzieliłem na trzy główne typy zdefiniowane na podstawie stopnia zaawansowania choroby (RRMS - rzutowo-remisyjne stwardnienie rozsiane; SPMS - wtórnie postępujące stwardnienie rozsiane; PPMS - pierwotnie postępujące stwardnienie rozsiane). Badaniem objąłem również pacjentów z uogólnioną postacią miastonii (GMG). Następnie oceniłem, czy występują różnice w ogólnych stężeniach AA w zależności od podtypu SM i MG. Analiza post hoc ujawniła istotne różnice stężeń AA pomiędzy:

- I. PPMS (n=26) i RRMS (n=41) ($p=0,008$)
- II. PPMS (n=26) i GMG (n=25) ($p=0,03$)
- III. RRMS (n=41) i GMG (n=25) ($p=0,00001$)
- IV. SPMS (n=55) i GMG (n=25) ($p=0,0008$)

Szczególnie interesujące pod kątem klinicznym jest porównanie pacjentów w grupie GMG z grupą RRMS. Zazwyczaj SM zaczyna się od początkowego rzutowo-remisyjnego etapu. RRMS i MG mają wiele podobieństw, w tym rzutowy przebieg z szerokim zakresem objawów klinicznych, predyspozycje genetyczne i korzystną odpowiedź na przeciwciała monoklonalne lub inne formy terapii immunosupresyjnych. Co godne uwagi, potencjalny przebieg kliniczny, charakteryzujący się spontaniczną lub wywołaną steroidami regresją deficytów neurologicznych, może komplikować wstępną diagnostykę różnicową obu chorób. Dlatego też identyfikacja biomarkera, który może różnicować te schorzenia, byłaby wysoce korzystna. Do aminokwasów istotnie statystycznie różnicujących obie grupy zakwalifikowano 1MHIS, 3MHIS, HYP, AAA i PHE. Po korekcie Bonferroniego (skorygowana wartość $p = 0,0017$) 3MHIS spełniała reguły istotności statystycznej wykazując wyższe stężenia w grupie pacjentów z MG ($p=0,00015$). Wcześniejsze badania będące elementem osiągnięcia habilitacyjnego opisanego w publikacji **P2**, potwierdziły wyższe stężenie 3MHIS u pacjentów z MG w porównaniu z grupą kontrolną, co może być związane np. z rozpadem białek miofibrilarnych [38].

Można ocenić, że wspólna patogeneza MS i MG związana z podłożem autoimmunologicznym, zaangażowaniem limfocytów T i B oraz nakładaniem się wybranych

objawów klinicznych może w pewnych sytuacjach klinicznych powodować trudności w diagnostyce różnicowej obu chorób. Jednocześnie identyfikacja zmian w metabolizmie AA w SM i MG pozwala określić, które z nich są bardziej prawdopodobnie związane z chorobami autoimmunologicznymi złącza nerwowo-mięśniowego, a które z ośrodkowym układem nerwowym. Wykazane różnice w poziomach AA mogą wynikać z ich udziału w odpowiedzi immunologicznej, procesach neurodegeneracyjnych oraz zmianach w budowie białek mięśniowych. Przyjęty kierunek badań wykorzystania profilowania aminokwasów w MG pozwolił na obserwację istotnych zmian w oznaczanych związkach. Proponowane podejście wymaga dalszych prac, uwzględniając większą grupę badawczą oraz ograniczając możliwe czynniki zakłócające, w celu skorelowania wyników poprzednich badań z możliwymi innymi autoimmunologicznymi chorobami neurologicznymi.

Dwa kolejne opracowania, stanowiące część osiągnięcia habilitacyjnego, koncentrują się na zastosowaniu narzędzi metabolomicznych w diagnostyce onkologicznej, w tym w diagnozowaniu nowotworów pęcherza moczowego (**P4**) oraz nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (**P5**).

Przeprowadzone w ramach osiągnięcia habilitacyjnego badania opublikowane w pracy **P4** miały na celu ocenę możliwości wykorzystania związków pterynowych w diagnostyce nowotworów pęcherza moczowego ze szczególnym uwzględnieniem roli kreatyniny i ciężaru właściwego moczu jako czynników normalizujących stężenie związków pterynowych w moczu. Ocena możliwości wykorzystania związków pterynowych w diagnostyce nowotworów układu moczowo-płciowego była przedmiotem moich wcześniejszych badań opisanych w rozprawie doktorskiej. Przedstawione wyniki badań w publikacji **P4** dotyczą kontynuacji tych badań i skupiają się na ocenie roli standaryzacji danych stężeniowych.

Materiałem biologicznym wykorzystywanym do oznaczania biomarkerów, w tym związków pterynowych, jest zazwyczaj krew lub mocz. Ze względu na nieinwazyjny charakter pobierania i możliwość uzyskania dużej ilości materiału, mocz wydaje się być lepszym materiałem w diagnostyce przesiewowej. Potencjalnym ograniczeniem w stosowaniu biomarkerów izolowanych z moczu jest konieczność uwzględnienia zależności między ich stężeniem a poziomem nawodnienia pacjenta oraz czasem od ostatniego oddania moczu [57,58]. Kreatynina, która jest produktem ubocznym metabolizmu mięśni, jest stale usuwana z krwi przez nerki, co stało się podstawą jej wykorzystania jako miary rozcieńczenia moczu. Zmiany stężenia kreatyniny, a tym samym jej wydalania, są jednak związane ze zmiennymi, takimi jak wiek, rasa, płeć [59,60], aktywność fizyczna, masa mięśniowa [61], dieta [62], procesy fizjologiczne w tym cykle menstruacyjne [63] i stany patologiczne [64,65]. Obserwacje

te podważają uniwersalność kreatyniny jako czynnika normalizującego stężenie analitów oznaczanych w moczu. Drugim wykorzystywanym parametrem normalizującym stężenie analitów w moczu jest ciężar właściwy moczu (ang. *urine specific gravity*, USG), stosowany jako alternatywny dla kreatyniny czynnik rozcieńczania moczu [66,67]. Choć USG podlega podobnym zmianom jak kreatynina [68], korzyści z jego stosowania wynikają głównie z łatwości wykorzystania za pomocą rutynowych badań moczu. Ponadto USG może wytrzymać wiele cykli zamrażania/rozmarzania i długoterminowe przechowywanie w temperaturze -20°C lub niższej [69]. W analizie badań naukowych pojawiają się pytania, dotyczące wyboru optymalnych parametrów referencyjnych (stężenie kreatyniny vs. ciężar właściwy moczu) w procesie normalizacji stężeń substancji badanych w moczu.

Pteryny stanowią złożoną grupę związków biologicznych, które mają charakterystyczną strukturę pierścieniową. Należą do rodziny heterocyklicznych związków azotowych ze strukturą 2-amino-4-hydroksypterydyny. Różne pochodne związków pterynowych zostały wyizolowane z niemal wszystkich rodzajów organizmów żywych. W naturze pteryny występują w dwóch głównych klasach: tak zwane sprzężone pteryny, które charakteryzują się stosunkowo złożonymi łańcuchami (kwas foliowy i pochodne) oraz niesprężone posiadające krótkie łańcuchy boczne. Oprócz neopteryny (NP) lub tetrahydrobiopteryny (BH₄), które zostały uznane za najważniejsze niesprężone pteryny, istnieją inne ważne pteryny, które zostały wyprowadzone ze szlaku metabolizmu BH₄. Do związków tych zalicza się ksantopterynę, izoksantopterynę, 6,7-dimetylopterynę, 6-biopterynę, pterynę, 6-hydroksymetylopterynę i kwas pteryno-6-karboksylowy [70]. Dostępne dane literaturowe wskazują na możliwość wykorzystania związków pterynowych w diagnostyce onkologicznej. Jednak pomimo wielu obiecujących wyników badań, kliniczna użyteczność związków pterynowych jest nadal przedmiotem dyskusji [71]. Do tej pory nie zidentyfikowano jednoznacznych przyczyn zwiększonego stężenia związków pterynowych u pacjentów onkologicznych.

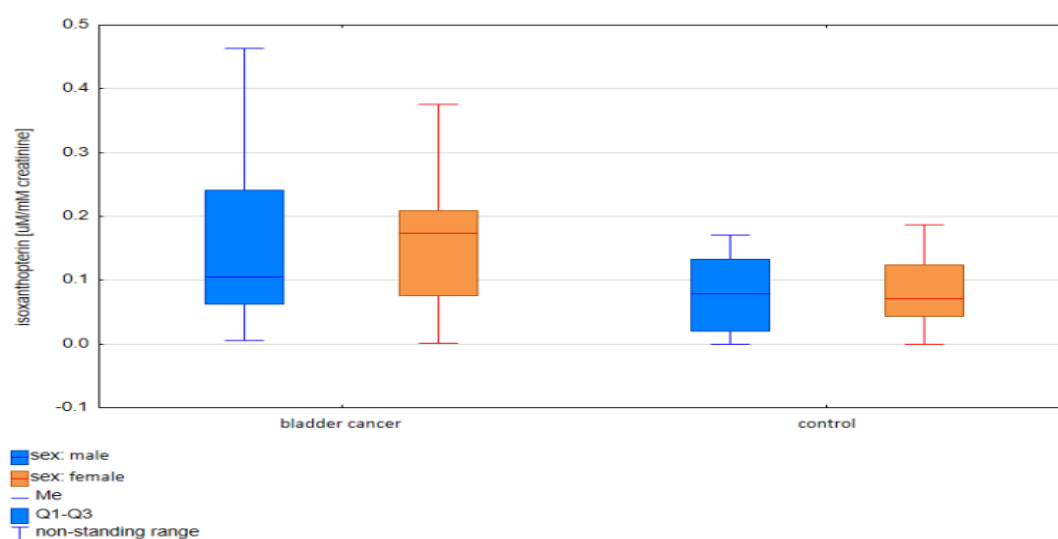
W pracy **P4** uwzględniłem dwie metody standaryzacji stężenia związków pterynowych w moczu:

- I. standaryzacja z wykorzystaniem kreatyniny,
- II. standaryzacja z wykorzystaniem ciężaru właściwego moczu.

Porównanie danych stężeniowych uzyskanych zgodnie z powyższymi metodami standaryzacji wykazało, że wyliczone stężenie związków pterynowych osiągają wyższe wartości w przypadku wykorzystania ciężaru właściwego. Istotnie statystycznie różnice w poziomach wybranych związków pterynowych (kwasu pterynowego ($p = 0,038$), neopteryny ($p = 0,019$))

i biopteryny ($p = 0,044$)) pomiędzy kobietami i mężczyznami w obrębie grupy badanej i grupy kontrolnej zostały zidentyfikowane jedynie w grupie kontrolnej, gdy do normalizacji wykorzystano kreatyninę.

Badanie porównawcze poziomów związków pterynowych między grupą z nowotworem pęcherza moczowego a grupą kontrolną, zarówno bez rozróżnienia płci, jak i z uwzględnieniem podziału na płeć (jak przedstawiono na ryc. 5), ujawniło znacznie wyższe poziomy izoksantopteryny wśród pacjentów z nowotworem, przy zastosowaniu kreatyniny.



Ryc. 5. Porównanie stężenia izoksantopteryny pomiędzy pacjentami z nowotworem pęcherza moczowego a grupą kontrolną standaryzowanych względem kreatyniny. Rycina wykonana na podstawie **P4**.

Jednocześnie zaobserwowałem więcej istotnych statystycznie różnic w poziomach związków pterynowych, gdy ich stężenia były znormalizowane względem ciężaru właściwego moczu (Tabela 2).

Tabela 2. Związki pterynowe wykazujące istotne statystycznie różnice między grupą pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego i grupą kontrolną w przypadku zmiennych standaryzowanych względem ciężaru właściwego moczu. Tabela wykonany na podstawie P4.

Związek	Kobiety Wartość p	Mężczyźni Wartość p
Izoksantopteryna	0,018	0,562
Ksantopteryna	0,066	0,003
Neopteryna	0,030	0,117
Kwas pterynowy	0,043	0,001
Pteryna	0,038	0,030

Zastosowanie wielowymiarowych metod statystycznych (analiza głównych składowych PCA, drzewa klasyfikacyjne) umożliwiło analizę struktury połączeń i współzależności między zmiennymi poprzez redukcję i uproszczenie struktury danych. W ramach analizy PCA, w pierwszym etapie wykorzystano dane stężeniowe związków pterynowych przeliczane na kreatyninę, w drugim etapie dane stężeniowe uzyskane z wykorzystaniem ciężaru właściwego, a w trzecim zestawiono oba typy danych. Uzyskane wyniki nie wykazały wyraźnych skupisk przypadków pozwalających na szerszą interpretację danych. Zastosowanie drzew decyzyjnych umożliwiło modelom klasyfikacyjnym ocenę ryzyka wystąpienia nowotworu pęcherza moczowego na podstawie dostępnych danych. W ocenie efektywności modelu wykorzystano miary takie jak czułość (SEN), swoistość (SPE), wartości predykcyjne (PPV, NPV), a także współczynniki wiarygodności (LRPLUS, LRMINUS) oraz miarę dokładności (Acc). Model, który bazował na zintegrowanych danych obejmujących dane stężeniowe związków pterynowych przeliczanych zarówno na stężenie kreatyniny jak i na ciężar właściwy moczu charakteryzował się wysokimi wartościami SEN, oraz najwyższymi parametrami SPE, Acc i LRPLUS (Tabela 3).

Tabela 3. Porównanie parametrów klasyfikacyjnych modelu bazującego na drzewie decyzyjnym. Tabela wykonany na podstawie **P4**.

	Model wykorzystujący ciężar właściwy moczu	Model wykorzystujący kreatyninę	Połączone dane
SEN	0.806	0.833	0.750
SPE	0.808	0.480	0.875
PPV	0.833	0.606	0.857
NPV	0.778	0.750	0.778
LR _{PLUS}	4.194	1.603	6.000
LR _{MINUS}	0.240	0.347	0.286
Acc	0.807	0.653	0.813

Reasumując, w obszarze stosowanych metod normalizacji stężenia związków pterynowych w moczu takich jak ciężar właściwy i stężenie kreatyniny, można stwierdzić, że wybór konkretnego podejścia znacząco wpływa na wyniki analizy statystycznej. Spośród badanych substancji, izoksantopteryna osiągnęła najwyższą wartość diagnostyczną. Niemniej jednak, użycie zintegrowanych danych (normalizowanych w odniesieniu do ciężaru właściwego moczu i stężenia kreatyniny) przyniosło lepsze rezultaty w klasyfikacji pacjentów. Wyniki uzyskane z badań opisanych w publikacji **P4**, mogą wpłynąć na ocenę diagnostyczną zarówno związków pterynowych, jak i innych potencjalnych biomarkerów.

Kolejne, przeprowadzone w ramach osiągnięcia habilitacyjnego badania opisane w publikacji **P5** dotyczyły oceny zmian profili stężeniowych aminokwasów w chorobach nowotworowych OUN. Celem badania była ocena potencjału celowanej analizy metabolomicznej aminokwasów z podwójną kontrolą w diagnostyce pacjentów z nowotworami OUN (nowotwory glejowe, oponiaki śródczaszkowe). Wybór grup badanych (pacjenci z glejakiem vs. pacjenci z oponiakiem vs. grupa pacjentów leczonych na chorobę zwyrodnieniową stawów kręgosłupa jako grupa kontrolna) miał na celu uchwycenie możliwych różnic w profilach stężeniowych aminokwasów w zależności od rodzaju nowotworu.

Nowotwory glejowe należą do najczęstszych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego i najczęstszych pierwotnych nowotworów złośliwych. Z praktycznego punktu widzenia guzy glejowe dzielą się na glejaki niskiego stopnia (ang. Low grade glioma - LGG) i glejaki wysokiego stopnia (ang. high grade glioma - HGG) [72,73]. LGG diagnozuje się w młodszej grupie wiekowej i rosną powoli, ale zwykle naciekowo. Najczęściej lokalizują się w płatach skroniowych i czołowych. Mediana czasu przeżycia od momentu diagnozy wynosi

siedem lat [74,75]. Z kolei HGG występuje znacznie częściej u osób starszych, u których najczęściej diagnozuje się glejaka wielopostaciowego (ang. Glioblastoma Multiforme – GBM) (stopień 4 według WHO). GBM to agresywny guz, który rośnie dynamicznie i prowadzi do postępującego spadku sprawności neurologicznej. Średni czas przeżycia pacjentów z HGG wynosi od 16 do 36 miesięcy [73]. Oponiaki śródczaszkowe to zwykle pierwotne nowotwory, najczęściej powstające bez oczywistych przyczyn. Jednak możliwe czynniki sprzyjające ich rozwojowi to radioterapia, stan zapalny, uraz wewnątrzczaszkowy i zaburzenia hormonalne [76,77]. Objawy kliniczne guzów śródczaszkowych mają dwojakie podłoże patofizjologiczne. Po pierwsze, wynikają ze zwiększonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego i są niespecyficzne, a po drugie, są związane z lokalizacją zmiany i zależą od ośrodków nerwowych i dróg zajętych lub uciskanych przez guz. Najczęstszym objawem wszystkich guzów śródczaszkowych jest postępujący deficyt neurologiczny [78,79].

Badania obrazowe jak tomografia komputerowa czy rezonans magnetyczny są podstawową metodą monitorowania przebiegu i leczenia guzów mózgu, natomiast markery biochemiczne oznaczane w moczu i płynach ustrojowych mają dotychczas ograniczone zastosowanie. Dostępne badania naukowe wskazują na możliwość wykorzystania różnych związków jako potencjalnych biomarkerów w nowotworach OUN, takich jak interleukiny [80,81], rodzina białek S100 [82,83], białka reagujące w fazie ostrej, markery stanów zapalnych [84–87] oraz panele peptydów i białek [88,89]. Pomimo wielu badań, żaden z biomarkerów nie jest gotowy do bezpośredniej implementacji klinicznej. Intensywność prac nad potencjalnymi biomarkerami nowotworów ośrodkowego układu nerwowego znajduje odzwierciedlenie w liczbie prac naukowych, których podsumowanie i krytyczną analizę można znaleźć w pracach przeglądowych [90–92].

W badaniu przedstawionym w publikacji **P5** zastosowałem HPLC-MS/MS w połączeniu z wielowymiarowymi metodami statystycznymi w celu identyfikacji zmian w profilach stężeń aminokwasów (Tabela 1), które pozwalałyby na różnicowanie pacjentów z glejakiem od pacjentów z oponiakiem. Analiza dotyczyła także innych chorób, które mogą być związane z ogólnym stanem zapalnym, takich jak zwyrodnieniowa choroba kręgosłupa. Wyniki badania **P5** ujawniły statystycznie istotne różnice w stężeniach badanych aminokwasów między analizowanymi grupami (Tabela 4). W grupie pacjentów z chorobą nowotworową zaobserwowałem wyższe stężenia aminokwasów w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyjątek stanowiła cysteina, której poziom był niższy u pacjentów onkologicznych w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 4. Zestawienie aminokwasów istotnie statystycznie różnicujących grupę pacjentów z glejakiem vs. grupa kontrolna oraz grupę pacjentów z oponiakiem vs. grupa kontrolna. Tabela wykonana na podstawie **P5**.

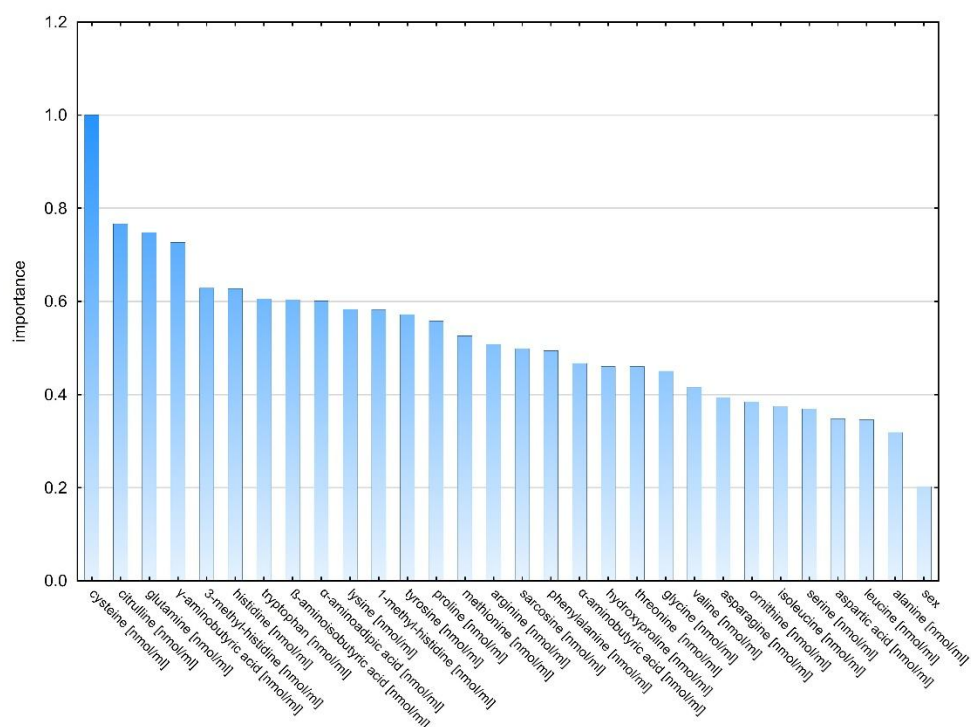
Pacjenci z glejakiem vs. grupa kontrolna.			Pacjenci z oponiakiem vs. grupa kontrolna.		
L.p.	Aminokwas	p	L.p.	Aminokwas	p
1.	SER	0,002245	1.	GLN	0,001167
2.	ARG	0,009292	2.	CIT	0,000028
3.	CIT	0,000000	3.	GABA	0,000145
4.	CIT	0,000000	4.	ORN	0,005893
5.	ASN	0,000939	5.	ASP	0,049001
6.	GLY	0,017846	6.	THR	0,005100
7.	GABA	0,000000	7.	MET	0,000003
8.	SAR	0,019362	8.	LYS	0,000019
9.	ABA	0,001831	9.	AAA	0,007040
10.	ORN	0,000012	10.	PHE	0,007552
11.	ASP	0,000214	11.	C-C	0,000000
12.	THR	0,000032	12.	TYR	0,000349
13.	MET	0,000190			
14.	LYS	0,000000			
15.	HIS	0,000011			
16.	AAA	0,000021			
17.	LEU	0,036077			
18.	PHE	0,000001			
19.	ILE	0,000728			
20.	C-C	0,000037			
21.	TYR	0,000007			

Gdy analizowane grupy podzieliłem według płci, spośród aminokwasów, które wykazały istotne statystycznie różnice, lizyna, histydyna, kwas α -aminoadypinowy oraz fenyloalanina pozwalały na różnicowanie pacjentów z glejakiem od grupy kontrolnej w obu płciach. W przypadku pacjentów z oponiakiem i grupą kontrolną różnice między płciami były widoczne tylko w przypadku lizyny. Stworzenie modelu klasyfikacyjnego na podstawie aminokwasów, dla których zidentyfikowano istotne statystycznie różnice między grupą badaną a grupą kontrolną, zarówno wśród kobiet jak i mężczyzn, pozwoliło na klasyfikację pacjentów jako zdrowych lub chorych na glejaka. Wartości odcięcia, dokładności, czułości i specyficzności testowanych aminokwasów w modelu uzyskane za pomocą krzywej ROC podsumowałem w Tabeli 5. Najwyższe wartości w modelu klasyfikacyjnym wykazywała lizyna.

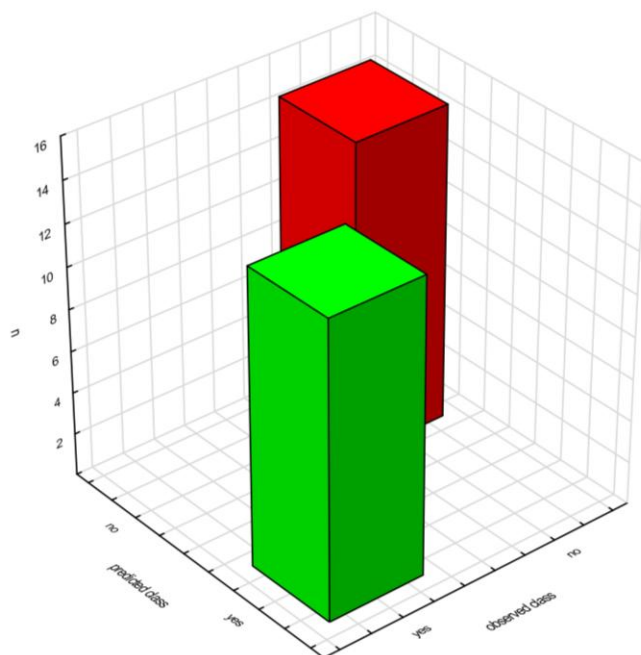
Tabela 5. Parametry klasyfikacyjne modelu bazującego na ROC.

Związek	Wartość odcięcia (nmol/mL)	Dokładność (%)	Czulość (%)	Specyficzność (%)
Lys	230.00	77.7	63.0	91.8
HIS	103.00	73.7	60.0	89.8
AAA	1.09	73.2	50.0	91.8
PHE	101.00	79.5	66.7	95.9

Wykorzystanie drzew klasyfikacyjnych pozwoliło na zbudowanie modelu pozwalającego na klasyfikację pacjentów do grupy badanej (pacjenci z glejakiem) i grupy kontrolnej (osoby zdrowe). Wykres istotności zmiennych modelu w algorytmie decyzyjnym wskazuje przede wszystkim na stężenie cysteiny, cytruliny i glutaminy jako aminokwasy, które pozwalają na lepszą klasyfikację pacjentów (ryc. 6). Co ważne, wykorzystanie modelu opartego na powyższych parametrach dawało znacznie większą szansę na prawidłowe zdiagnozowanie osoby z glejakiem niż zdiagnozowanie tego samego nowotworu u osoby w grupie kontrolnej (ryc. 7).



Ryc. 6. Wykres ważności zmiennych modelu oparty na danych zagregowanych. Rycina wykonana na podstawie P5.



Ryc. 7. Macierz klasyfikacji pacjentów wykonana przez model oparty na zagregowanych danych. Zielony - pacjenci z glejakiem prawidłowo sklasyfikowani. Czerwony - grupa kontrolna sklasyfikowana jako zdrowa. Rycina wykonana na podstawie **P5**.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowane w pracy **P5** wskazują, że aminokwasy takie jak lizyna, kwas α -aminoadypinowy, histydyna oraz fenyloalanina mogą odgrywać istotną rolę w podejmowaniu decyzji diagnostycznych w przypadku pacjentów z nowotworem OUN (glejak, oponiak). Podwyższone poziomy lizyny i histydyny w grupie pacjentów z glejakiem zostały potwierdzone w innych badaniach przeprowadzonych przez Toklu i wsp., którzy zaobserwowali wysokie stężenia tych aminokwasów u osób z glejakiem wysokiego stopnia. W tym samym badaniu w przeciwieństwie do wyników opisanych w pracy **P5**, nie zaobserwowano znaczących różnic w stężeniu kwasu α -aminoadypinowego, który jest mało zbadanym produktem rozkładu lizyny [93]. Z kolei Mören i wsp. wykazali, że poziom lizyny u pacjentów z glejakiem maleje podczas leczenia radioterapią [94]. Wyniki badania **P5** wskazują na różnice w profilach stężeniowych fenyloalaniny między pacjentami z glejakiem oraz oponiakiem. Poziomy tego aminokwasu pozwalają także na różnicowanie pacjentów z glejakiem od grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na płeć oraz wykazują najwyższe wartości parametrów klasyfikacyjnych modelu diagnostycznego. Podwyższone stężenie fenyloalaniny w stosunku do grupy kontrolnej zauważono również w innych chorobach nowotworowych, w tym w nowotworach głowy i szyi [95] oraz wątroby [96]. W badaniu Xiong

i wsp., którego celem była analiza metabolitów produkowanych oraz wykorzystywanych przez komórki glejaka, zidentyfikowano fenyloalaninę jako jeden z metabolitów, intensywnie wykorzystywanych przez komórki nowotworowe [97]. Przyczyny podwyższonego poziomu fenyloalaniny w nowotworach mogą być powiązane z procesami zapalnymi, aktywacją układu odpornościowego oraz wzrostem poziomu markerów aktywacji immunologicznej [98,99].

Podsumowując wyniki badań przedstawione w pracy **P5**, będącej częścią osiągnięcia habilitacyjnego, można stwierdzić, że procesy nowotworowe OUN wpływają na profil stężeniowy aminokwasów, co może być wykorzystane w modelowaniu algorytmu diagnostycznego. Należy jednak zwrócić uwagę na wieloczynnikowy i złożony charakter tych chorób, co skłania do prowadzenia przeze mnie dalszych badań, które pozwolą ustalić, czy profil aminokwasów w przypadku oponiaków i glejaków jest unikalny dla tych jednostek chorobowych.

4.1.5. Podsumowanie cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego

Proces naukowy jest złożony i wymaga różnorodnych narzędzi, co jest kluczowe dla formułowania trafnych hipotez i odnajdywania odpowiedzi na pytania badawcze. Badania podstawowe dostarczają fundamentalnej wiedzy, która jest niezbędna dla zrozumienia wielu aspektów nauki. Badania te, koncentrując się na poszerzaniu wiedzy teoretycznej, stanowią również fundament dla badań aplikacyjnych, umożliwiając wdrażanie opracowanych rozwiązań i rozwijanie narzędzi diagnostycznych użytecznych w praktyce klinicznej. Badania podstawowe, w tym celowana analiza metabolomiczna, poprzez dostarczenie nowej wiedzy na podstawie analiz profilu metabolicznego pozwala na lepsze zrozumienie mechanizmów chorób co może przełożyć się na wdrażanie konkretnych procedur diagnostycznych.

W tym kontekście badania stanowiące przedłożony cykl prac stanowiących osiągnięcie habilitacyjne, przyczyniają się do rozwoju wiedzy w zakresie wykorzystaniu celowanej analizy metabolicznej w poszukiwaniu nowych schematów diagnostycznych. Z przeprowadzonych badań można wyciągnąć kilka istotnych wniosków. Po pierwsze, profilowanie aminokwasów może mieć znaczący potencjał w kontekście diagnostyki i monitorowania chorób neurologicznych o podłożu autoimmunologicznym, takich jak miastenia gravis oraz stwardnienie rozsiane, co jest szczególnie istotne z punktu widzenia wczesnej interwencji terapeutycznej. Dodatkowo, uzyskane wyniki sugerują, że aminokwasy mogą odgrywać istotną rolę w chorobach nowotworowych OUN (glejak, oponiak), co może mieć potencjalne

zastosowanie w diagnostyce tych chorób. Ponadto związki pterynowe wykazują obiecujący potencjał jako biomarkery w diagnozowaniu nowotworu pęcherza moczowego, co może otworzyć nowe ścieżki we wczesnym wykrywaniu tego typu nowotworów. Wreszcie, istotne jest, aby zwrócić szczególną uwagę na metody normalizacji stężeń analitów w moczu. Może to mieć szerokie zastosowanie w diagnostyce, poprawiając dokładność i wiarygodność wyników. W kontekście całości badań, takie podejście może znacząco wpłynąć na rozwój bardziej precyzyjnych metod diagnostycznych w różnych dziedzinach medycyny.

4.1.6. Bibliografia

1. Kitano, H. Systems Biology: A Brief Overview. *Science* (1979) **2002**, 295, 1662–1664, doi:10.1126/science.1069492.
2. Nalbantoglu, S. Metabolomics: Basic Principles and Strategies. In *Molecular Medicine*; IntechOpen, 2019.
3. Roessner, U.; Bowne, J. What Is Metabolomics All About? *Biotechniques* **2009**, 46, 363–365, doi:10.2144/000113133.
4. Nicholson J.K.; Lindon J. C. Systems Biology: Metabonomics. *Nature* **2008**, 455, 1054–1056., doi:10.1038/4551054a.
5. Le Gouellec, A.; Plazy, C.; Toussaint, B. What Clinical Metabolomics Will Bring to the Medicine of Tomorrow. *Frontiers in Analytical Science* **2023**, 3, doi:10.3389/frans.2023.1142606.
6. Beger, R.D.; Schmidt, M.A.; Kaddurah-Daouk, R. Current Concepts in Pharmacometabolomics, Biomarker Discovery, and Precision Medicine. *Metabolites* **2020**, 10, doi:10.3390/metabo10040129.
7. Kaddurah-Daouk, R.; Weinshilboum, R.M. Pharmacometabolomics: Implications for Clinical Pharmacology and Systems Pharmacology. *Clin Pharmacol Ther* **2014**, 95, 154–167, doi:10.1038/clpt.2013.217.
8. Patti, G.J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Innovation: Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, 13, 263–269, doi:10.1038/nrm3314.
9. Roberts, L.D.; Souza, A.L.; Gerszten, R.E.; Clish, C.B. Targeted Metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol* **2012**, 1, doi:10.1002/0471142727.mb3002s98.
10. Fan, T.W.M. Considerations of Sample Preparation for Metabolomics Investigation. In *Methods in Pharmacology and Toxicology*; 2012; Vol. 17, pp. 7–27 ISBN 9781617796173.

11. Zhang, A.; Sun, H.; Wang, P.; Han, Y.; Wang, X. Modern Analytical Techniques in Metabolomics Analysis. *Analyst* **2012**, *137*, 293–300, doi:10.1039/c1an15605e.
12. Dorman, F.L.; Whiting, J.J.; Cochran, J.W.; Gardea-Torresdey, J. Gas Chromatography. *Anal Chem* **2010**, *82*, 4775–4785, doi:10.1021/ac101156h.
13. Segers, K.; Declerck, S.; Mangelings, D.; Heyden, Y. Vander; Eeckhaut, A. Van Analytical Techniques for Metabolomic Studies: A Review. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 2297–2318, doi:10.4155/bio-2019-0014.
14. Wiedmer, S.K.; Hyotylainen, T. Selection of Analytical Methodology for Metabolomics. In *Chromatographic Methods in Metabolomics*; 2013; pp. 1–10.
15. Nagana Gowda, G.A.; Djukovic Danijel Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. *Methods in Molecular Biology* **2014**, *1198*, 3–12, doi:10.1007/978-1-4939-1258-2_1.
16. Lu, W.; Bennett, B.D.; Rabinowitz, J.D. Analytical Strategies for LC-MS-Based Targeted Metabolomics., doi:10.1016/j.jchromb.
17. Nagana Gowda, G.A.; Raftery, D. NMR-Based Metabolomics. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer, 2021; Vol. 1280, pp. 19–37.
18. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*; 2018;
19. *Guideline on Bioanalytical Method Validation.*; 2012;
20. Hendriks, M.W.B.; Eeuwijk, F.A. van; Jellema, R.H.; Westerhuis, J.A.; Reijmers, T.H.; Hoefsloot, H.C.J.; Smilde, A.K. Data-Processing Strategies for Metabolomics Studies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30*, 1685–1698, doi:10.1016/j.trac.2011.04.019.
21. Anwardeen, N.R.; Diboun, I.; Mokrab, Y.; Althani, A.A.; Elrayess, M.A. Statistical Methods and Resources for Biomarker Discovery Using Metabolomics. *BMC Bioinformatics* **2023**, *24*, doi:10.1186/s12859-023-05383-0.
22. Worley, B.; Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics* **2013**, *1*, 92–107, doi:10.2174/2213235x11301010092.
23. Dresser, L.; Wlodarski, R.; Rezanian, K.; Soliven, B. Myasthenia Gravis: Epidemiology, Pathophysiology and Clinical Manifestations. *J Clin Med* **2021**, *10*, doi:10.3390/jcm10112235.
24. Berrih-Aknin, S.; Le Panse, R. Myasthenia Gravis: A Comprehensive Review of Immune Dysregulation and Etiological Mechanisms. *J Autoimmun* **2014**, *52*, 90–100, doi:10.1016/j.jaut.2013.12.011.

25. Berrih-Aknin, S.; Frenkian-Cuvelier, M.; Eymard, B. Diagnostic and Clinical Classification of Autoimmune Myasthenia Gravis. *J Autoimmun* **2014**, *48–49*, 143–148, doi:10.1016/j.jaut.2014.01.003.
26. Kaminski, H.J.; Kusner, L.L.; Wolfe, G.I.; Aban, I.; Minisman, G.; Conwit, R.; Cutter, G. Biomarker Development for Myasthenia Gravis. *Ann N Y Acad Sci* **2012**, *1275*, 101–106, doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06787.x.
27. Hassan-Smith, G.; Wallace, G.R.; Douglas, M.R.; Sinclair, A.J. The Role of Metabolomics in Neurological Disease. *J Neuroimmunol* **2012**, *248*, 48–52, doi:10.1016/j.jneuroim.2012.01.009.
28. Socha, E.; Koba, M.; Kośliński, P. Amino Acid Profiling as a Method of Discovering Biomarkers for Diagnosis of Neurodegenerative Diseases. *Amino Acids* **2019**, *51*, 367–371, doi:10.1007/s00726-019-02705-6.
29. Corso, G.; Cristofano, A.; Sapere, N.; La Marca, G.; Angiolillo, A.; Vitale, M.; Fratangelo, R.; Lombardi, T.; Porcile, C.; Intrieri, M.; et al. Serum Amino Acid Profiles in Normal Subjects and in Patients with or at Risk of Alzheimer Dementia. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* **2017**, *7*, 143–159, doi:10.1159/000466688.
30. Figura, M.; Kuśmierska, K.; Bucior, E.; Szlufik, S.; Koziorowski, D.; Jamrozik, Z.; Janik, P. Serum Amino Acid Profile in Patients with Parkinson’s Disease. *PLoS One* **2018**, *13*, doi:10.1371/journal.pone.0191670.
31. Kono, M.; Yoshida, N.; Tsokos, G.C. Amino Acid Metabolism in Lupus. *Front Immunol* **2021**, *12*, doi:10.3389/fimmu.2021.623844.
32. Lieu, E.L.; Nguyen, T.; Rhyne, S.; Kim, J. Amino Acids in Cancer. *Exp Mol Med* **2020**, *52*, 15–30, doi:10.1038/s12276-020-0375-3.
33. Cruzat, V.; Rogero, M.M.; Keane, K.N.; Curi, R.; Newsholme, P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10111564.
34. Kono, M.; Yoshida, N.; Maeda, K.; Tsokos, G.C. Transcriptional Factor ICER Promotes Glutaminolysis and the Generation of Th17 Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, 2478–2483, doi:10.1073/pnas.1714717115.
35. Kato, H.; Perl, A. Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Expands Th17 and IL-4⁺ CD4⁺–CD8[–] Double-Negative T Cells and Contracts Regulatory T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* **2014**, *192*, 4134–4144, doi:10.4049/jimmunol.1301859.
36. Shearer, J.D.; Richards, J.R.; Mills, C.D.; Caldwell, M.D.; Shearer, J.D. Differential Regulation of Macrophage Arginine Metabolism: A Proposed Role in Wound Healing. *Am J Physiol*. **1997**, doi:10.1152/ajpendo.1997.272.2.E181.

37. Sellebjerg, F.; Giovannoni, G.; Hand, A.; Madsen, H.O.; Jensen, C. V; Garred, P. Cerebrospinal Fluid Levels of Nitric Oxide Metabolites Predict Response to Methylprednisolone Treatment in Multiple Sclerosis and Optic Neuritis. *J Neuroimmunol* **2002**, *125*, 198–203, doi:10.1016/s0165-5728(02)00037-1.
38. Nagasawa, T.; Yoshizawa, F.; Nishizawa, N. Plasma N-Methylhistidine Concentration Is a Sensitive Index of Myofibrillar Protein Degradation during Starvation in Rats. *Biosci. Biotech. Biochem* **1996**, *60*, 501–502, doi:10.1271/bbb.60.501.
39. Sijljin, J.; Hjort, G.; Friman, G.; Hambraeus, L. Urinary Excretion of L-Methylhistidine: A Qualitative Indicator of Exogenous 3-Methylhistidine and Intake of Meats From Various Sources. *Metabolism* **1987**, *36*, 1175–1184, doi:10.1016/0026-0495(87)90245-9.
40. Deidre, M.W.; Frank, M.T.; Ballard J. Increased Rates of Myofibrillar Protein Breakdown in Muscle-Wasting Diseases. *Muscle Nerve* **1981**, *4*, 62–66, doi:10.1002/mus.880040111.
41. Danikowski, K.M.; Jayaraman, S.; Prabhakar, B.S. Regulatory T Cells in Multiple Sclerosis and Myasthenia Gravis. *J Neuroinflammation* **2017**, *14*, doi:10.1186/s12974-017-0892-8.
42. Dehbashi, S.; Hamouda, D.; Shanina, E. Co-Occurrence of Multiple Sclerosis and Myasthenia Gravis: A Case Report and Review of Immunological Theories. *Mult Scler Relat Disord* **2019**, *34*, 135–136, doi:10.1016/j.msard.2019.06.027.
43. Rynkeviè, G.; Kizlaitienė, R. Co-Occurrence of Myasthenia Gravis and Multiple Sclerosis: A Case Report. *Neurologijos seminarai* **2023**, *96*, 101–106, doi:10.15388/NS.2023.27.13.
44. Ling, Z.N.; Jiang, Y.F.; Ru, J.N.; Lu, J.H.; Ding, B.; Wu, J. Amino Acid Metabolism in Health and Disease. *Signal Transduct Target Ther* **2023**, *8*, doi:10.1038/s41392-023-01569-3.
45. Kurniawan, H.; Soriano-Baguet, L.; Brenner, D. Regulatory T Cell Metabolism at the Intersection between Autoimmune Diseases and Cancer. *Eur J Immunol* **2020**, *50*, 1626–1642, doi:10.1002/eji.201948470.
46. Antony, I.R.; Wong, B.H.S.; Kelleher, D.; Verma, N.K. Maladaptive T-Cell Metabolic Fitness in Autoimmune Diseases. *Cells* **2023**, *12*, doi:10.3390/cells12212541.
47. Negrotto, L.; Correale, J. Amino Acid Catabolism in Multiple Sclerosis Affects Immune Homeostasis. *The Journal of Immunology* **2017**, *198*, 1900–1909, doi:10.4049/jimmunol.1601139.
48. Rzepiński, Ł.; Kośliński, P.; Kowalewski, M.; Koba, M.; Maciejek, Z. Serum Amino Acid Profiling in Differentiating Clinical Outcomes of Multiple Sclerosis. *Neurol Neurochir Pol* **2023**, *57*, 414–422, doi:10.5603/PJNNS.a2023.0054.

49. Pashaei, S.; Yarani, R.; Mohammadi, P.; Emami Aleagha, M.S. The Potential Roles of Amino Acids and Their Major Derivatives in the Management of Multiple Sclerosis. *Amino Acids* **2022**, *54*, 841–858, doi:10.1007/s00726-022-03162-4.
50. Blackmore, D.; Siddiqi, Z.; Li, L.; Wang, N.; Maksymowych, W. Beyond the Antibodies: Serum Metabolomic Profiling of Myasthenia Gravis. *Metabolomics* **2019**, *15*, doi:10.1007/s11306-019-1571-9.
51. Bröer, S.; Bröer, A. Amino Acid Homeostasis and Signalling in Mammalian Cells and Organisms. *Biochemical Journal* **2017**, *474*, 1935–1963, doi:10.1042/BCJ20160822.
52. Virarkar, M.; Alappat, L.; Bradford, P.G.; Awad, A.B. L-Arginine and Nitric Oxide in CNS Function and Neurodegenerative Diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2013**, *53*, 1157–1167, doi:10.1080/10408398.2011.573885.
53. da Silva, J.C.; Amaral, A.U.; Cecatto, C.; Wajner, A.; dos Santos Godoy, K.; Ribeiro, R.T.; de Mello Gonçalves, A.; Zanatta, Â.; da Rosa, M.S.; Loureiro, S.O.; et al. α -Ketoadipic Acid and α -Aminoadipic Acid Cause Disturbance of Glutamatergic Neurotransmission and Induction of Oxidative Stress In Vitro in Brain of Adolescent Rats. *Neurotox Res* **2017**, *32*, 276–290, doi:10.1007/s12640-017-9735-8.
54. Vyver, M. Vande; Beelen, R.; De Keyser, J.; Nagels, G.; Van Binst, A.M.; Verborgh, C.; D’haeseleer, M. Plasma Citrulline Levels Are Increased in Patients with Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci* **2018**, *387*, 174–178, doi:10.1016/j.jns.2018.02.025.
55. Watanabe, M.; Maernura, K.; Kanbara, K.; Tamayama, T.; Hayasaki, H. GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs. *Int Rev Cytol* **2002**, *213*, doi:10.1016/s0074-7696(02)13011-7.
56. Nantes, J.C.; Proulx, S.; Zhong, J.; Holmes, S.A.; Narayanan, S.; Brown, R.A.; Hoge, R.D.; Koski, L. GABA and Glutamate Levels Correlate with MTR and Clinical Disability: Insights from Multiple Sclerosis. *Neuroimage* **2017**, *157*, 705–715, doi:10.1016/j.neuroimage.2017.01.033.
57. Tang, K.W.A.; Toh, Q.C.; Teo, B.W. Normalisation of Urinary Biomarkers to Creatinine for Clinical Practice and Research – When and Why. *Singapore Med J* **2015**, *56*, 7–10, doi:10.11622/smedj.2015003.
58. Harpole, M.; Davis, J.; Espina, V. Current State of the Art for Enhancing Urine Biomarker Discovery. *Expert Rev Proteomics* **2016**, *13*, 609–626, doi:10.1080/14789450.2016.1190651.
59. James, G.D.; Sealey, J.E.; Alderman, M.; Ljungman, S.; Mueller, F.B.; Pecker, M.S.; Laragh, J.H. A Longitudinal Study of Urinary Creatinine and Creatinine Clearance in Normal Subjects Race, Sex, and Age Differences. *Am J Hypertens* **1988**, *1*, 124–131, doi:10.1093/ajh/1.2.124.

60. Barr, D.B.; Wilder, L.C.; Caudill, S.P.; Gonzalez, A.J.; Needham, L.L.; Pirkle, J.L. Urinary Creatinine Concentrations in the U.S. Population: Implications for Urinary Biologic Monitoring Measurements. *Environ Health Perspect* **2005**, *113*, 192–200, doi:10.1289/ehp.7337.
61. Cirillo, M.; Anastasio, P.; De Santo, N.G. Relationship of Gender, Age, and Body Mass Index to Errors in Predicted Kidney Function. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2005**, *20*, 1791–1798, doi:10.1093/ndt/gfh962.
62. Pimenta, E.; Jensen, M.; Jung, D.; Schaumann, F.; Boxnick, S.; Truebel, H. Effect of Diet on Serum Creatinine in Healthy Subjects During a Phase I Study. *J Clin Med Res* **2016**, *8*, 836–839, doi:10.14740/jocmr2738w.
63. Phipps, W.R.; Duncan, A.M.; Merz, B.E.; Kurzer, M.S. Effect of the Menstrual Cycle on Creatinine Clearance in Normally Cycling Women. *Obstetrics and gynecology* **1998**, *92*, doi:10.1016/s0029-7844(98)00241-5.
64. Carter, C.E.; Gansevoort, R.T.; Scheven, L.; Lambers Heerspink, H.J.; Shlipak, M.G.; de Jong, P.E.; Ix, J.H. Influence of Urine Creatinine on the Relationship between the Albumin-to-Creatinine Ratio and Cardiovascular Events. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2012**, *7*, 595–603, doi:10.2215/CJN.09300911.
65. Kleber, M.; Cybulla, M.; Bauchmüller, K.; Ihorst, G.; Koch, B.; Engelhardt, M. Monitoring of Renal Function in Cancer Patients: An Ongoing Challenge for Clinical Practice. *Annals of Oncology* **2007**, *18*, 950–958, doi:10.1093/annonc/mdm055.
66. Edmands, W.M.B.; Ferrari, P.; Scalbert, A. Normalization to Specific Gravity Prior to Analysis Improves Information Recovery from High Resolution Mass Spectrometry Metabolomic Profiles of Human Urine. *Anal Chem* **2014**, *86*, 10925–10931, doi:10.1021/ac503190m.
67. Vij, H.S.; Howell, S. Improving the Specific Gravity Adjustment Method for Assessing Urinary Concentrations of Toxic Substances. *Am Ind Hyg Assoc J* **1998**, *59*, 375–380, doi:10.1080/15428119891010622.
68. Bi, H.; Guo, Z.; Jia, X.; Liu, H.; Ma, L.; Xue, L. The Key Points in the Pre-Analytical Procedures of Blood and Urine Samples in Metabolomics Studies. *Metabolomics* **2020**, *16*, doi:10.1007/s11306-020-01666-2.
69. Cook, J.D.; Caplan, Y.H.; Lodico, C.P.; Bush, D.M. The Characterization of Human Urine for Specimen Validity Determination in Workplace Drug Testing: A Review. *J Anal Toxicol* **2000**, *24*, doi:10.1093/jat/24.7.579.
70. Kośliński, P.; Bujak, R.; Daghir, E.; Markuszewski, M.J. Metabolic Profiling of Pteridines for Determination of Potential Biomarkers in Cancer Diseases. *Electrophoresis* **2011**, *32*, doi:10.1002/elps.201000664.

71. Ma, Y.; Burton, C. Pteridine Detection in Urine: The Future of Cancer Diagnostics? *Biomark Med* **2013**, *7*, 679–681, doi:10.2217/bmm.13.88.
72. Fisher, J.L.; Schwartzbaum, J.A.; Wrensch, M.; Wiemels, J.L. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin* **2007**, *25*, 867–890, doi:10.1016/j.ncl.2007.07.002.
73. Ohgaki, H.; Kleihues, P. Epidemiology and Etiology of Gliomas. *Acta Neuropathol* **2005**, *109*, 93–108, doi:10.1007/s00401-005-0991-y.
74. Diwanji, T.P.; Engelman, A.; Snider, J.W.; Mohindra, P. Epidemiology, Diagnosis, and Optimal Management of Glioma in Adolescents and Young Adults. *Adolesc Health Med Ther* **2017**, *Volume 8*, 99–113, doi:10.2147/ahmt.s53391.
75. Claus, E.B.; Black, P.M. Survival Rates and Patterns of Care for Patients Diagnosed with Supratentorial Low-Grade Gliomas: Data from the SEER Program, 1973-2001. *Cancer* **2006**, *106*, 1358–1363, doi:10.1002/cncr.21733.
76. Wiemels, J.; Wrensch, M.; Claus, E.B. Epidemiology and Etiology of Meningioma. *J Neurooncol* **2010**, *99*, 307–314, doi:10.1007/s11060-010-0386-3.
77. Yamanaka, R.; Hayano, A.; Kanayama, T. Radiation-Induced Meningiomas: An Exhaustive Review of the Literature. *World Neurosurg* **2017**, *97*, 635-644.e8, doi:10.1016/j.wneu.2016.09.094.
78. Alentorn, A.; Hoang-Xuan, K.; Mikkelsen, T. Presenting Signs and Symptoms in Brain Tumors. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier, 2016; Vol. 134, pp. 19–26 ISBN 9780128029978.
79. Snyder, H.; Robinson, K.; Shah, D.; Brennan, R.; Handrigan, M. Signs and Symptoms of Patients with Brain Tumors Presenting to the Emergency Department. *The Journal of Emergency Medicine* **1993**, *11*, 253–258, doi:10.1016/0736-4679(93)90042-6.
80. Doroudchi, M.; Pishhe, Z.G.; Malekzadeh, M.; Golmoghaddam, H.; Taghipour, M.; Ghaderi, A. Elevated Serum IL-17A but Not IL-6 in Glioma versus Meningioma and Schwannoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2013**, *14*, 5225–5230, doi:10.7314/APJCP.2013.14.9.5225.
81. Holst, C.B.; Christensen, I.J.; Skjøth-Rasmussen, J.; Hamerlik, P.; Poulsen, H.S.; Johansen, J.S. Systemic Immune Modulation in Gliomas: Prognostic Value of Plasma IL-6, YKL-40, and Genetic Variation in YKL-40. *Front Oncol* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.00478.
82. Popescu, I.D.; Codrici, E.; Albulescu, L.; Mihai, S.; Enciu, A.M.; Albulescu, R.; Tanase, C.P. Potential Serum Biomarkers for Glioblastoma Diagnostic Assessed by Proteomic Approaches. *Proteome Sci* **2014**, *12*, doi:10.1186/s12953-014-0047-0.
83. Arora, A.; Patil, V.; Kundu, P.; Kondaiah, P.; Hegde, A.S.; Arivazhagan, A.; Santosh, V.; Pal, D.; Somasundaram, K. Serum Biomarkers Identification by ITRAQ and

Verification by MRM: S100A8/S100A9 Levels Predict Tumor-Stroma Involvement and Prognosis in Glioblastoma. *Sci Rep* **2019**, 9, doi:10.1038/s41598-019-39067-8.

84. Gautam, P.; Nair, S.C.; Gupta, M.K.; Sharma, R.; Polisetty, R.V.; Uppin, M.S.; Sundaram, C.; Puligopu, A.K.; Ankathi, P.; Purohit, A.K.; et al. Proteins with Altered Levels in Plasma from Glioblastoma Patients as Revealed by ITRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis. *PLoS One* **2012**, 7, doi:10.1371/journal.pone.0046153.
85. Lyubimova, N. V; Toms, M.G.; Popova, E.E.; Bondarenko, Y. V; Krat, V.B.; Kushlinskii, N.E.; Blokhin, N.N. Neurospecificity Proteins in the Serum of Patients with Brain Tumors. *Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny* **2010**, 150, 678–681.
86. Gollapalli, K.; Ray, S.; Srivastava, R.; Renu, D.; Singh, P.; Dhali, S.; Bajpai Dikshit, J.; Srikanth, R.; Moiyadi, A.; Srivastava, S. Investigation of Serum Proteome Alterations in Human Glioblastoma Multiforme. *Proteomics* **2012**, 12, 2378–2390, doi:10.1002/pmic.201200002.
87. Nijaguna, M.B.; Schröder, C.; Patil, V.; Shwetha, S.D.; Hegde, A.S.; Chandramouli, B.A.; Arivazhagan, A.; Santosh, V.; Hoheisel, J.D.; Somasundaram, K. Definition of a Serum Marker Panel for Glioblastoma Discrimination and Identification of Interleukin 1 β in the Microglial Secretome as a Novel Mediator of Endothelial Cell Survival Induced by C-Reactive Protein. *J Proteomics* **2015**, 128, 251–261, doi:10.1016/j.jprot.2015.07.026.
88. Zheng, S.H.; Huang, J.L.; Chen, M.; Wang, B.L.; Ou, Q.S.; Huang, S.Y. Diagnostic Value of Preoperative Inflammatory Markers in Patients with Glioma: A Multicenter Cohort Study. *J Neurosurg* **2018**, 129, 583–592, doi:10.3171/2017.3.JNS161648.
89. Carlsson, A.; Persson, O.; Ingvarsson, J.; Widegren, B.; Salford, L.; Borrebaeck, C.A.K.; Wingren, C. Plasma Proteome Profiling Reveals Biomarker Patterns Associated with Prognosis and Therapy Selection in Glioblastoma Multiforme Patients. *Proteomics Clin Appl* **2010**, 4, 591–602, doi:10.1002/prca.200900173.
90. Linhares, P.; Carvalho, B.; Vaz, R.; Costa, B.M. Glioblastoma: Is There Any Blood Biomarker with True Clinical Relevance? *Int J Mol Sci* **2020**, 21, 1–16, doi:10.3390/ijms21165809.
91. Ali, H.; Harting, R.; de Vries, R.; Ali, M.; Wurdinger, T.; Best, M.G. Blood-Based Biomarkers for Glioma in the Context of Gliomagenesis: A Systematic Review. *Front Oncol* **2021**, 11, doi:10.3389/fonc.2021.665235.
92. Śledzińska, P.; Bebyn, M.G.; Furtak, J.; Kowalewski, J.; Lewandowska, M.A. Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas. *Int J Mol Sci* **2021**, 22, doi:10.3390/ijms221910373.

93. Toklu, S.; Kemerdere, R.; Kacira, T.; Gurses, M.S.; Benli Aksungar, F.; Tanriverdi, T. Tissue and Plasma Free Amino Acid Detection by LC-MS/MS Method in High Grade Glioma Patients. *J Neurooncol* **2023**, *163*, doi:10.1007/s11060-023-04329-z.
94. Mören, L.; Wibom, C.; Bergström, P.; Johansson, M.; Antti, H.; Bergenheim, A.T. Characterization of the Serum Metabolome Following Radiation Treatment in Patients with High-Grade Gliomas. *Radiation Oncology* **2016**, *11*, doi:10.1186/s13014-016-0626-6.
95. Cadoni, G.; Giraldi, L.; Chiarla, C.; Gervasoni, J.; Persichilli, S.; Primiano, A.; Settimi, S.; Galli, J.; Paludetti, G.; Arzani, D.; et al. Prognostic Role of Serum Amino Acids in Head and Neck Cancer. *Dis Markers* **2020**, *2020*, doi:10.1155/2020/2291759.
96. Watanabe, A.; Higashi, T.; Sakata, T.; Nagashima, H. Serum Amino Acid Levels in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Cancer* **1984**, *54*, 1875–1882, doi:10.1002/1097-0142(19841101)54:9<1875::aid-cnrcr2820540918>3.0.co;2-o.
97. Xiong, N.; Gao, X.; Zhao, H.; Cai, F.; Zhang, F. cheng; Yuan, Y.; Liu, W.; He, F.; Zacharias, L.G.; Lin, H.; et al. Using Arterial–Venous Analysis to Characterize Cancer Metabolic Consumption in Patients. *Nat Commun* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-16810-8.
98. Neurauter, G.; Grahmann, A. V.; Klieber, M.; Zeimet, A.; Ledochowski, M.; Sperner-Unterweger, B.; Fuchs, D. Serum Phenylalanine Concentrations in Patients with Ovarian Carcinoma Correlate with Concentrations of Immune Activation Markers and of Isoprostane-8. *Cancer Lett* **2008**, *272*, 141–147, doi:10.1016/j.canlet.2008.07.002.
99. Ploder, M.; Neurauter, G.; Spittler, A.; Schroecksadel, K.; Roth, E.; Fuchs, D. Serum Phenylalanine in Patients Post Trauma and with Sepsis Correlate to Neopterin Concentrations. *Amino Acids* **2008**, *35*, 303–307, doi:10.1007/s00726-007-0625-x.

4.2. Dodatkowe osiągnięcie naukowe:

„Celowana analiza metaboliczna profili aminokwasów jako potencjalna metoda diagnostyki i monitorowania procesów chorobowych”

W ramach dodatkowego osiągnięcia naukowego zostały uwzględnione wyniki badań obejmujące celowaną analizę metabolomiczną profili aminokwasów u pacjentów z:

- I. zaburzeniami neurodegeneracyjnymi (osoby z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi, pacjenci z łagodną i umiarkowaną demencją);
- II. stwardnieniem rozsianym.

Uzyskane wyniki pozwoliły na identyfikację istotnych różnic w zmianach metabolomicznych, co może być wykorzystane w projektowaniu algorytmu diagnostycznego i/lub terapeutycznego.

I. Zaburzenia neurodegeneracyjne (osoby z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi, pacjenci z łagodną i umiarkowaną demencją)

Zaburzenia neurodegeneracyjne, takie jak demencja, są kluczowym globalnym wyzwaniem w zdrowiu publicznym, a wiek jest głównym czynnikiem ryzyka ich rozwoju. Zmiany demograficzne prowadzą do wzrostu liczby przypadków w starzejących się populacjach. Aktualne metody diagnostyczne mają liczne ograniczenia: analiza biomarkerów w płynie mózgowo-rdzeniowym jest inwazyjna, a techniki neuroobrazowania są kosztowne i rzadko dostępne. To zwiększa zainteresowanie poszukiwaniem nowych, obwodowych biomarkerów demencji.

Celem niniejszego badania przeprowadzonego we współpracy z Katedrą Geriatrii CM UMK było ustalenie czy profil aminokwasów zmienia się wraz z postępem zaburzeń neurodegeneracyjnych (od osób zdrowych, przez łagodne zaburzenia funkcji poznawczych, łagodną demencję, po umiarkowaną demencję) oraz zidentyfikowanie możliwych biomarkerów na różnych etapach procesu chorobowego. W ramach prowadzonych badań opracowałem procedurę przygotowania i przechowywania materiału do analiz, zoptymalizowałem i zwalidowałem metodę badawczą oraz uczestniczyłem w konsultacjach i korekcie manuskryptów.

Badanie objęło 123 uczestników podzielonych na cztery grupy: grupa kontrolna osób zdrowych, osoby z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi, pacjenci z łagodną i umiarkowaną demencją. Poziom szesnastu aminokwasów w surowicy oceniono przy użyciu HPLC z detekcją fluorescencyjną.

Otrzymane wyniki dowodzą, że zachodzi korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta, a jego statusem metabolomicznym. W ramach prowadzonych badań wykazano, że poziomy kilku aminokwasów w surowicy zmieniają się istotnie u pacjentów w poszczególnych stadiach zaawansowania zaburzeń funkcji poznawczych. W szczególności, zaobserwowano różnice w stężeniach argininy, seryny oraz izoleucyny pomiędzy grupami pacjentów na kolejnych stadiach zaawansowania demencji. Wszystkie wymienione aminokwasy były istotnie wyższe u pacjentów z demencją w porównaniu do osób zdrowych. Zauważone zmiany sugerują zmiany metabolizmu aminokwasów wraz z postępem demencji, co może pomóc w zrozumieniu jej biochemicznych aspektów. Szczegółowe omówienie projektu obejmującego profilowanie aminokwasów w surowicy pacjentów geriatrycznych ze zdiagnozowanymi zespołami otępiennymi w porównaniu do osób starszych bez zaburzeń funkcji poznawczych zostało zawarte w trzech publikacjach naukowych, których jestem współautorem:

1. *“Amino acid profiling as a method of discovering biomarkers for diagnosis of neurodegenerative diseases”* Socha, E., Koba, M., **Kośliński, P.** Amino Acids 51, 367–371 (2019).
2. *“Amino Acid Levels as Potential Biomarker of Elderly Patients with Dementia”* Socha E.; **Kośliński P.**; Koba M.; Mądra-Gackowska K.; Kędziora-Kornatowska K.; Gackowski M.; Daghir-Wojtkowiak, E. Brain Sci. 2020, 10, 914.
3. *“Serum amino acid profiles in patients with mild cognitive impairment and in patients with mild dementia or moderate dementia”* Socha E., **Kośliński P.**, Koba M. Mądra-Gackowska K.; Kędziora-Kornatowska K.; Gackowski M.; Daghir-Wojtkowiak, E. Amino Acids 53, 97–109, 2021.

II. Stwardnienie rozsiane.

Celem badania była analiza porównawcza profili aminokwasów pacjentów ze stwardnieniem rozsianym oraz grupą kontrolną. W ramach przeprowadzonego badania współpracowałem w zakresie opracowania metodyki badawczej, wykonałem oznaczenia profili aminokwasów metodą HPLC-MS/MS oraz współpracowałem w zakresie analizy danych i redakcji manuskryptu.

W badaniu oceniono profil 29 aminokwasów w surowicy krwi u 121 pacjentów z różnymi wariantami stwardnienia rozsianego (RRMS - 41, SPMS - 55, PPMS - 25) oraz u 53 osób z grupy kontrolnej. Do badania włączono pacjentów u których zdiagnozowano chorobę

według kryteriów McDonalda z 2017 roku, a którzy nie mieli rzutu choroby ani nie byli leczeni sterydami przez 3 miesiące przed pobraniem próbek. Analizy metabolomiczne przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS).

Uzyskane wyniki wykazały wyższe całkowite stężenie aminokwasów u pacjentów z MS w porównaniu do grupy kontrolnej, a stężenia argininy, 1-metylo-L-histydyny i proliny były istotnie wyższe, podczas gdy cytruliny, kwasu α -aminomasłowego i tryptofanu były niższe w grupie pacjentów MS w porównaniu z kontrolą. Różnice te pozostały istotne po uwzględnieniu płci i nie zmieniały się z wiekiem pacjentów. Zauważono także różnice w stężeniach aminokwasów w zależności od fenotypu klinicznego MS, gdzie pacjenci z PPMS mieli najwyższe stężenia, a pacjenci z RRMS najniższe stężenia aminokwasów. U pacjentów z PPMS stwierdzono wyższe stężenie kwasu beta-aminoizomasłowego w porównaniu do pacjentów z SPMS i RRMS, jak również wyższe stężenie kwasu asparaginowego w porównaniu do pacjentów z RRMS. Analiza trendów ujawniła pozytywne zmiany w stężeniach cystyny, proliny i seryny związane z wiekiem oraz czasem trwania choroby, ale nie stwierdzono różnic w całkowitym stężeniu aminokwasów w zależności od stopnia niepełnosprawności. Uzyskane wyniki wskazują na zmieniony metabolizm aminokwasów w MS, zwłaszcza w odniesieniu do postępujących wariantów choroby i pozostają w zgodności z obserwacjami innych badaczy. W kontekście stężeń pojedynczych aminokwasów u pacjentów z MS na szczególną uwagę zasługuje metabolizm argininy i tryptofanu. Potwierdzono różnice stężeń obu tych aminokwasów pomiędzy pacjentami z MS a grupą kontrolną. Ponadto wykazano istotne różnice stężeń pomiędzy pacjentami z MS a osobami z grupy kontrolnej dla proliny i cytruliny, które są aminokwasami zaangażowanymi w metabolizm argininy. Uzyskane wyniki potwierdzają istnienie znaczących różnic w profilu aminokwasów pomiędzy pacjentami z MS a grupą kontrolą, jak również pomiędzy poszczególnymi fenotypami klinicznymi choroby. Jednocześnie wskazują na znaczenie metabolizmu aminokwasów w przebiegu MS, potencjalną rolę profilowania aminokwasów w poszukiwaniach surowiczego biomarkera choroby oraz jej klinicznych fenotypów, w monitorowaniu intensywności prowadzonej rehabilitacji ruchowej pacjentów, a także w poszukiwaniu nowych możliwości terapeutycznych. Nie umożliwiają jednak odpowiedzi na pytanie czy stwierdzane zaburzenia metabolizmu aminokwasów są przyczyną czy skutkiem toczącego się procesu demielinizacyjnego. Niski odsetek pacjentów stosujących DMTs (11.5%) w badanej grupie, jak również niestosowanie u pacjentów sterydoterapii w ciągu 3 miesięcy poprzedzających badanie, znacząco ogranicza wpływ stosowanej farmakoterapii na uzyskane wyniki.

Jednocześnie duża reprezentatywność postępujących typów choroby umożliwiła analizę profilu aminokwasów u pacjentów z dominującymi procesami neurodegeneracji. Szczegóły prezentowanych badań omawia publikacja:

1. *“Serum amino acid profiling in differentiating clinical outcomes of multiple sclerosis”*
Rzepiński Ł.; **Kośliński P.**; Kowalewski M., Koba M.; Maciejek Z.; Neurol Neurochir Pol. 2023;57(5):414-422.

4.3. Dodatkowe osiągnięcie naukowe:

„Opracowanie i zastosowanie metod chromatografii cieczowej do analizy związków psychoaktywnych”

W ramach dodatkowego osiągnięcia naukowego zostały uwzględnione wyniki badań obejmujących opracowanie i zastosowanie chromatografii cieczowej do analizy związków psychoaktywnych w tym:

- I. opracowanie i walidację metod analitycznych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej do wykrywania piperazyn w surowicy i moczu pacjentów z podejrzeniem zatrucia;
- II. ocenę czułości i swoistości dostępnych komercyjnie testów narkotykowych moczu.

I. Opracowanie i walidacja metod analitycznych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej do wykrywania piperazyn w surowicy i moczu pacjentów z podejrzeniem zatrucia.

Pochodne piperazyny, klasyfikowane jako nowe substancje psychoaktywne, są nadużywanyimi substancjami psychostymulującymi, które mogą prowadzić do poważnych problemów zdrowotnych. Użytkownicy często doświadczają nieprzewidywalnych skutków długoterminowych, a dostępne informacje na temat ich toksykologii są ograniczone. Nadużywanie nowych substancji psychoaktywnych (NPS) stawia istotne wyzwania medyczne i prawne. Pochodne piperazyny mogą być toksyczne nawet w małych dawkach i często występują w mieszkankach, co utrudnia ich identyfikację w materiale biologicznym. Pochodne piperazyny nie mają zastosowania terapeutycznego, ale mogą być obecne jako metabolity innych leków. Kluczowe jest potwierdzenie ich roli w zatruciach w ramach diagnostyki

toksykologicznej. Dotychczas nie były objęte rutynową analizą toksykologiczną, co wskazuje na potrzebę rozwijania szybkich metod ich wykrywania.

Celem badań było opracowanie i walidacja metod analitycznych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej z detekcją DAD oraz spektrometrią mas do wykrywania piperazyn w surowicy i moczu pacjentów z podejrzeniem zatrucia. Mój udział w badaniach dotyczył współpracy przy opracowaniu metody badawczej HPLC-MS/MS (optymalizacja i walidacja metody HPLC-MS/MS) wykonania analiz HPLC-MS/MS, konsultacji merytorycznych oraz weryfikacji i korekty manuskryptów.

Opracowana w wyniku realizacji projektu, każda z zoptymalizowanych metod może być stosowana niezależnie, uzyskując wiarygodne wyniki w krótkim czasie analizy. Metody te mogą się również wzajemnie uzupełniać, zapewniając jakościowe i ilościowe potwierdzenie uzyskanych wyników. Proponowane metody pozwalają na potwierdzenie zatrucia i mogą być pomocne w diagnostyce toksykologicznej. Szczegółowe omówienie zaproponowanych metod analitycznych zostało zawarte w dwóch publikacjach:

1. *“Rapid Targeted Method of Detecting Abused Piperazine Designer Drugs”* Welz A.; Koba M.; **Kośliński P.**; Siódmiak, J.; J. Clin. Med. 2021, 10, 5813.
2. *“Comparison of LC-MS and LC-DAD Methods of Detecting Abused Piperazine Designer Drugs”* Welz A.; Koba M.; **Kośliński P.**; Siódmiak J.; J. Clin. Med. 2022, 11, 1758.

II. Ocena czułości i swoistości dostępnych komercyjnie testów narkotykowych moczu

Drugim zagadnieniem związanym z opracowaniem i zastosowaniem metod chromatografii cieczowej do analizy związków psychoaktywnych była ocena czułości i swoistości dostępnych komercyjnie testów narkotykowych w moczu. W ramach prowadzonego badania uczestniczyłem w opracowaniu metodologii badawczej, wykonaniu analiz chromatograficznych, analizie danych oraz weryfikacji i korekcie manuskryptu.

Testy poddane badaniu zanurzano w syntetycznym moczu wzbogaconym amfetaminą w różnych stężeniach, a także substancjami mogącymi powodować zakłócenia uzyskiwanych wyników. Następnie monitorowano, czy uzyskane wyniki były zgodne z deklaracjami producenta. W badaniu wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową jako metodę referencyjną. Szczegółowe omówienie zaproponowanej tematyki badawczej oraz uzyskanych wyników zostało zawarte w publikacji:

1. “Comparison of Sensitivity and Specificity of Commercial Amphetamine Tests” Miłos, A.; Gackowski, M.; Przybylska, A.; **Kośliński, P.**; Koba, M. Applied Chem 2023, 3, 141-152.

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

Pracę naukową rozpocząłem w 2009 roku podczas dziennych studiów doktoranckich na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Podczas studiów doktoranckich zostałem zatrudniony na stanowisku naukowo-technicznym w Katedrze i Zakładzie Toksykologii tejże uczelni.

Podczas realizacji studiów doktoranckich byłem kierownikiem dwóch grantów badawczych:

1. Grant na finansowanie zadania badawczego służącego rozwojowi młodych naukowców MN-10/WF-SD: „*Optymalizacja metody oznaczania związków pterynowych za pomocą izokratycznej i gradientowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych*” (2011 r.).
2. Grant na finansowanie zadania badawczego służącego rozwojowi młodych naukowców MN-4/WF-SD: „*Oznaczanie związków pterynowych w moczu pacjentów chorych na nowotwory układu moczowo-płciowego*” (2012 r.).

Projekty te realizowane były we współpracy z Katedrą Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Kliniką Urologii Szpitala Uniwersyteckiego im. dr. Jana Bizuela nr 2 w Bydgoszczy oraz Katedrą i Kliniką Urologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Efektem realizacji tych projektów są wystąpienia konferencyjne:

1. „*Opracowanie metody oznaczenia wybranych związków pterynowych z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC), jako potencjalnych biomarkerów chorób nowotworowych*” **Kośliński P.**; Bujak R.; Daghir E.; Szupryczyński P.;

Markuszewski M.; Konferencja: IX Konferencja Chromatograficzna "Chromatografia? To przecież codzienność!" Poznań, 26-29 VI 2011. Poznań.

2. "Comparison of HILIC RP-LC stationary phases for separation of the pterin metabolites." **Kośliński P.**; Bujak R.; Daghir-Wojtkowiak E.; Markuszewski M. J.; Konferencja: Analytical methods to study oxidative damage, antioxidants and drugs. Białystok, 10-13 XI 2011.
3. "Determination of metabolic profiles of pteridines in urine of bladder cancer patients by HPLC with fluorimetric detection" **Kośliński P.**; Daghir-Wojtkowiak E.; Bujak R.; Jarzemski P.; Markuszewski M.J.; Konferencja: 29th International Symposium on Chromatography. Toruń, Poland, 9-13 IX 2012.
4. „Oznaczanie profili metabolicznych związków pterynowych w chorobach nowotworowych pęcherza moczowego” **Kośliński P.**; Szatkowska-Wandas P.; Jarzemski P.; Markuszewski M.J.; Konferencja: XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Farmacja-nauka-społeczeństwo. Białystok, 18-21 IX 2013.

oraz publikacje naukowe:

1. "Metabolic profiling of pteridines for determination of potential biomarkers in cancer diseases" **Kośliński P.**; Bujak R.; Daghir E.; Markuszewski MJ. *Electrophoresis*. 2011;32(15):2044-2054. doi:10.1002/elps.201000664
2. "Determination of pterins in urine by HPLC with UV and fluorescent detection using different types of chromatographic stationary phases (HILIC, RP C₈, RP C₁₈)" **Kośliński P.**; Jarzemski P.; Markuszewski M.J.; Kaliszan R.; J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2014:Vol. 91, s. 37-45.

W okresie 14.07.2010 r. – 20.07.2010 r. odbyłem staż zorganizowany przez Instytut Badań Chemii „Raluca Ripan” Uniwersytetu Babeş-Bolyai pod opieką prof. Virginia Coman. Poruszana tematyka badawcza koncentrowała się na praktycznych aspektach metod separacji i detekcji, przygotowywaniu próbek i technikach łączonych stosowanych w celach analitycznych, preparatywnych i przemysłowych.

We wrześniu 2012 r. brałem aktywny udział w Letniej Szkole Analizy Farmaceutycznej (SSPA), organizowanej przez Divisione di Chimica Farmaceutica, Società Chimica Italiana (Oddział Chemii Leków, Włoskie Towarzystwo Chemiczne) i sponsorowanej przez Europejską

Federację Chemii Leków (EFMC). Program SSPA koncentruje się na nowoczesnych metodach analitycznych stosowanych w opracowywaniu i produkcji nowych leków. Doświadczenie zdobyte podczas kursu pozwoliło m.in. na udział w projekcie, którego celem było przeprowadzenie serii syntez pochodnych indan-1,3-dionowych wykazujących potencjalne zastosowanie terapeutyczne. Ponadto celem tego badania było porównanie parametrów lipofilowości uzyskanych różnymi technikami oraz wyselekcjonowanie struktur, które zostaną skierowane na dalszą poprawę właściwości i szczegółowe testy *in vitro* oraz ewentualne testy na zwierzętach. Pochodne 2-arylideno-indan-1,3-dionu wykazują bardzo zróżnicowane właściwości, dzięki czemu znajdują różnorodne zastosowania w nauce, medycynie i przemyśle. Wybrane pochodne wykazują aktywność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną i przeciwzapalną. W ramach realizowanego projektu potwierdzono strukturę zsyntetyzowanych związków, a także określono ich lipofilowość metodami eksperymentalnymi i obliczeniowymi. Przebadano ich aktywność antyproliferacyjną wobec wybranych linii komórkowych zgodnie z protokołem MTT; sprawdzono zdolność wiązania się z albuminą oraz wyznaczono parametry związane z toksycznością substancji *in silico*. Wybrane związki wykazujące aktywność antyproliferacyjną były silnie związane z albuminą i w większości przypadków spełniały regułę Lipińskiego i Vebera. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że pochodne 2-arylideno-indan-1,3-dionu wydają się być dobrymi kandydatami na leki o potencjalnej wiodącej strukturze do dalszego rozwoju. Wyniki badań zostały zawarte w publikacji:

1. “*Selected Drug-Likeness Properties of 2-Arylidene-indan-1,3-dione Derivatives—Chemical Compounds with Potential Anti-Cancer Activity*” Pluskota, R.; Jaroch, K.; **Kośliński, P.**; Ziomkowska, B.; Lewińska, A.; Kruszewski, S.; Bojko, B.; Koba, M.. *Molecules* 2021, 26, 5256.

W 2012 roku zostałem laureatem programu stypendialnego „Krok w przyszłość – stypendia dla doktorantów IV edycja”, którego celem było zwiększenie zaangażowania doktorantów w podejmowaniu działań zmierzających do komercjalizowania wyników badań naukowych istotnych z punktu widzenia rozwoju województwa kujawsko-pomorskiego, co w znacznym stopniu przyczyniło się do możliwości realizacji mojej rozprawy doktorskiej.

4 listopada 2014 roku uzyskałem stopień doktora nauk farmaceutycznych, specjalność: analiza farmaceutyczna, nadany przez Wydział Farmaceutyczny OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy doktorskiej był prof. dr hab. n. farm. Michał Jan Markuszewski.

W latach 2015-2017 pełniłem funkcję kierownika projektu naukowego finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM pt.: „Profilowanie metaboliczne związków pterynowych u osób zdrowych i pacjentów z rakiem pęcherza moczowego” 2014/13/N/NZ7/00470.

W ramach realizacji grantu Preludium odbyłem miesięczny staż naukowy w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (1.07.2015 r. – 31.07.2015 r.), którego tematyka badań dotyczyła opracowania nowych metod separacyjnych i chemometrycznych w analizie metabolomicznej.

Efektem realizowanej podczas stażu tematyki badawczej są 2 badania naukowe. Pierwsze badanie przeprowadzone we współpracy z Katedrą i Kliniką Urologii, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego obejmowało porównanie profili metabolicznych związków pterynowych w moczu osób zdrowych oraz pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego. Wyniki analizy chromatograficznej wraz z podejściem opartym na analizie statystycznej wykazały, że stężenia związków pterynowych u pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego były wyższe w porównaniu do osób zdrowych, a statystycznie istotne różnice między pacjentami a grupą kontrolną odnotowano dla ksantopteryny i izoksantopteryny. Dodatkowo, stężenia pteryny były wyższe u kobiet niż u mężczyzn. Stwierdzono także istotne dodatnie korelacje między metabolitami w obu grupach. Wyniki badań zostały zawarte w publikacji:

1. “*The metabolic profiles of pterin compounds as potential biomarkers of bladder cancer- Integration of analytical-based approach with biostatistical methodology*” **Kośliński P.**; Daghir-Wojtkowiak E.; Szatkowska-Wandas P.; Markuszewski M.; Markuszewski M.J.; J Pharm Biomed Anal. 2016;127:256-262.

Celem drugiego badania, w którym uczestniczyłem podczas stażu naukowego, było porównanie zdolności predykcyjnych modeli QSRR zbudowanych przy użyciu różnych metod dla nukleozydów i pteryn rozdzielanych na kolumnach typu HILIC wraz z wyznaczeniem modeli zależności struktura-retencja (QSRR). W pracy analizowano zależności struktura-retencja wykorzystując 3 fazy stacjonarne typu HILIC. Dwie fazy stacjonarne N,O-diaminofosfoamidowe, tj. APC-10 i APC-18, zostały zsyntetyzowane w laboratorium Katedry Chemii Środowiska i Bioanalitiky UMK, natomiast trzecią stanowiła komercyjnie dostępna faza z immobilizowaną sztuczną membraną (ang. *Immobilized Artificial Membrane*, IAM.PC.DD2). Połączenie LASSO z regresją krokową zapewniło modele o porównywalnej

wydajności predykcyjnej jak LASSO, jednak z możliwością obliczenia błędu standardowego oszacowań. Zastosowanie samego LASSO i w połączeniu z klasyczną regresją krokową może zapewnić większą stabilność opracowanych modeli dzięki bardziej płynnej zmianie współczynników i zmniejszonej podatności na korelację przypadkową. Zastosowanie podejścia bazującego na QSRR, wraz z metodami obliczeniowymi zaproponowanymi w tej pracy, może okazać się użytecznym podejściem w modelowaniu retencji związków nukleozydowych i pterynowych w HILIC. Wyniki badań zostały zawarte w publikacji:

1. *“Least absolute shrinkage and selection operator and dimensionality reduction techniques in quantitative structure retention relationship modeling of retention in hydrophilic interaction liquid chromatography”* Daghir-Wojtkowiak E.; Wiczling P., Bocian Sz.; Kubik Ł.; **Kośliński P.**, Buszewski B.; Kaliszan R.; Markuszewski M.J.; Journal of Chromatography A, Volume 1403, 2015, 54-62.

W latach 2016-2019 realizowałem szkolenie specjalizacyjne w ramach Laboratoryjnej Toksykologii Medycznej i uzyskałem specjalizację z Laboratoryjnej Toksykologii Medycznej. W uznaniu uzyskania bardzo dobrego wyniku egzaminacyjnego zostałem wyróżniony nagrodą „Specjalista 2021” przyznawaną przez Ministra Zdrowia lekarzom, farmaceutom, diagnostom laboratoryjnym, fizjoterapeutom oraz specjalistom w innych dziedzinach, którzy uzyskali najwyższe wyniki z egzaminu specjalizacyjnego.

W latach 2016-2018 we współpracy z Zespołem ds. Żywienia Pozajelitowego Kliniki Anestezjologii i Intensywnej Terapii Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 w Bydgoszczy oraz Katedrą Anestezjologii i Intensywnej Terapii, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu realizowałem badania mające na celu ocenę wpływu procedur chirurgicznych na stężenie glutaminy w surowicy operowanych pacjentów oraz analizę korelacji między stężeniem glutaminy w surowicy (oznaczanej metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną) a parametrami laboratoryjnymi (CRP, albuminy). Grupę badaną stanowili pacjenci kardiochirurgiczni zakwalifikowani do zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych bez użycia krążenia pozaustrojowego oraz pacjenci poddani prawostronnej hemikolektomii. Stężenie glutaminy i parametry morfologii krwi oceniano przed zabiegiem oraz w 3 i w 5 dobie po zabiegu operacyjnym. Analizy stężenia glutaminy w surowicy krwi wykonywano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC) z detekcją fluorescencyjną. Zaobserwowano, iż zabieg operacyjny w obrębie przewodu pokarmowego predysponuje do niższego stężenia glutaminy w surowicy krwi w 5 dobie po zabiegu operacyjnym w odniesieniu

do wartości wyjściowej. Zabieg operacyjny poza przewodem pokarmowym nie wpływa na obniżenie stężenia glutaminy w 5 dobie po zabiegu operacyjnym w odniesieniu do wartości wyjściowej. Przewlekły stan chorobowy (zapalny) może być związany z większym uruchomieniem rezerw glutaminy, stąd wyższe stężenie tego aminokwasu w grupie pacjentów kardiochirurgicznych w odniesieniu do wartości w grupie kontrolnej oraz pacjentów operowanych w obrębie przewodu pokarmowego. Uzyskane wyniki sugerują, że stężenie glutaminy zależy od nasilenia stanu zapalnego, operowanej jamy ciała oraz nasilenia katabolizmu, który wynika z odmiennej patofizjologii chorób układu pokarmowego i choroby wieńcowej. Wyniki realizowanych badań zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych:

1. „*Analiza stężenia glutaminy w surowicy krwi w wybranych sytuacjach klinicznych w okresie okołoperacyjnym*” Różowicz A.; Jakubczyk M.; Kusza K.; Kupczyk K.; **Kośliński P.**; Szatkowska-Wandas P.; Koba M.; *Postępy Żyw. Klin.* 2016: T. 12, nr 2, s. 43. Konferencja: Polskie Towarzystwo Żywienia Pozajelitowego, Dojelitowego i Metabolizmu: Jachranka, Polska, 2016.06.02-2016.06.02
2. „*Analiza stężenia glutaminy w surowicy krwi w wybranych sytuacjach klinicznych w okresie okołoperacyjnym*” **Kośliński P.**; Różowicz A.; Jakubczyk M.; Kusza K.; Kupczyk K.; Szatkowska-Wandas P.; Koba M.; Konferencja: Metabolic Circle 2016. Bydgoszcz, 2016.
3. „*An analysis of glutamine concentration in blood serum of patients in the perioperative period*” Różowicz A.; Kusza K.; **Kośliński P.**; Szatkowska-Wandas P.; Jakubczyk M.; Sierakowska K.; Koba M.; Konferencja: Clin. Nutr. 2018 Madrid.

Oraz w publikacjach naukowych:

1. „*Aminokwasy rozgałęzione i ich znaczenie w chorobach wątroby*” Tkaczyk K.; Słupski M.; Jakubczyk M.; Baranowski P.; **Kośliński P.**; Sierakowska K.; W: Nowoczesne trendy diagnostyki i terapii. Red. Katarzyna Pawlak-Osińska, Maciej Śniegocki, Michał Szpinda.
2. „*Wpływ zabiegu operacyjnego na stężenie glutaminy w surowicy krwi*” Różowicz A.; Kusza K.; Jakubczyk M.; **Kośliński P.**; Szatkowska-Wandas P.; Koba M.; Sierakowska K.; W: Nowoczesne trendy diagnostyki i terapii. Red. Katarzyna Pawlak-Osińska, Maciej Śniegocki, Michał Szpinda.

W latach 2019-2020 pełniłem funkcję kierownika projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) w ramach grantu Szybka Ścieżka:

1. „*Xhaller Main – uniwersalny inhalator suchego proszku do administracji leków wziewnych*” (POIR.01.01.01-00-0347/19).

Celem projektu było opracowanie nowatorskiego, kapsułkowego inhalatora suchego proszku typu DPI (ang. *Dry Powder Inhaler*) przeznaczonego do podawania leków wziewnych. Realizacja projektu zakładała opracowanie kompletnego urządzenia, przechodząc przez etapy prac B+R, tj. od tworzenia i testowania modeli i prototypów, które będą podlegać doskonaleniu, by następnie przeprowadzić produkcję pilotażową i certyfikację powstałego wyrobu medycznego, zapewniając mu ochronę prawami wyłącznymi (patent, wzór przemysłowy).

Od czerwca 2024 r. kieruję projektem:

1. „*Application of untargeted serum metabolomics analysis in search of new diagnostics patterns for patients with myasthenia gravis*” , Inicjatywa Doskonałości – Debiuty w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu).

Projekt realizowany jest we współpracy z Kliniką Neurologii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką SPOZ w Bydgoszczy.

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

6.1. Prowadzona działalność dydaktyczna.

a) Prowadzenie zajęć dydaktycznych:

1. Prowadzenie zajęć laboratoryjnych z przedmiotu toksykologia dla studentów 4 roku kierunku farmacja, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (od 2010 r.).
2. Prowadzenie zajęć laboratoryjnych z przedmiotu toksykologia dla studentów 4 roku kierunku analityka medyczna, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (od 2014 r.).
3. Prowadzenie zajęć laboratoryjnych z przedmiotu toksykologia kosmetyku dla studentów 2 roku II stopnia, kierunek kosmetologia, Wydział Farmaceutyczny

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (2014 – 2019 r.).

4. Prowadzenie seminariów z przedmiotu toksykologia dla studentów 4 roku kierunku analityka medyczna Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (od 2020 r.).
5. Prowadzenie wykładów z przedmiotu toksykologia dla studentów 4 roku kierunku analityka medyczna, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (od 2024 r.).
6. Prowadzenie zajęć laboratoryjnych z przedmiotu toksykologia dla studentów 3 roku kierunku zielarstwo i fitoterapia, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich (od 2019 r.).
7. Prowadzenie zajęć fakultatywnych z przedmiotu techniki spektrofotometryczne, immunochemiczne, chromatograficzne oraz szybkie testy w analizie trucizn, dla studentów kierunku analityka medyczna, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (od 2021 r.).
8. Prowadzenie zajęć z przedmiotu ćwiczenia specjalistyczne i metodologia badań dla studentów 4 roku kierunku analityka medyczna, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (od 2014 r.).
9. Prowadzenie zajęć z przedmiotu toksykologia dla studentów anglojęzycznych na kierunku farmacja w ramach programu ERASMUS + (od 2014 r.).

b) Opiekun/promotor prac dyplomowych:

1. Pełnienie funkcji opiekuna 20 prac magisterskich, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (7 dla kierunku farmacja, 13 dla kierunku analityka medyczna).
2. Pełnienie funkcji recenzenta 9 prac dyplomowych, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.
3. Pełnienie funkcji promotora pomocniczego pracy doktorskiej realizowanej w Katedrze Toksykologii i Bromatologii CM UMK (mgr Edyta Socha, obrona pracy doktorskiej 16.09.2021 r.)

6.2. Prowadzona działalność organizacyjna

1. **Członek Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera** w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (2012- 2016, 2016-2020).
2. **Członek Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera** w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (2020-2024 – Funkcja protokolanta).
3. **Członek Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera** w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (2024 – obecnie).
4. **Członek Wydziałowej Komisji Programowej** dla kierunku analityka medyczna (2023 – obecnie).
5. **Członek Kolegium Elektorów** Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (2024 – 2028).
6. **Członek Komitetu Naukowego** 3rd International MEDical Interdisciplinary Congress – iMEDIC 2018.
7. **Koordynator przedmiotu** toksykologia dla studentów 4 roku, kierunek analityka medyczna (od 2024 r.).

6.3. Prowadzona działalność popularyzującą naukę

1. Wykład w ramach XIX edycji cyklu „Medyczna Środa” skierowany m.in. do mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego organizowany przez Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK pt. "Medycyna spersonalizowana – przyszłość czy nierealne marzenie?”.
2. Wykład w ramach XIX edycji cyklu „Medyczna Środa” skierowany m.in. do mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego organizowany przez Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK pt. „Krótka historia trucizn i trucicieli”.
3. Webinar dla członków STDL oraz PTSF: „Praca w toksykologii – fakty i mity”.

6.4. Recenzje w czasopismach międzynarodowych

Wykonałem 12 recenzji artykułów dla czasopism z listy filadelfijskiej:

1. International Journal Of Molecular Sciences (IF 4,9): 2 artykuły.
2. Journal Of Chromatography (IF 2,8): 1 artykuł.
3. Journal Of Pharmaceutical & Biomedical Analysis (IF 3,1): 4 artykuły.
4. Life (IF 3,2): 1 artykuł.
5. Medicine (IF 2,4): 1 artykuł.
6. Metabolites (IF 3,5): 1 artykuł.
7. Molecules (IF 4,2): 1 artykuł.
8. Nutrients (IF 4,8): 1 artykuł.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

7.1. Ukończone kursy i szkolenia

1. „Biokompatybilność wyrobów medycznych wg ISO 10993”, Katowice, 2024 r.
2. „Auditor wewnętrzny systemu zarządzania jakością wg ISO 13485:2016”, Katowice, 2024 r.
3. „Menager w zakresie regulacji wyrobów medycznych”, Katowice, 2024 r.
4. „Szkola inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej”, Bydgoszcz, 15-16.09.2022 r.
5. „Akty prawne MZ mówiące o oznaczeniu narkotyków i substancji psychoaktywnych w materiale biologicznym – prawna odpowiedzialność diagnosty laboratoryjnego”, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Warszawa, 2020 r.
6. „Analiza narkotyków i substancji psychoaktywnych w laboratorium medycznym”, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Warszawa, 2020 r.
7. „Analiza etanolu w laboratorium medycznym”, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Warszawa, 2019 r.
8. „Akty prawne MZ mówiące o oznaczeniu etanolu w materiale biologicznym – prawna odpowiedzialność diagnosty laboratoryjnego”, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Warszawa, 2019 r.

9. „Zasady wykonywania oznaczeń leków we krwi dla potrzeb terapii monitorowanej”, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Warszawa, 2020 r.
10. „Sample Preparation Summer Course”, Bydgoszcz, 2019 r.
11. „Toksykologia kliniczna, sądowa, terapia monitorowana stężeniami leku we krwi”, Instytut Ekspertyz Sądowych im Prof. Dra Jana Sehna w Krakowie, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Kraków 15-23.10.2018 r.
12. „Toksykologia środowiskowa. Monitoring biologiczny w zastosowaniu do oceny narażenia na czynniki toksyczne w środowisku życia i środowisku pracy. Interpretacja wyników”, Zakład Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź, 26-30.06.2017 r.
13. „Metody izolowania analitu z matrycy i oznaczenia substancji toksycznych oraz ich metabolitów z zastosowaniem metod analizy instrumentalnej”, Instytut Ekspertyz Sądowych im Prof. Dra Jana Sehna w Krakowie, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Kraków, 16-24.10.2017 r.
14. „Toksykologia ogólna, toksykokinetyka. Toksykologia szczegółowa wybranych grup czynników toksycznych”, Zakład Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź, 13-17.03.2017 r.
15. „Zastosowanie statystyki w analizie wyników badań medycznych”, Bydgoszcz, 2013 r.
16. „Nowoczesne techniki badawcze stosowane w biologii, biotechnologii i diagnostyce” zrealizowane w ramach projektu pn. „Uzupełnienie oferty dydaktycznej o interdyscyplinarny kurs: Nowoczesne techniki badawcze stosowane w biologii, biotechnologii i diagnostyce”, współfinansowanie ze środków Unii Europejskiej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Toruń, 1.10.2011-30.06.2012 r.
17. „Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej do izolacji substancji psychoaktywnych z płynów biologicznych”, Gdańsk, 2012 r.
18. Szkolenie z zakresu przedsiębiorczości w ramach projektu „Z nauki do biznesu”, współfinansowanie ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, Bydgoszcz, 2012 r.
19. “Workshop on Methods for Preparation of Biological Material for Analytical Procedures”, Białystok, 2011 r.
20. “Advanced Method Development, HPLC Troubleshooting”, Warszawa, 2011 r.
21. „Elektroforeza kapilarna w analizie farmaceutycznej”, Gdańsk, 2010 r.
22. „The use of chromatographic methods (HPLC, TLC, GC) in organic chemistry”, Toruń, 2010 r.

7.2. Nagrody i wyróżnienia oraz stypendia za prowadzoną działalność naukową i dydaktyczną

1. III nagroda z zakresie prezentowanej zawartości merytorycznej pt. „Miniaturyzacja Systemu HPLC i jego zastosowanie do analizy „on-line” nukleozydów obecnych w moczu” przedstawionego podczas VI Konferencji „Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej”, Warszawa, 2011 r.
2. Stypendium w ramach IV edycji stypendiów dla doktorantów „Krok w przyszłość”, Toruń, 2012 r.
3. III nagroda w konkursie na najlepszy plakat: „Oznaczanie profili metabolicznych związków pterynowych w moczu jako potencjalnych biomarkerów nowotworów pęcherza moczowego” zaprezentowany podczas Konferencji naukowej „Nowoczesne techniki badawcze stosowane w analizie farmaceutycznej i biomedycznej”, Bydgoszcz, 2014 r.
4. Nagroda Dydaktyczna Zespołowa I-go Stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk, 2014 r.
5. Wyróżnienie za wysoką ocenę zajęć dydaktycznych prowadzonych w roku akademickim 2015/2016, Bydgoszcz, 2016 r.
6. Nagroda Naukowa Zespołowa I-go Stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk, 2017 r.
7. Wyróżnienie „Specjalista 2021 r.”, Warszawa, 2021 r.
8. Zespołowe Wyróżnienie Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia w dziedzinie naukowej w 2022 r., Bydgoszcz, 2023 r.
9. Nagroda Zespołowa III-go Stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia w dziedzinie naukowej w 2023 r., Bydgoszcz, 2024 r.

7.3. Udział w konferencjach naukowych

1. XXI Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Farmacja Polska na tle Unii Europejskiej”, Gdańsk, 12-15 IX 2010.

Tytuł plakatu: „Opracowanie metody oznaczenia wybranych cieczy jonowych z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC”, **Kośliński P.**, Chaberska H., Struck W., Markuszewski M.

2. Analytical methods to study oxidative damage, antioxidants and drugs., Białystok, 10-13 XI 2011.

Tytuł plakatu: „*Comparison of HILIC RP-LC stationary phases for separation of the pterin metabolites*”, **Kośliński P.**, Bujak R., Daghir E., Markuszewski M.

3. IX Konferencja Chromatograficzna "Chromatografia? To przecież codzienność!", Poznań, 26-29 VI 2011.

Tytuł wystąpienia: „*Metabolomika w badaniach nad nowymi biomarkerami chorób nowotworowych*”, Waszczuk-Jankowska M., Struck W., Wiczling P., **Kośliński P.**, Markuszewski M., Kaliszan R., Markuszewski M.J.

4. Konferencja Naukowa “Quo vadis life science? Quo vadis chemistry?”, Toruń, 28-29 IX 2011.

Tytuł wystąpienia: „*Metabolomika w bioanalityce*”, Markuszewski M.J., Waszczuk-Jankowska M., Struck W., Wiczling P., **Kośliński P.**, Bujak R., Daghir E., Markuszewski M., Kaliszan R.

5. VI Konferencja „Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej”, Warszawa, 20-21 X 2011.

Tytuł plakatu: „*Miniaturyzacja systemu HPLC i jego zastosowanie do analizy "on-line" nukleozydów obecnych w moczu*”, Daghir E., Szumski M., Bujak R., **Kośliński P.**, Buszewski B., Markuszewski M.

6. II Konferencja Naukowa „Monitoring i analiza wody. Chromatograficzne metody oznaczania substancji o charakterze jonowym”, Toruń, 3-5 IV 2011.

Tytuł plakatu: „*Opracowanie metody oznaczania wybranych cieczy jonowych z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC)*”, **Kośliński P.**, Bujak R., Daghir E., Markuszewski M.

7. IX Konferencja Chromatograficzna „Chromatografia? To przecież codzienność!", Poznań, 26-29 VI 2011.

Tytuł plakatu: „*Opracowanie metody oznaczenia wybranych związków pterynowych z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC), jako potencjalnych biomarkerów chorób nowotworowych*”, **Kośliński P.**, Bujak R., Daghir E., Szupryczyński P., Markuszewski M.

8. Analytical methods to study oxidative damage, antioxidants and drugs, Białystok, 2011 r.

Tytuł plakatu: „*Comparison of HILIC RP-LC stationary phases for separation of the pterin metabolites*”, **Kośliński P.**, Bujak R., Daghir E., Markuszewski M.J.

9. I Ogólnopolska Konferencja Doktorantów i Młodych Naukowców „Per scientiam ad salutem aegroti”, Bydgoszcz, 2012 r. – udział bierny.
10. 29th International Symposium on Chromatography, Toruń, Poland, 9-13 IX 2012.
Tytuł plakatu: „*Determination of metabolic profiles of pteridines in urine of bladder cancer patients by HPLC with fluorimetric detection*”, **Kośliński P.**, Dagher E., Bujak R., Jarzowski P., Markuszewski M.J.
11. XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Farmacja-nauka-społeczeństwo., Białystok, 18-21 IX 2013.
Tytuł plakatu: „*Oznaczanie profili metabolicznych związków pterynowych w chorobach nowotworowych pęcherza moczowego*”, **Kośliński P.**, Szatkowska P., Jarzowski P., Markuszewski M.J.
12. 36th EPSA Annual Congress, Catania, Włochy, 22-28 IV 2013.
Tytuł plakatu: „Quantitative structure-retention relationships of antitumor acridinone derivatives”, Kuchcicka A., Koba M., **Kośliński P.**, Bączek T.
13. Konferencja naukowa "Nowoczesne techniki badawcze stosowane w analizie farmaceutycznej i biomedycznej", Bydgoszcz, 10-12 IX 2014.
Tytuł plakatu: „*Oznaczanie profili metabolicznych związków pterynowych w moczu jako potencjalnych biomarkerów nowotworów pęcherza moczowego*”, **Kośliński P.**, Dagher-Wojtkowiak E., Szatkowska P., Koba M., Markuszewski M.J.
14. Metabolic Circle 2015, Gdańsk, 2015 r. – udział bierny.
15. Metabolic Circle 2016, Bydgoszcz, 2016 r.
Tytuł plakatu: „*Analiza stężenia glutaminy w surowicy krwi w wybranych sytuacjach klinicznych w okresie okołoperacyjnym*”, **Kośliński P.**, Różowicz A., Jakubczyk M., Kusza K., Kupczyk K., Szatkowska-Wandas P., Koba M.
16. Analityczne zastosowanie chromatografii cieczowej, Warszawa 2016 r. – udział bierny.
17. ITP 2017 – 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques; PKChrom 2017, XI Polska Konferencja Chromatograficzna "Chromatography in pharmacy and bioanalysis", Sopot/Gdańsk, 10-13 IX 2017.
Tytuł plakatu: „*Evaluating the effect of gender, age and prostate cancer on urinary pterin concentration*”, **Kośliński P.**, Pluskota R., Koba M.
18. 40th ESPEN Congress, Madryt, Hiszpania, 2018.
Tytuł plakatu: „*An analysis of glutamine concentration in blood serum of patients in the perioperative period*”, Różowicz A., Kusza K., **Kośliński P.**, Szatkowska-Wandas P., Jakubczyk M., Wawrzyniak K., Koba M.

19. iMEDIC 2018 Bydgoszcz: 3rd International Medical Interdisciplinary Congress. Medical, Pharmaceutical and Health Sciences., Bydgoszcz, 9 VI 2018.

Tytuł wystąpienia: „*Non-commercial clinical trials in Poland: legal aspects, potential benefits and risks*”, Socha E., **Kośliński P.**, Mądra-Gackowska K., Ziółkowska S., Gackowski M.

20. Zioła w terapii, żywieniu i kosmetyce, Bydgoszcz, 2018 r.

Tytuł wystąpienia: „*Źródła ksenobiotyków i ich losy w ustroju człowieka*”, **Kośliński P.**

21. 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Gdańsk, 24-26 IX 2019.

Tytuł plakatu: „*Comparison of the concentrations of metabolic profiles of pterine compounds in urine samples from patients with bladder, renal and prostate cancer*”,

Kośliński P., Pawlak J., Pluskota R., Gackowski M., Mądra-Gackowska K., Koba M.

22. Interpretacja wyników badań toksykologicznych, Olsztyn, 6-8 V 2019 r. – udział bierny.

7.4. Dane bibliometryczne

Łączna wartość punktacji MNiSW:	1767
Wartość wskaźnika IF:	64,378
Cytowania (Web of Science Core Collection):	273
Cytowania bez autocytowań (Web of Science Core Collection):	256
Index H(Web of Science Core Collection)	9
Cytowania (Scopus):	297
Cytowania bez autocytowań (Scopus):	278
Index H= (Scopus)	9

.....
(podpis wnioskodawcy)