

**Załącznik nr 3 do wniosku o wszczęcie  
postępowania habilitacyjnego z dnia 20.12.2025**

## **Autoreferat**

**dr n. przyr. Wojciech Filipiak**

Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej  
Wydział Farmaceutyczny  
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Bydgoszcz, 2025**

## Spis treści

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Imię i nazwisko .....                                                                                                                                                                             | 1  |
| 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne .....                                                                                                                                          | 1  |
| 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych .....                                                                                                          | 1  |
| 4. Omówienie osiągnięć naukowych .....                                                                                                                                                               | 2  |
| 4.1. Pierwsze osiągnięcie naukowe – cykl publikacji .....                                                                                                                                            | 3  |
| 4.1.1. Tytuł cyklu habilitacyjnego .....                                                                                                                                                             | 3  |
| 4.1.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego .....                                                                                                                              | 3  |
| 4.1.3. Omówienie osiągnięcia naukowego będącego cyklem prac naukowych .....                                                                                                                          | 5  |
| Wprowadzenie do cyklu habilitacyjnego .....                                                                                                                                                          | 5  |
| Etap 1 - Fundamenty biologiczne lotnych metabolitów jako potencjalnych biomarkerów .....                                                                                                             | 9  |
| Etap 2 – Rozwój Metod Analitycznych .....                                                                                                                                                            | 20 |
| Etap 3 – Metabolomika mikroorganizmów w modelach <i>in vitro</i> i <i>ex vivo</i> .....                                                                                                              | 31 |
| Etap 4 – Translacyjne badanie kliniczne .....                                                                                                                                                        | 44 |
| Podsumowanie .....                                                                                                                                                                                   | 47 |
| 4.1.4. Oświadczenia o wkładzie własnym w artykuły będące podstawą autoreferatu .....                                                                                                                 | 49 |
| 4.1.5. Przegląd najważniejszych osiągnięć naukowych będących podstawą autoreferatu .....                                                                                                             | 53 |
| 4.2. Drugie osiągnięcie naukowe – współpraca z partnerami nieakademickimi w ramach współpracy nauki z biznesem .....                                                                                 | 57 |
| 4.3. Analiza bibliometryczna .....                                                                                                                                                                   | 59 |
| 4.4. Podsumowanie pozostałego dorobku i osiągnięć naukowych poza cyklem habilitacyjnym .....                                                                                                         | 59 |
| 4.4.1. Artykuły naukowe opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora .....                                                                                                                              | 59 |
| Rozwój technik mikroekstrakcyjnych .....                                                                                                                                                             | 60 |
| Wolatilom – prace przeglądowe .....                                                                                                                                                                  | 62 |
| Pozostałe publikacje naukowe .....                                                                                                                                                                   | 65 |
| 4.4.2. Realizacja grantów o zasięgu krajowym i międzynarodowym .....                                                                                                                                 | 66 |
| 4.4.3. Recenzje artykułów w czasopismach naukowych .....                                                                                                                                             | 68 |
| 4.4.4. Wyróżnienia i nagrody .....                                                                                                                                                                   | 68 |
| 4.4.5. Organizacja oraz udział w kursach i szkoleniach .....                                                                                                                                         | 69 |
| 5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej ..... | 70 |
| 5.1. Staże naukowe .....                                                                                                                                                                             | 70 |
| 5.2. Projekty naukowe – jako wnioskodawca i kierownik .....                                                                                                                                          | 72 |
| 5.3. Projekty naukowe – jako wykonawca .....                                                                                                                                                         | 73 |
| 6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych, popularyzujących naukę lub sztukę ..                                                                                                   | 76 |
| 6.1. Prowadzenie zajęć dydaktycznych .....                                                                                                                                                           | 76 |
| 2021/22 .....                                                                                                                                                                                        | 77 |
| 6.2. Opieka na stażystami .....                                                                                                                                                                      | 77 |

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.3. Opiekun naukowy i promotor prac magisterskich .....                                                                                                | 77 |
| 6.4. Opiekun naukowy i współpromotor prac magisterskich studentów zagranicznych .....                                                                   | 77 |
| 6.5. Promotor pomocniczy prac doktorskich .....                                                                                                         | 77 |
| 7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej..... | 78 |

## 1. Imię i nazwisko

Wojciech Andrzej Filipiak

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne

Z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**09.06.2006 – tytuł zawodowy magistra chemii**, Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (Polska)

Tytuł pracy: Oznaczanie lotnych związków organicznych za pomocą sprzężonych technik chromatograficznych GC/MS

Promotor: Prof. dr hab. Bogusław Buszewski,

Recenzenci: Prof. dr hab. Bogusław Buszewski, prof. dr hab. Artur Terzyk

**09.12.2013 – stopień naukowy doktora nauk przyrodniczych**, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Leopold-Franzens-Universität Innsbruck (Austria)

Tytuł pracy: Breath Analysis: origin and application of volatile biomarkers for non-invasive diagnosis of lung diseases

Promotor: Prof. dr hab. Anton Amann,

Recenzenci: Prof. dr hab. Jacek Namieśnik, prof. dr hab. Ladislav Sojak

Egzaminy doktorskie zostały **obronione z wyróżnieniem**, a pracę doktorską dodatkowo **wyróżniono nagrodą Austriackiego Stowarzyszenia Przeciwdziałania Nowotworom** (Österreichische Krebshilfe Tirol) za najlepszą rozprawę doktorską w 2013r. bezpośrednio związaną z badaniami onkologicznymi.

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

Zatrudnienie:

**10. 2006 – 12. 2008**, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria, Researcher.

Zadania: opracowanie protokołu analitycznego PTR-MS, SIFT-MS i TD-GC-MS do analiz biomarkerów raka płuc.

**01. 2009 – 11. 2012**, Breath Research Unit of the Austrian Academy of Sciences, Innsbruck / Dornbirn, Austria, Researcher.

Zadania: jakościowa i ilościowa analiza oddechu metodą PTR-MS wraz ze szczegółowym wyznaczaniem wzorców fragmentacji MS dla poprawnej dekonwolucji sygnałów.

**11. 2012 – 06. 2015**, Oncotyrol – Center for Personalized Cancer Medicine, Innsbruck, Austria, Senior Researcher.

Zadania: analiza LZO w oddechu pacjentów z chorobami płuc (POChP, rak płuc, infekcje bakteryjne) oraz w próbkach tkanek płuc (od pacjentów chorych na raka płuc) technikami NTME-GC-MS, TD-GC-MS, TD-GC-TOF-MS i PTR-TOF-MS.

**11. 2014 – 04. 2017**, Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Innsbruck, Austria, Senior Researcher.

Zadania: oznaczanie lotnych metabolitów związanych ze stanami patologicznymi, wnioskowanie o projekty (FWF, FFG, ÖNB, ERA-NET), terminowe realizowanie i raportowanie projektów, nadzór nad studentami (projektowanie prac laboratoryjnych, opieka naukowa prac licencjackich i magisterskich).

**09. 2017 – do dzisiaj**, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej, Bydgoszcz, Polska, wykładowca / adiunkt.

Zadania: Zajęcia dydaktyczne ze studentami (kierunki: Farmacja, Kosmetologia); nadzór nad studentami (projektowanie i nadzór prac magisterskich); wnioskowanie, koordynowanie, realizowanie i raportowanie projektów skupionych na badaniach podstawowych i translacyjnych (NCN).

#### **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 2021 r. poz. 478 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. Pierwsze osiągnięcie naukowe – cykl publikacji

##### 4.1.1. Tytuł cyklu habilitacyjnego

Pierwsze osiągnięcie to cykl dziewięciu prac powiązanych tematycznie objętych wspólnym tytułem:

### **Metabolomika oddechu: integracja metod i modeli biologicznych w diagnostyce spersonalizowanej**

##### 4.1.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Wszystkie prace składające się na cykl habilitacyjny zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach obecnych w bazie Journal Citation Reports (JCR). Łączny wskaźnik oddziaływania (ang. impact factor, IF) publikacji z cyklu wynosi **48.513**, natomiast punktacja Ministerstwa Nauki i Edukacji to **895 punktów**. W ośmiu publikacjach jestem pierwszym autorem, a w jednej pełnię rolę „senior author”, za każdym razem będąc osobą odpowiedzialną za zaplanowanie oraz przeprowadzenie eksperymentów, analizę danych jak i pisanie manuskryptów. W sześciu z poniższych publikacji pełniłem też rolę autora korespondencyjnego.

**A-1 Filipiak W**, Filipiak A, Sponring A, Schmid T, Zelger B, Ager C, Kłodzinska E, Denz H, Pizzini A, Lucciarini P, Jamnig H, Troppmair J, Amann A

*Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers*

Journal of Breath Research vol. 8 (2014) 027111 (13pp)

**IF: 4,631      MNiSW: 35      cytowań: 139**

**A-2 \*Pizzini A, \*Filipiak W**, Wille J, Ager C, Wiesenhofer H, Kubinec R, Blaško J, Tschurtschenthaler C, Mayhew C, Weiss G, Bellmann-Weiler R

*Analysis of volatile organic compounds in the breath of patients with stable or acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease*

Journal of Breath Research 2018, vol. 12 nr 3: 036002

**\*equal contribution**

**IF: 3,0      MNiSW: 40      cytowań: 68**

**A-3 Filipiak W, Bojko B**

*SPME in clinical, pharmaceutical, and biotechnological research - How far are we from daily practice?*

Trends in Analytical Chemistry 2019, vol. 115, s. 203-213

**IF:** 9,801      **MNiSW:** 140      **cytowań:** 58

**A-4 Filipiak W, Jaroch K, Szeliska P, Żuchowska K, Bojko B**

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

Metabolites, 2021, vol. 11, nr 10, s.1-16

**IF:** 5,581      **MNiSW:** 100      **cytowań:** 14

**A-5 Filipiak W, Çakmakçı M, Sevgen S, Szeliska P, Jaroch K, Kara A, Kahremanoğlu K, Bojko B, Boyaci E**

*Assessment of thermal and solvent stable SPME fibers for volatilome investigation through in vitro experiments with cancer cell lines*

Analytica Chimica Acta 1378 (2025) 344708

**IF:** 6.0      **MNiSW:** 100      **cytowań** 0

**A-6 Filipiak W, Żuchowska K, Marszałek M, Depka D, Bogiel T, Warmuzińska N, Bojko B**

*GC-MS profiling of volatile metabolites produced by Klebsiella pneumoniae*

Frontiers in Molecular Biosciences, 2022, vol. 9, s.1-21

**IF:** 5,0      **MNiSW:** 140      **cytowań:** 27

**A-7 Żuchowska K, Tracewska A, Depka-Radzikowska D, Bogiel T, Włodarski R, Bojko B, Filipiak W**

*Profiling of Volatile Metabolites of Escherichia coli Using Gas Chromatography – Mass Spectrometry*

International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26 (17), 8191

IF: 5,0      MNiSW: 140      cytowań: 2

**A-8    Filipiak W,** Wenzel M, Ager C, Mayhew C, Bogiel T, Włodarski R, Nagl M

*Molecular analysis of metabolites synthesized by Candida albicans and Staphylococcus aureus in in vitro cultures and bronchoalveolar lavage specimens reflecting single or duo-factor pneumonia*

Biomolecules 2024, 14(7), 788

IF: 4,8      MNiSW: 100      cytowań: 7

**A-9    Filipiak W,** Włodarski R, Żuchowska K, Tracewska A, Winiarek M, Daszkiewicz D, Marszałek M, Depka D, Bogiel T

*Analysis of Bacterial Metabolites in Breath Gas of Critically Ill Patients for Diagnosis of Ventilator-Associated Pneumonia—A Proof of Concept Study*

Biomolecules, 2024, 14(12), 1480

IF: 4,8      MNiSW: 100      cytowań: 7

#### **4.1.3. Omówienie osiągnięcia naukowego będącego cyklem prac naukowych**

##### ***Wprowadzenie do cyklu habilitacyjnego***

Choroby układu oddechowego należą do najistotniejszych problemów zdrowia publicznego na świecie, a ich diagnostyka i monitorowanie wciąż wymagają poprawy skuteczności, szczególnie w przypadku: raka płuc, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) oraz infekcji bakteryjnych, w tym zapalenia płuc. W każdej z tych jednostek klinicznych wczesna i precyzyjna diagnoza ma kluczowe znaczenie dla rokowania pacjentów, jednak dostępne obecnie narzędzia diagnostyczne często wdrażane są zbyt późno (gdy choroba jest już w zaawansowanym stadium) i dodatkowo wiążą się z istotnymi ograniczeniami, m.in.: wysoką inwazyjnością, wysokimi kosztami lub niewystarczającą swoistością. Z tego względu wszystkie prace niniejszego cyklu habilitacyjnego skupione są właśnie na tych trzech jednostkach chorobowych.

Rak płuca jest jednym z najczęściej rozpoznawanych nowotworów, a jednocześnie stanowi główną przyczynę zgonów związanych z nowotworem na świecie. Jego diagnostyka opiera się na histopatologicznym badaniu mikroskopowym tkanki guza pobranej podczas inwazyjnych procedur bronchoskopii albo biopsji cienko- lub gruboigłowej, a w niektórych przypadkach pobranej podczas operacji. Z racji, iż taka strategia pozwala na diagnozę jedynie zaawansowanego stadium choroby nowotworowej, często stosowane są metody wczesnego obrazowania za pomocą niskodawkowej tomografii komputerowej (CT, ang. Computed Tomography) lub emisyjnej tomografii pozytronowej (PET, ang. Positron Emission Tomography) również ze skanowaniem CT (PET/CT). Niemniej jednak, metody te wymagają bardzo zaawansowanej (a przez to bardzo kosztownej) aparatury oraz wyszkolonych i doświadczonych specjalistów do prawidłowej interpretacji wyników.

POChP jest przyczyną większości przypadków przewlekłej choroby układu oddechowego (CRD, ang. Chronic Respiratory Disease) w Europie i jest bezpośrednio odpowiedzialna za 80% zgonów związanych z CRD. Według raportu WHO z 2025 r., prognozy wskazują, że w latach 2020–2050 liczba przypadków POChP na całym świecie wzrośnie o 23%. Jako przewlekła choroba przebiegająca z postępującą obturacją dróg oddechowych (trwałym zawężeniem ich światła / drożności), jest obciążona ryzykiem gwałtownych zaostrzeń (AECOPD, ang. Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease), które stanowią istotny czynnik śmiertelności i pogorszenia jakości życia pacjentów. Diagnostyka AECOPD jest niemal wyłącznie kliniczna, a brak biomarkerów różnicujących stany stabilne od zaostrzeń prowadzi do nadużywania antybiotykoterapii, przyczyniając się do eskalacji globalnego problemu oporności bakteryjnej na znane antybiotyki.

Infekcje bakteryjne dolnych dróg oddechowych, w tym zapalenie płuc nabyte w szpitalu (HAP, ang. Hospital-Acquired Pneumonia), a zwłaszcza związane ze mechaniczną wentylacją (VAP, ang. Ventilation-Associated Pneumonia), są równie ważnym wyzwaniem, gdyż dotyczą pacjentów znajdujących się już w stanie krytycznym, istotnie zwiększając ryzyko ich śmiertelności. Obecne metody diagnostyczne opierają się głównie na badaniach mikrobiologicznych bronchoaspiratów lub popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL, ang. Broncho-Alveolar Lavage). Choć metody te pozostają „złotym standardem”, są czasochłonne (wyniki laboratoryjne dostępne są dopiero po dwóch dniach), wymagają inwazyjnych procedur pobierania materiału BAL do badań i mają ograniczoną czułość, szczególnie u pacjentów w trakcie antybiotykoterapii (u których często obserwuje się fałszywie ujemne wyniki posiewów mikrobiologicznych). Szybkie potwierdzenie zakażenia bakteryjnego czy ocena odpowiedzi na antybiotykoterapię nadal pozostają nieosiągalne w codziennej praktyce klinicznej.

Wszystkie wyżej wymienione obszary kliniczne łączy wspólny problem: pilna potrzeba opracowania nowych, czułych metod diagnostycznych, które ze względu na niskie koszty i całkowicie nieinwazyjny charakter można by stosować wielokrotnie u pacjentów w każdym stanie zdrowotnym, zarówno w diagnostyce różnicowej jak i do monitorowania terapii. W tym aspekcie, coraz większą uwagę na świecie skupiają metody bazujące na metabolomice, dziedzinie nauki zajmującej się jakościowym, lecz także ilościowym charakteryzowaniem niskocząsteczkowych produktów (tzw. metabolitów) poszczególnych procesów komórkowych. Dla poszukiwania innowacyjnych metod diagnostycznych ważna jest również metabonomika, jako nauka bardziej ogólna od metabolomiki, gdyż skupiająca się na dynamicznej reakcji metabolicznej organu (a nawet całego organizmu) w odpowiedzi na bodźce, w tym także patofizjologiczne, co może pomóc w stratyfikacji pacjentów i wskazać osoby wymagające spersonalizowanych strategii leczenia. Niemniej to metabolomika poprzez monitorowanie profilu niskocząsteczkowych metabolitów może dostarczyć biochemicznych informacji o mechanizmie choroby, aktualnej aktywności procesów patofizjologicznych czy odpowiedzi na zastosowaną terapię. Jednym z najbardziej obiecujących, a zarazem intensywnie eksplorowanych obszarów badań wpisujących się w ten kierunek jest analiza lotnych związków organicznych w wydychanym powietrzu. Podejście to ma oczywiste zalety, takie jak całkowita bezinwazyjność, nieograniczona wręcz ilość możliwej do pobrania próbki czy prostota procedury analitycznej z opcją jej automatyzacji. Ma to ogromne znaczenie dla komfortu pacjenta i jego bezpieczeństwa, co umożliwić by mogło zastosowanie takiej metody zarówno w badaniach profilaktycznych, jak i monitorowaniu spersonalizowanej terapii.

Pomimo tych cech niewiele jest tzw. testów oddechowych używanych w praktyce klinicznej. Zaliczyć do nich można m.in. test oddechowy do diagnozy zespołu rozrostu bakteryjnego jelita cienkiego (SIBO, ang. *Small Intestinal Bacterial Overgrowth*) poprzez pomiar stężenia wydychanego wodoru (> 20 ppm) i metanu (> 10 ppm) w wydychanym powietrzu po spożyciu przez pacjenta określonego cukru (laktulozy lub glukozy); wykrywanie bakterii *Helicobacter pylori* w przewodzie pokarmowym poprzez wykrycie znakowanego izotopem  $^{13}\text{CO}_2$  po spożyciu mocznika znakowanego  $^{13}\text{C}$ , rozkładanego przez bakteryjne ureazy, czy np. wspomagający test przy diagnozie astmy przez pomiar stężenia tlenku azotu (NO) w oddechu, jako markera stanu zapalnego dróg oddechowych. Niemniej jednak, pomimo licznych badań, do dzisiaj nie ma testu oddechowego o potwierdzonym znaczeniu klinicznym pozwalającego na rozpoznanie wcześniej wymienionych, najczęstszych chorób układu oddechowego, tj. nowotworu płuc, POChP i bakteryjnego zapalenia płuc. Wynika to ze stopnia skomplikowania badań metabolomicznych, w którym wskazanie konkretnych biomarkerów

umożliwiających funkcjonalny odczyt aktywności stanu chorobowego jest złożonym procesem, wymagającym wieloetapowego procesu walidacyjnego, uwzględniającego m.in. bezsprzeczną identyfikację samych analitów, udowodnienie ich istotności (i swoistości) biologicznej względem rozpatrywanej choroby, zbadanie czynników wpływających na ich stężenia oraz potwierdzenie klinicznego znaczenia na odpowiedniej populacji pacjentów.

Jednym z podstawowych modeli w pierwszym etapie takiego postępowania są eksperymenty *in vitro*, przeprowadzone w odpowiednio dobranych warunkach, z użyciem np. linii komórkowych, hodowli bakteryjnych lub grzybiczych. Na tym etapie możliwe jest precyzyjne przypisanie zidentyfikowanych związków chemicznych do konkretnego źródła np. szczepu bakterii lub linii komórek nowotworowych, a także scharakteryzowanie czynników wpływających na ich metabolizm (np. dostępność różnych substratów, dodatek do hodowli określonego leku). Modele te stanowią zaledwie wstępną aproksymację potencjalnych biomarkerów, w warunkach pełnej kontroli zmiennych biologicznych i wymagają dalszego potwierdzenia w badaniach *ex vivo*, w których analizie poddany jest materiał biologiczny pozyskany klinicznie, najlepiej wydzieliny lub tkanki ludzkie pobrane w trakcie zabiegów chirurgicznych. Wyniki tych eksperymentów zyskują dodatkowe znaczenie, jeśli oprócz tkanek zmienionych chorobowo badane są dodatkowo próby referencyjne tkanek zdrowych. Etap ten stanowi pomost pomiędzy modelem kontrolowanym, a rzeczywistością kliniczną. Umożliwia on ocenę czy metabolity zidentyfikowane w eksperymentach przeprowadzonych w optymalnych warunkach mogą być wykryte również w bardziej złożonych próbkach biologicznych, przy dużej zawartości zarówno substancji interferujących (utrudniających analizę) jak i modulujących stężenia metabolitów (enzymy, komórki układu odpornościowego). W większości przypadków, końcową fazą badań metabolomicznych (w zasadzie już metabonomicznych) jest potwierdzenie związku między wstępnie wyselekcjonowanymi analitami a rozpatrywanym stanem chorobowym pacjenta, co możliwe jest tylko poprzez badania *in vivo* na odpowiednich grupach pacjentów. Każdy z tych etapów: wstępne badania *in vitro*, translacyjne *ex vivo* i kliniczne ewaluacje *in vivo* wymagają prawidłowo dobranych i zoptymalizowanych procedur analitycznych. Przy ich opracowaniu często niezbędna jest daleko idąca modyfikacja dostępnych technik, jednak z zachowaniem pełnej kompatybilności zarówno do badanej próbki, jak i instrumentów analitycznych oraz wysokiego poziomu ekstrapolacji *in vitro* – *in vivo*.

Omówiona powyżej struktura badań została w pełni zaadaptowana w niniejszym cyklu habilitacyjnym, determinując jego podział na kolejne etapy, mianowicie:

#### **Etap 1** - Fundamenty biologiczne lotnych metabolitów jako potencjalnych biomarkerów

**Etap 2** - Rozwój metodologii analitycznej

**Etap 3** - Metabolomika mikroorganizmów w modelach *in vitro* i *ex vivo*

**Etap 4** - Translacyjne badanie kliniczne

Czasami jednak, pomimo poprawności koncepcji i planu badań, założone cele badawcze, zwłaszcza w części klinicznej, są jedynie częściowo zrealizowane, bowiem na tym właśnie etapie ujawniają się wszystkie ograniczenia translacyjne, od wpływu zmienności międzyosobniczej, przez obecność innych (niż patofizjologiczne) endogennych źródeł metabolitów, chorób współistniejących, po czynniki interferujące z otoczenia klinicznego (egzogenne artefakty). Pilotażowe badania kliniczne ukazać też mogą ograniczenia metodologiczne czy niewystarczającą wiedzę biologiczną, co skłania do usprawnienia warsztatu analitycznego (zwłaszcza technik poboru i przygotowania próbek) oraz ponownego rozpatrzenia aspektów biologicznych (przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów *in vitro* / *ex vivo*), celem dokładnego zweryfikowania związku między oznaczanymi metabolitami a danym procesem patofizjologicznym. W efekcie, badania metabolomiczne, a więc i prezentowany tu cykl habilitacyjny, często nie mają chronologicznie liniowej struktury, lecz układ spiralny, wzajemnie się uzupełniających eksperymentów.

#### ***Etap 1 - Fundamenty biologiczne lotnych metabolitów jako potencjalnych biomarkerów***

**[A-1]:**

***Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers***  
**Journal of Breath Research 8 (2014) 027111, doi:10.1088/1752-7155/8/2/027111**

Podczas mojego zatrudnienia w latach 2012-2014 w Austriackiej Akademii Nauk oraz instytucie badawczym ONCOTYROL – Center for Personalized Cancer Medicine GmbH, a jednocześnie pracy w grupie badawczej Prof. Antona Amanna (założyciela Międzynarodowego Stowarzyszenia Badań Oddechu – IABR, International Association for Breath Research) miałem przyjemność uczestniczenia w pionierskich projektach naukowych skupionych na zastosowaniu analizy oddechu w diagnostyce raka płuc. Dzięki temu pozyskałem cenną wiedzę i umiejętności w pracy z różnymi technikami spektrometrii mas (SIFT-MS, PTR-MS, IMS) oraz technikami ekstrakcyjnymi dla analiz off-line (GC-MS), a także planowaniu i wykonywaniu wysoce interdyscyplinarnych badań, również klinicznych. Jednym z tych przedsięwzięć był projekt Oncotyrol Phase II, Area 1: Biomarker and Drug Target Identification (będącego częścią austriackiego programu COMET), w ramach którego

zapropnowałem koncepcję spójnego modelu, umożliwiającego wykazanie nowotworowego pochodzenia lotnych metabolitów poprzez równoległą analizę trzech poziomów biologicznych: hodowli komórkowych, tkanek płuca oraz oddechu pacjentów. W celu tak pojętej wielopoziomowej ewaluacji biomarkerów LZO, dla każdej z trzech wymienionych matryc biologicznych planowałem pozyskanie badanej próby „nowotworowej” i referencyjnej próby kontrolnej (nienowotworowej). Z racji, iż eksperymenty *in vitro* z liniami komórkowymi nowotworu płuc (A549, CALU-1, NCI-H1666, NCI-H2087) oraz ich nienowotworowymi komórkami referencyjnymi (nabłonka oskrzeli HBEpC i ludzkich fibroblastów hFB) ukończone zostały (i opublikowane) jeszcze w trakcie mojego doktoratu (hodowle 3D, które w największym stopniu odzwierciedlają namnażanie i metabolizm nowotworów), plan sprowadzał się do wykonania eksperymentów *ex vivo* z tkankami płuca (zdrowego i nowotworu) pobranymi od tego samego pacjenta (donora) podczas operacji lobektomii oraz badań *in vivo* z oddechami pacjentów raka płuc i odpowiednio dopasowanej grupy kontrolnej osób zdrowych. Po przedyskutowaniu planu z moimi mentorami: Prof. Jakobem Troppmair’em i Prof. Antonem Amannem, w tym aspektów zapewnienia i sprawdzenia żywotności tkanki podczas transportu i przygotowania do ekstrakcji, a także korygowania stężeń LZO w oddechach względem powietrza inhalowanego (jeszcze przed porównaniem oddechów obu grup pacjentów), otrzymałem od nich zgodę na przeprowadzenie badań.

Celem zachowania pełnej spójności analitycznej dla całej wielopoziomowej ewaluacji biologicznego pochodzenia metabolitów, z zachowaniem stałych zakresów limitów detekcji i rozdzielania chromatograficznego (wpływającego na identyfikację LZO), protokół metodologiczny został w miarę możliwości jak najbardziej ujednolicony (zarówno pod względem analizy instrumentalnej, jak i statystycznej). Do ekstrakcji wszystkich próbek używałem zawsze tego samego składu rurek wielosorbentowych (Tenax TA – Carboxen 569 – Carboxen 1000), a do analizy instrumentalnej użyłem jednej metody uważnie dobierając warunki analityczne, w tym optymalizując parametry desorpcji termicznej, krioskupiania i wtórnej desorpcji, programu temperaturowego kolumny GC dla osiągnięcia najlepszej separacji chromatograficznej i parametry detekcji spektrometrem mas. Korzystając z tego samego aparatu TD-GC-MS, przeprowadziłem analizy chromatograficzne wszystkich zebranych próbek oraz osobne analizy wzorców celem potwierdzenia czasów retencji dla prawidłowej identyfikacji metabolitów, a także kalibracji dla ilościowego oznaczenia wybranych związków. Ponadto uczyłem, a potem nadzorowałem prace współpracowników (A. Filipiak, A. Sponring) w zakresie interpretacji danych chromatograficznych.

Pozyskanie tkanek płuc umożliwili mi chirurdzy Prof. Thomas Schimd i Dr Paolo Lucciarini z Kliniki Chirurgii Wisceralnej, Transplantacyjnej i Klatki Piersiowej Szpitala Uniwersyteckiego w Innsbrucku. W tym celu udawałem się do sali operacyjnej i obserwowałem zabiegi lobektomii, aby w odpowiednim momencie osobiście odebrać tkanki płuc od wszystkich pacjentów włączonych w badania (n=14), zabezpieczałem je w przenośnej łaźni lodowej i transportowałem je do patologa (Prof. Bettina Zelger) celem wyodrębnienia części użytecznej do dalszych badań metabolomicznych. Otrzymane od patologa próbki tkanek płuc (nowotworowe i zdrowe) wstępnie obmywałem a następnie umieszczałem w zimnym roztworze PBS, dodatkowo przechowywanym w lodzie (celem zahamowania lub przynajmniej znacznego spowolnienia metabolizmu przy niskiej temperaturze 0°C oraz wypłukania pozostałości metabolomu zewnątrzkomórkowego z krwi – aby uniknąć kontaminacji próbki przez metabolity pochodzące z innych źródeł niż badana tkanka). W ciągu 30 minut od chirurgicznej resekcji tkanka była już przeze mnie przyniesiona do laboratorium, gdzie natychmiast poddawałem ją ekstrakcji LZO. Żywotność tkanek po zakończonej ekstrakcji LZO oznaczono w pilotażowym badaniu za pomocą mikroskopii konfokalnej dzięki uprzejmości dr Martina Hermanna z Uniwersytetu Medycznego w Innsbrucku. Używając metody barwienia za pomocą SYTO16 (barwnik zielony) wszystkich jąder komórkowych w tkance w odniesieniu do barwienia jodkiem propidyny (barwnik czerwony) tylko jąder martwych komórek, potwierdzono, że ponad 75% komórek w tkance płuc przeżyło całą procedurę analityczną.

Ekstrakcja LZO z tkanek płuc wymagała eksperymentalnego systemu, który samodzielnie zaprojektowałem i skonstruowałem, a protokół analityczny zoptymalizowałem bazując na uprzednio przeprowadzonej szczegółowej charakterystyce zarówno sorbentów, jak i sposobów redukcji sorpcji wody. Drugi z wymienionych czynników miał szczególne znaczenie, ze względu na zastosowane do ekstrakcji węglowe sita molekularne (Carboxen 569, Carboxen 1000), charakteryzujących się wysoką wydajnością sorpcji dla bardzo lotnych (niskocząsteczkowych) LZO, ale też znaczną adsorpcją wody, która powoduje szereg efektów niepożądanych na każdym etapie analizy: począwszy znacznego zmniejszenia wydajności sorpcji (wysycenie sorbentu, wypieranie analitów już zaadsorbowanych), przez problemy z desorpcją termiczną (tworzenie lodu w pułapce do krioskupiania desorbowanych z rurki analitów, awaryjność zaworów magnetycznych split-splitless), problemy z rozdziałem chromatograficznym (ryzyko uszkodzenia fazy stacjonarnej kolumn PLOT, przesunięcia czasów retencji utrudniające identyfikację analitów), na problemach z detekcją kończąc (zakłócenie płomienia w FID, oksydacja filamentów w źródle jonów MS i szybkie skracanie czasu pracy powielacza elektronów w MS). Spośród przetestowanych przez mnie metod

redukcji sorpcji wody wybrałem opcję „dry-dilution”, w myśl której strumień gazu nośnego przepływającego fazę nadpowierzchniową próbki zamkniętej w szklanej fiole (tzw. DHS, Dynamic Headspace Sampling) jest następnie rozcieńczany (tu: w stosunku 1:6) suchym gazem obojętnym o wysokiej czystości. Aby wykluczyć zanieczyszczenie badanej próbki i uniknąć nekrozy tkanki płuc, jako gazu nośnego do DHS użyto syntetycznego powietrza o czystości 5.5 dodatkowo oczyszczanego na filtrach Supelcarb, zaś do „dry-dilution” użyto azotu czystości 6.0 dodatkowo oczyszczonego na złożu węglowych sit molekularnych (Carboxen 1000). Linie transferowe (kapilary wykonane z inertnego chemicznie teflonu) utrzymano w podwyższonej temperaturze 40 °C, aby zapobiec kondensacji wody i ubytkowi analitów polarnych. Rozcieńczenie próbki headspace suchym azotem pozwoliło na zmniejszenie wilgotności względnej adsorbowanej mieszaniny gazów poniżej wartości progowej charakterystycznej dla danego węglowego sita molekularnego, zapobiegając kondensacji wody w rozwiniętej strukturze mikroporowatej powierzchni sorbentu. W rezultacie nie tylko wyeliminowano w/w niepożądany wpływ wody na analizę instrumentalną, lecz też zwiększono wydajność sorpcyjną złoża (brak wysycenia, brak wypierania zaadsorbowanych LZO).

Kolejnym wyzwaniem metodologicznym niniejszej pracy zapewnienie prawidłowego poboru próbek, nie tylko poprzez zastosowanie protokołu uwzględniającego wpływ aktywności fizycznej na skład wydychanego powietrza (przebadany w moich poprzednich pracach), ale także stworzenie zupełnie nowego, pionierskiego urządzenia do zautomatyzowanego pobierania oddechu (BSD, Breath Sampling Device), które po raz pierwszy przetestowano w warunkach klinicznych. Urządzenie to generowało podciśnienie w komorze, w której zamknięty był worek tedlarowy podłączony za pomocą ogrzewanych, teflonowych kapilar do ustnika, przy którym podłączony był czujnik podczerwieni (IRMA, InfraRed Mainstream Analyser) do pomiaru stężenia CO<sub>2</sub> w strumieniu gazu w czasie rzeczywistym. Przy przekroczeniu wartości progowej stężenia wydychanego CO<sub>2</sub>, mikroprocesorowy sterownik otwierał elektrozawory wbudowane w teflonowe linie transferowe, umożliwiając pobranie do worka tedlarowego tylko części pęcherzykowej wydechu (tzw. end-tidal air) w sposób powtarzalny i niezależny od reakcji operatora. Istotnym aspektem były dwa tryby pracy urządzenia BSD: (1) pobieranie oddechu po przekroczeniu stałego progu (określanego przez operatora) stężenia CO<sub>2</sub> w wydychanym powietrzu lub (2) malejącej jego zawartości, po przekroczeniu >80% stężenia CO<sub>2</sub> z poprzedzającego oddechu. Drugi wariant okazał się szczególnie przydatny u pacjentów z niewydolnością oddechową, zwłaszcza u osób starszych. W niniejszym badaniu porównałem dwie techniki pobierania oddechu: metodą klasyczną za pomocą zwykłej plastikowej słomki (bez kontroli CO<sub>2</sub>) i za pomocą nowo skonstruowanego

urządzenia BSD. W tym celu pobrano próbki oddechu od 28 zdrowych wolontariuszy, przy czym parametry procedury analitycznej (dotyczące transportu worków tedlarowych do laboratorium, ekstrakcji LZO na rurkach sorpcyjnych i analizy GC-MS) były we wszystkich analizach identyczne, a jedyna różnica między porównywanymi grupami dotyczyła tylko sposobu poboru próbki oddechu. Zgodnie z przedstawionymi w pracy wynikami, metoda wykorzystująca BSD pozwalała wykryć większą liczbę LZO w oddechu (176 związków obecnych w przynajmniej 10% badanych próbek, wobec 152 związków dla próbek pobranych klasycznie). Co więcej, ilości aż 38 spośród tych analitów były statystycznie wyższe w próbkach oddechów pobranych z BSD niż próbkach powietrza mieszanego pobranego bez kontroli CO<sub>2</sub> (w tym także metabolitów oznaczanych w tkankach płuc w badaniach *ex vivo*). Również częstotliwość wykrywania związków w oddechu była wyższa, gdy próbki pobierano z użyciem BSD. Z drugiej strony, zaobserwowano 25 związków na istotnie wyższych poziomach w próbkach pobranych klasycznie, jednak w większości były to znane artefakty egzogenne lub zanieczyszczenia powietrza w pomieszczeniach (chlorowane i fluorowane węglowodory, związki aromatyczne, itp.).

Na podstawie przeprowadzonego porównania technik, wnioskować należy, iż pobieranie oddechu nowo opracowanym urządzeniem zwiększa reprezentatywność i porównywalność wyników - do worka tedlarowego trafiała bowiem ta sama fizjologicznie faza powietrza pęcherzykowego (end-tidal air) zapewniając znaczną redukcję zanieczyszczeń egzogennych z objętości martwych górnych dróg oddechowych, a zarazem większą czułość analizy śladowych ilości endogennych LZO i ich spójność z pozostałymi matrycami. Z kolei zastosowanie zoptymalizowanej metody ekstrakcji na złożu wielosorbentowym z jednoczesną redukcją sorpcji wody pozwalała na równoczesną detekcję związków o szerokim zakresie masy cząsteczkowej, polarności i lotności, występujących w stężeniach śladowych (w zakresie ppt–ppb) z wysoką powtarzalnością (<10% RSD). Wobec powyższego w pilotażowych badaniach klinicznych, których celem była analiza porównawcza metabolitów w oddechach pacjentów z nowotworem płuc i osób zdrowych, próbki oddechu pobierano za pomocą nowo opracowanego urządzenia BSD.

Łącznie 36 pacjentów z nowotworem płuc zostało wyselekcjonowanych przez dr Huberta Denza i dr Herberta Jamniga w Katedrze Pneumonologii w Natters Szpitala Uniwersyteckiego w Innsbrucku (Austria) na podstawie pozytywnych wyników obrazowania technikami CXR, CT lub PET/CT oraz badania histologicznego (plwocina, bronchoskopia lub biopsja), a wszystkie próbki oddechu pobierał dr Alex Pizzini (z tej samej jednostki). Grupa kontrolna osób zdrowych obejmowała 12 mężczyzn (22–87 lat) i 16 kobiet (22–78 lat) bez

chorób ani urazów płuc. Kryteriami wykluczenia dla obu grup były: wcześniejsze chirurgiczne wycięcie guza (segmentektomia lub lobektomia) oraz czynne palenie papierosów.

Z racji, iż tematem przewodnim artykułu była analiza LZO emitowanych z tkanek płuc, a pozostałe matryce biologiczne traktowano jako dodatkowe potwierdzenie nowotworowego pochodzenia związków, dyskusja sprowadzała się tylko do lotnych metabolitów pierwotnie wykrytych w tkankach płuc, pomimo iż ilość związków wykrywanych w próbkach oddechów była znacznie większa (ponad 100 związków na każdą próbkę oddechu).

Porównując 14 par tkanek płucnych (nowotworowych i zdrowych) pobranych podczas operacji lobektomii, zidentyfikowałem łącznie 39 związków, spośród których 25 związków wykryto w przynajmniej 50% populacji próbek. Obliczenia statystyczne, wykonane przez mgr Clemensa Agera, wykazały, że spośród 30 związków, których ilości w próbkach headspace tkanek nowotworowych były większe niż w kontrolnych tkankach zdrowych, statystyczną istotność ( $p < 0.05$  testu Kruskal-Wallisa) zaobserwowano dla 6 metabolitów: etanolu, pirydyny, 2-hexanonu, 4-methylheptanu, acetaldehydu i *n*-oktanu. Najważniejszą obserwacją było pełne pokrywanie się profilu metabolitów we wszystkich trzech matrycach biologicznych (komórki, tkanki, oddechy) dla etanolu i *n*-oktanu, przy czym statystycznie istotnie wyższe stężenia tych metabolitów stwierdzono zawsze w próbkach nowotworowych, w porównaniu z kontrolnymi próbkami zdrowymi (dla każdej z matryc). Co istotne, związki te były już wcześniej sugerowane w literaturze jako powiązane z nowotworem (płuc, ale też wątroby), przy czym doniesienia te bazowały tylko na pojedynczej matrycy biologicznej.

Należy jednak zwrócić uwagę również na pozostałe lotne metabolity, których zgodność nie była pełna pomiędzy wszystkimi trzema poziomami biologicznymi (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*). Doskonałymi przykładami tej grupy związków są 2-metylo-1-penten, 4-metylooktan i 2,4-dimetyloheptan, dla których zaobserwowano dobrą zgodność między eksperymentami *ex vivo* (tkanki) i *in vitro* (linie komórkowe), lecz ich poziomy *in vivo* (w oddechach) nie osiągnęły statystycznie istotnej różnicy pomiędzy pacjentami z rakiem płuc, a osobami zdrowymi. Różnice te są spodziewane i biologicznie uzasadnione, gdyż wynikają z odmiennych warunków fizjologicznych i metabolicznych panujących w hodowlach komórkowych, w tkance nowotworowej oraz w całym organizmie ludzkim. W warunkach *in vitro* profile LZO odzwierciedlają jedynie część rzeczywistych procesów zachodzących w tkance, gdyż metabolizm komórek nowotworowych przebiega w optymalnych warunkach: nieograniczonym dostępem do tlenu i składników odżywczych oraz środowisku pozbawionym złożonych interakcji z komórkami granicznymi guza czy układem immunologicznym. Z kolei w

warunkach *ex vivo*, a zwłaszcza *in vivo* metabolizm komórek jest modulowany przez kwasowe mikrośrodowisko nowotworu, stan zapalny i stres oksydacyjny czy w końcu niedotlenienie wewnątrz guza, które przekierowują całe szlaki metaboliczne, np. w kierunku pozyskania energii z glikolizy (efekt Warburga) dostarczającej dodatkowo substraty do syntezy nowych cząsteczek, co wspiera szybki wzrost nowotworu. Ponadto, w organizmie żywym, stężenia LZO w oddechu są dodatkowo determinowane przez dyfuzję w tkance, rozpuszczalność w płynach ustrojowych, a także metabolizm wtórny i eliminację w narządach (głównie wątrobie). W efekcie, wiele metabolitów nowotworowych powstających lokalnie w komórkach nie osiąga w oddechu stężeń możliwych do detekcji.

Dlatego, mimo iż populacja badanych próbek (zarówno tkanek jak i oddechów od pacjentów) była w niniejszej pracy stosunkowo niewielka, to uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że zastosowanie wielopoziomowej ewaluacji jest słuszną strategią potwierdzenia biologicznego związku lotnych metabolitów z procesami patofizjologicznymi (tu: rozwojem nowotworu). Przypadek pirydyny, *n*-nonanu czy 2,3-butanedionu jasno wskazuje bowiem, iż sam eksperyment *in vitro* z liniami komórkowymi, może być niewystarczający dla wskazania kandydata na biomarker i dopiero potwierdzenie na innych matrycach biologicznych – jak zaprezentowane tu oddechy i tkanki płuc pozyskane od pacjentów z nowotworem – dostarcza dowodów na związek danego metabolitu z patogenezą choroby. Z drugiej strony, całkowita zgodność profili – zaobserwowana dla etanolu i *n*-oktanu – powinna być interpretowana jako bezsprzeczne potwierdzenie biologicznego pochodzenia tych związków (lecz niekoniecznie jednego), a tym samym ich potencjalnej wartości translacyjnej.

Niniejsza praca dostarcza więc bezpośredniego argumentu do kontynuacji badań zarówno w kierunku kolejnych eksperymentów *ex vivo* z materiałem ludzkim oraz *in vitro* z liniami komórkowymi, celem rozszerzenia portfolio znanych metabolitów pochodzenia nowotworowego (*vide*: pirydyna, butanedion), ale też w kierunku rozwoju nowych technik ekstrakcyjnych, celem zwiększenia czułości metody analitycznej i wykrycia związków na ultrasładowych stężeniach w próbkach (*vide*: stężenia wydychanego 2-metylo-1-pentenu).

Z powyższych względów, uznać należy, iż praca [A-1] stanowi podwaliny dla całego cyklu habilitacyjnego, definiując model ewaluacji biologicznego znaczenia lotnych metabolitów i ich powiązania z procesami chorobotwórczymi. Publikacja ta ustanowiła pierwsze standardy analityczne i metodologiczne (rozwijane jeszcze w kolejnych pracach), a jej wartość została doceniona przez środowisko naukowe, które cytowało niniejszy artykuł w

przeszło 130 innych artykułach. Przede wszystkim jednak, praca [J Breath Research 2014] zapoczątkowała koncepcję integracji wyników z hodowli komórkowych, materiałów biologicznych wyizolowanych od pacjentów oraz oddechów pacjentów w spójną ramę translacyjną, która to koncepcja została przeniesiona przeze mnie na obszar chorób zakaźnych i wykorzystana w kolejnych etapach cyklu habilitacyjnego (analiza metabolitów bakteryjnych w infekcjach szpitalnych).

[A-2]:

*Analysis of volatile organic compounds in the breath of patients with stable or acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease*

**Journal of Breath Research 12 (2018) 036002; doi: 10.1088/1752-7163/aaa4c5**

W przypadku drugiej z chorób dróg oddechowych rozpatrywanych w niniejszym cyklu habilitacyjnym, czyli przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, faza zaostrzenia AECOPD (ang. Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease) jest spowodowana gwałtownym nasileniem stanu zapalnego w drogach oddechowych wywołującym zwiększoną produkcję śluzu i wzrost jego lepkości oraz obrzęk błony śluzowej, prowadząc do jeszcze bardziej wzmożonej obturacji i duszności. W większości przypadków (56-83%) stan zapalny nasilony jest z powodu infekcji bakteryjnej (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*) lub wirusowej (*Rhinovirus*, *Influenza virus*, *RSV*, *Coronavirus*). W innych przypadkach wyzwalającym czynnikiem nieinfekcyjnym może być ekspozycja na zanieczyszczenia powietrza, przerwanie leczenia (nagłe odstawienie leków rozszerzających oskrzela lub glikokortykosteroidów wziewnych) oraz współistniejące choroby (zawał serca, zastoinowa niewydolność serca, zatorowość płucna). Około 30% stanów zaostrzenia to przypadki o nieznanej etiologii. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe, wg których lotne metabolity mogą odzwierciedlać aktualny stres oksydacyjny, nasilenie procesów zapalnych czy zaburzenia mikrobiomu i metabolizmu komórek nabłonkowych, postawiłem hipotezę, iż profil LZO w wydychanym powietrzu u pacjentów z AECOPD różni się istotnie od profilu pacjentów ze stabilną postacią choroby oraz od osób zdrowych, a identyfikacja specyficznych lotnych metabolitów może umożliwić opracowanie testu oddechowego o wartości diagnostycznej. Zatem celem kolejnego pilotażowego badania klinicznego było: (1) prawidłowe zidentyfikowanie lotnych metabolitów w oddechach pacjentów i ilościowe porównanie ich profili pomiędzy grupami badanymi, (2) zaproponowanie logicznej redukcji zmiennych (eliminację LZO zależnych od czynników zakłócających, takich jak palenie tytoniu i zanieczyszczenia środowiskowe), (3) wyłonienie związków lotnych swoistych dla AECOPD

oraz (4) ocena potencjału klasyfikacyjnego wyselekcjonowanych związków w diagnostyce zaostření POChP. Dodatkowym celem była (5) modyfikacja protokołu pobierania próbek oddechu poprzez wyeliminowanie worków tedlarowych (o limitowanej stabilności przechowywania próbek). Analogicznie do poprzedniej pracy w cyklu, również te badania były pionierskie w skali globalnej, a omawiany artykuł [A-2] (w którym pełniłem rolę współautora pierwszego, z równorzędnym wkładem „equal contribution”) był pierwszym, znanym mi wówczas, opublikowanym badaniem z chemiczną identyfikacją LZO za pomocą GC-MS, które bezpośrednio porównało oddech pacjentów z POChP w stanie stabilnym i fazie zaostření, podczas gdy poprzednie prace skupiały się na rozróżnieniu pacjentów z POChP od osób zdrowych lub stosowały elektroniczne sensory bez identyfikacji LZO w oddechu.

Pomimo, iż artykuł został złożony do czasopisma w roku 2017, czyli już podczas mojego zatrudnienia w Collegium Medicum UMK w Polsce, całość badań klinicznych przeprowadzono jeszcze w Innsbrucku (Austria) w okresie od lutego do lipca 2015r., kiedy byłem zatrudniony w Uniwersytecie Leopolda Franza na stanowisku Senior Scientist. Badania te możliwe były dzięki współpracy z lekarzami: dr Alex Pizzini, dr Johannes Wille, dr Christoph Tschurtschenthaler, prof. Günter Weiss i prof. Rosa Bellmann-Weiler, pracownikami Katedry Chorób Wewnętrznych II na Oddziale Chorób Zakaźnych, Pneumonologii i Reumatologii Uniwersytetu Medycznego w Innsbrucku, Austria. Łącznie w badaniach uczestniczyło 30 pacjentów POChP (16 w fazie stabilnej i 14 w fazie zaostření) oraz 24 zdrowych ochotników. Kryterium włączenia obejmowało 2. stopień w klasyfikacji GOLD (ang. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease), potwierdzony testem spirometrycznym by upewnić się, że spełniony jest wymagany stosunek  $FEV_1/FVC < 0.7$  (gdzie  $FEV_1$  to nasilona pierwszosekundowa objętość wydechu, a FVC to nasilona pojemność życiowa) oraz że wartość bazowa  $FEV_1$  jest  $< 80\%$  wartości należnej (tj. teoretycznej średniej wartości  $FEV_1$  dla danej płci i grupy wiekowej wśród zdrowych). Do rozpoznania fazy zaostření POChP zastosowano kryteria kliniczne (nasilenie duszności, kaszlu i wydzielania ropnej płwociny, świszczący oddech) oraz oznaczanie białka C-reaktywnego (CRP) niespecyficznego odzwierciedlającego stan zapalny. Sklasyfikowane stadia GOLD, określające wytyczne leczenia w zależności od obecności objawów i ryzyka zaostření, były równomiernie rozłożone w obu grupach pacjentów COPD, z najczęściej występującym stadium GOLD IV. Do pobierania próbek oddechu użyto znacznie zmienionego protokołu, w porównaniu do poprzedniego badania opublikowanego w [A-1]. Powietrze pęcherzykowe (end-tidal air), określane monitorowanym w czasie rzeczywistym stężeniem wydychanego  $CO_2$ , było ręcznie pobierane do sterylnych szklanych strzykawek o pojemności 250ml zamiast do worków

Tedlarowych. Wyeliminowanie worków (wykonanych z Tedlaru, FlexFoil lub innych) pozwala znacznie zwiększyć stabilność przechowywanej próbki, a jednocześnie zminimalizować ryzyko jej zanieczyszczenia. Objętość 400 ml oddechu (pobrana do 2 strzykawk) była adsorbowana na jednej rurce sorpcyjnej i traktowana jako jedna próbka badana. Pomimo zastąpienia węglowych sit molekularnych (Carboxen 569 i Carboxen 1000) bardziej hydrofobowymi grafityzowanymi sadzami węglowymi (Carbotrap B i Carbopack X), rurkę sorpcyjną oraz strzykawkę zawierającą próbki oddechu (oraz kapilary transferowe) utrzymywano w podwyższonej temperaturze (40°C) przez kilka minut przed i w czasie ekstrakcji. Pozwoliło to na wykonanie ekstrakcji próbki na rurki sorpcyjne w miejscu jej pobierania (zamiast transportu w workach do laboratorium) i na znaczne uproszczenie całości systemu do ekstrakcji znanego z poprzednich badań (brak konieczności rozcieńczania próbki gazem nośnym oczyszczanym na filtrach) z zachowaniem silnej redukcji sorpcji wody na złożu sorbentu. Sam proces ekstrakcji został zautomatyzowany za pomocą urządzenia zaprojektowanego i skonstruowanego przez mgr. inż. Helmuta Wiesenhofera, a którego parametry pracy (temperatura, objętość i prędkość przepływu gazowej próbki przez złożę wybranych sorbentów) osobiście zoptymalizowałem przed rozpoczęciem badań klinicznych.

Warto w tym miejscu nadmienić, że wypracowany w obu pracach Etapu 1. warsztat analityczny pozwolił na otrzymanie w 2021 r. finansowania z programu *Inkubator Innowacyjności 4.0* (nr projektu MNISW/2020/331/DIR) i skonstruowanie – we współpracy z firmą PAS Technology Deutschland (Magdała, Niemcy) – pionierskiego urządzenia do zautomatyzowanego pobierania próbek fazy pęcherzykowej oddechu, sterowanego kapnometrią, z jednoczesną ekstrakcją w czasie rzeczywistym na dwóch równoległych rurkach sorpcyjnych w warunkach pełnej kontroli temperatury, prędkości przepływu i objętości pobranego oddechu. Zaprojektowanie i skonstruowanie tego przenośnego urządzenia, które jest niewątpliwie jednym z większych osiągnięć niniejszego cyklu habilitacyjnego (a którego szczegóły opisane są w załączniku nr 4 „wykaz osiągnięć naukowych”) nie byłoby możliwe bez zebrania cennego doświadczenia w czasie 11 lat mojej pracy w Innsbrucku, współpracy z mgr. inż. Helmutem Wiesenhoferem i wdrażaniu pozyskanej wiedzy w czasie wykonywania obu badań klinicznych opublikowanych w [A-1] i [A-2].

Pozostając w kwestii pionierskich rozwiązań analitycznych w niniejszej pracy wspomnieć należy, iż w interpretacji wszystkich danych chromatograficznych (oddechy pacjentów ze stabilnym POChP, zaostrzenia POChP oraz osób zdrowych) zastosowano oprogramowanie BreathView®. Program ten – stworzony przez firmę Five Technologies GmbH (Monachium, Niemcy, producenta Spektrometrów Mas z analizatorem czasu przelotu ToF-MS)

– sprawdzałem (jako Beta-Tester) w ramach zatrudnienia w centrum ONCOTYROL, pod kątem poprawności detekcji i identyfikacji związków. Stworzona przeze mnie baza danych 105 związków zawierającej spektra masowe zmierzone dla substancji wzorcowych i zsynchronizowane z ich czasami retencji, wykorzystana została do trenowania i weryfikacji procesu dekonwolucji sygnałów spektrometru mas. Ostatecznie program BreathView® osiągnął pełną sprawność operacyjną w wersji 2.1. i od roku 2015 jest własnością centrum ONCOYTROL (właściciel licencji).

Wspomniana ilość 105 związków stanowiła pewne ograniczenie badań, gdyż substancji obecnych w oddechach badanych pacjentów było więcej, jednak pierwszoplanowym celem była prawidłowa identyfikacja metabolitów jako punkt konieczny do osiągnięcia przed dalszymi rozważaniami. Kolejnym istotnym czynnikiem była redukcja zmiennych, tj. kilkietapowa eliminacja LZO (z początkowej grupy 105 analitów) zawężająca końcowe spektrum do związków o możliwie najwyższym biologicznym znaczeniu. W pierwszej kolejności eliminowano związki występujące w mniej niż 30% oddechów. Ma to szczególne znaczenie dla pacjentów w zaostrzonej fazie POChP, u których ze względu na mnogość przyczyn i czynników etiologicznych wywołujących ten stan (omówionych powyżej) obserwuje się bardzo wysoką różnorodność międzyosobniczą. Kolejnym etapem było obliczenie tzw. gradientu alveolarnego (AG, ang. Alveolar Gradient) czyli różnicy między ilością danego związku w oddechu i powietrzu wdychanym z otoczenia ( $AG = \text{breath} - \text{air}$ ). Pomimo, iż jest to dalekie uproszczenie, to jednak powszechnie stosowane, gdyż stopień skomplikowania procesów zachodzących w ludzkim organizmie determinujący ilościową dystrybucję LZO do oddechu pozostaje do dziś nieznany. Co istotne, na tym etapie selekcji metabolitów, ujemne wartości AG (ilość mniejsza w oddechu niż otaczającym powietrzu) nie były resetowane do zera, by nie zafałszować obliczeń statystycznych. Obliczone wartości AG wszystkich związków użyto do oszacowania istotności statystycznej („p” testu ANOVA) dla porównania wszystkich grup pacjentów, pozostawiając tylko związki z  $p < 0.05$  i  $q < 0.05$  (gdzie „q” to korekta współczynnika fałszywych odkryć, FDR, dla wielokrotnych porównań). W następnym etapie wykorzystałem doświadczenie z moich poprzednich badań nad wpływem czynników zewnętrznych, paleniem papierosów i ekspozycją na zanieczyszczenia środowiskowe [Filipiak et al., J. Breath Res. 6 (2012) 036008 (21pp)], do wykluczenia związków o potwierdzonym pochodzeniu egzogennym. Poczynione kroki usystematyzowanej redukcji zmiennych pozwoliły zawęzić początkową ilość 105 związków w oddechu do jedynie 16 analitów. Niemniej, wysoka częstość występowania związków w oddechu nie musi oznaczać ich wysokich stężeń. Zważywszy więc na znikomą informację biologiczną dla związków o

ujemnym AG, zostały one zmarginalizowane przez wprowadzenie wartości granicznej AG, indywidualnej dla każdego analitu. Jeśli jakiś związek występował częściej niż w 30% próbek oddechu na poziomie poniżej wartości granicznej AG, był on eliminowany z dalszych rozważań. Za wartość graniczną gradientu alveolarnego przyjęto wartość „0-MAD”, czyli zerowego AG (AG=0 gdy breath=air) pomniejszoną o medianę odchylenia bezwzględnego (MAD, Median Absolute Deviation). W ten sposób zredukowano liczbę metabolitów w oddechu do 12, a przeprowadzona na ich podstawie analiza ROC (Receiver Operating Characteristic) wykazała 97% poprawnej klasyfikacji pacjentów z zaostrzoną fazą POChP względem fazy stabilnej, przy zachowaniu 91% specyficzności i 78% czułości. Po ostatecznej redukcji zmiennych tylko do 4 LZO, specyficznych względem pacjentów w fazie zaostrzenia POChP (tj. *n*-butan, 2-pentanon, cykloheksanon i 4-heptanon), otrzymano poprawne zróżnicowanie obu stanów POChP na poziomie 92%, z czułością 69% i specyficznością 94%.

Obie omówione powyżej prace dostarczyły dowodów, iż analiza lotnych metabolitów ma bardzo wysoki potencjał diagnostyczny nie tylko w kwestii rozróżnienia grupy osób chorych od zdrowych, lecz też pacjentów będących w różnym stadium jednej choroby. W ten sposób obie prace wyznaczyły podstawę metodologiczną dla przyszłych badań klinicznych włączonych do cyklu habilitacyjnego, skupionych na analizie oddechu pacjentów krytycznie chorych, w których bezpośrednio zaadaptowano dotychczasowe główne osiągnięcia naukowe, czyli: koncepcję wielopoziomowej ewaluacji, zmodyfikowaną technikę pobierania próbek oddechu oraz metodyczną redukcję zmiennych przed statystyczną klasyfikacją pacjentów.

## ***Etap 2 – Rozwój Metod Analitycznych***

[A-3]:

***SPME in clinical, pharmaceutical, and biotechnological research - How far are we from daily practice?***

**Trends in Analytical Chemistry 115 (2019) 203e213; doi: 10.1016/j.trac.2019.02.029**

W poprzednim etapie cyklu wykazano bezsprzeczną korzyść wynikającą z potwierdzenia biologicznego znaczenia oznaczanych analitów w więcej niż jednej matrycy biologicznej. Jednak obie poprzednie prace wykorzystywały dosyć skomplikowane systemy do analiz *in vitro* oraz *ex vivo*, wymagające precyzyjnej kontroli warunków doświadczenia i potwierdzenia żywotności tkanki podczas ekstrakowania lotnych metabolitów. Jest to ich niewątpliwą zaletą, ale sprostanie tym wymaganiom wymaga zakupu kosztownych części systemu (np. filtry, precyzyjne regulatory przepływów z elektroniczną kompensacją) lub wręcz

całej aparatury, jak zastosowana w pierwszej pracy [A-1] mikroskopia konfokalna z barwieniem. Ukazuje to konieczność poszukiwania prostszych i tańszych technik ekstrakcyjnych, z zachowaniem odpowiedniej precyzji, dokładności i czułości oznaczania metabolitów w złożonej matrycy. Należy przy tym zaznaczyć, iż stosowane dotychczas rurki sorpcyjne oferują, ze względu na ilość wypełniających je sorbentów o różnej sile, bezkonkurencyjną czułość i zakres analizowanych związków, ale pod warunkiem uzyskania dużych objętości gazowej próbki. O ile nie stanowi to żadnego problemu w przypadku analizy oddechu (lub analiz *in vitro* w trybie DHS, dynamic headspace sampling), o tyle w przypadku próbek biologicznych, jakimi są tkanki i wydzieliny ludzkie, jest to poważnym ograniczeniem ich zastosowania. Wskazuje to na potrzebę rozwoju dodatkowych technik ekstrakcyjnych, lecz nie w celu całkowitego zastąpienia już istniejących, a uzupełnienia warsztatu analitycznego w zapotrzebowaniu wynikającym z aplikacji do konkretnej matrycy biologicznej.

Dlatego wraz z Prof. Barbarą Bojko, uznaną ekspertką w dziedzinie metod ekstrakcyjnych, przygotowaliśmy pracę przeglądową omawiającą wkład technik mikroekstrakcyjnych w badania nad lotnymi, półlotnymi i nielotnymi związkami organicznymi w biologicznych badaniach *in vitro* i klinicznych *in vivo*, ze szczególnym uwzględnieniem profilowania metabolitów w celach diagnostyki medycznej. Praca ta nie tylko zestawiała najważniejsze osiągnięcia zastosowań technik ekstrakcyjnych w badaniach medycznych, farmaceutycznych i biotechnologicznych, lecz także rzetelnie nakreślała ograniczenia i wyzwania dla wdrażania nowatorskich rozwiązań analitycznych w dalszych badaniach ludzkiego metabolomu.

Sama struktura publikacji, z podziałem na część poświęconą związkom lotnym i osobną część o analizie związków pół- oraz nielotnych, wskazuje na fundamentalne ograniczenie analityczne: brak jednej uniwersalnej techniki do zastosowania zarówno w chromatografii gazowej, jak i cieczowej. Wynika to z limitowanej stabilności i podatności na degradację termiczną (desorpcja w wysokich temperaturach, 200-300°C, w GC) lub chemiczną (desorpcja rozpuszczalnikiem w LC) sorbentów stosowanych jako pokrycia komercyjnych włókien w mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME, Solid Phase Microextraction). Problem ograniczonej stabilności widoczny był również w badaniach nad innowacyjnymi materiałami sorpcyjnymi, takimi jak tlenek grafenu, dla którego odpowiednio dobrane warunki syntezy zmieniają zawartość grup funkcyjnych na bazie tlenu (reszty karboksylowe, karbonylowe, hydroksylowe czy epoksydowe), modulując tym samym właściwości sorpcyjne materiału i znacząco zwiększając czułość analizy. Niemniej termiczna degradacja tych grup funkcyjnych podczas wysokotemperaturowej desorpcji w dozowniku GC, skutkuje znacznie gorszą precyzją w

oznaczaniu niskocząsteczkowych LZO w porównaniu z komercyjnymi włóknami. Z jednej strony brak stabilności chemicznej, a z drugiej sorpcja składników obecnych w złożonych matrycach biologicznych – takich jak tkanki lub wydzieliny ludzkie – są głównymi przyczynami znaczących ograniczeń w dostępności (zwłaszcza komercyjnej) materiałów biokompatybilnych używanych do mikroekstrakcji lotnych związków organicznych. Doskonałym przykładem mogą być sacharydy, które ze względu na dużą ilość grup hydroksylowych w swej cząsteczce wiążą się z sorbentem, a następnie są rozkładane w wysokich temperaturach podczas desorpcji termicznej GC, prowadząc do nieodwracalnego uszkodzenia włókna SPME (i zanieczyszczenia linera w dozowniku GC). Większą stabilność mają złoża o bardziej jednorodnej strukturze powierzchni aktywnej, lecz ich ograniczeniem jest z kolei jest mocno zawężony zakres adsorbowanych LZO, zarówno pod względem wielkości cząsteczki jak i jej polarności.

Podjęta w niniejszej pracy przeglądowej szczegółowa charakterystyka problemu badawczego wskazuje na potrzebę nowej generacji urządzeń mikroekstrakcyjnych, które oferować powinny zarówno lepszą czułość analizy, jak i ekstrakcję szerszego zakresu analitów, lecz przede wszystkim większą stabilność termiczną i chemiczną sorbentów oraz ich biokompatybilność ze złożonymi matrycami biologicznymi. Tym samym praca ta ukształtowała kierunek dalszych badań, zwieńczonych kolejnymi osiągnięciami naukowymi włączonymi do obecnego cyklu habilitacyjnego [A-4, A-5, A-8]. Nakreślone tu perspektywy rozwoju były też bodźcem do powstania prac spoza cyklu, jak zastosowanie mikroekstrakcji cienkowarstwowej (TFME, Thin-Film Microextraction) do analizy frakcji niezwiązanej antybiotyków we krwi pacjentów krytycznie chorych [*Molecules* 2022] czy ogólnodostępnego protokołu analitycznego jako standardu badań LZO w próbkach biologicznych [*Green Analytical Chemistry* 2025].

#### [A-4]:

***Application of thin-film microextraction to analyze volatile metabolites in A549 cancer cells***  
**Metabolites 2021, 11, 704; doi: 10.3390/metabo11100704**

Scharakteryzowana w poprzedniej pracy technika SPME zapewnia dużą elastyczność w zakresie rozmiaru i geometrii nośnika oraz rodzaju i ilości sorbentu. Jest to fenomenalna zaleta tej metody, pozwalająca na dopasowanie urządzenia do konkretnego zastosowania i dostępności próbek. W myśl tej zasady Bruheim wprowadził w 2003 r. mikroekstrakcję cienkowarstwową (TFME), jako zmodyfikowaną wersję SPME. W przypadku włókien SPME, większa ilość fazy stałej skutkowałaby wydłużeniem czasu wymaganego do osiągnięcia

równowagi, pogarszała efektywność desorpcji, zwiększała tło i tzw. „bleeding” z materiału nośnika (czyli uwalnianie fragmentów nośnika w wyniku jego termicznej degradacji w wysokich temperaturach desorpcji, np. różnej wielkości cyklicznych siloxanów z polimeru PDMS, tj. polidimetylosiloksanu). Jednak w przypadku TFME, urządzenie ma postać płaskiej siatki, co zwiększa drastycznie powierzchnię sorbentu, ale nie jego grubość. Dzięki temu osiągnięcie stanu równowagi jest przyspieszone, a całkowita wydajność ekstrakcji, znacznie zwiększona. Dalsze usprawnienia tej techniki, poczynione przez Jonathana Grandy’ego w grupy badawczej Prof. Janusza Pawliszyna w Waterloo (Kanada) polegały na użyciu siatki węglowej, zamiast wykonanej z włókna szklanego, co znacznie zredukowało emisję zanieczyszczeń ze wspomnianego zjawiska bleeding’u. Siatki TFME użyte w niniejszej pracy wytworzone były właśnie w grupie Prof. Pawliszyna, wg metody J. Grandy’ego (wykonał je dr Karol Jaroch, podczas swojego stażu naukowego na Uniwersytecie Waterloo w Kanadzie). Moim zadaniem w niniejszej pracy było opracowanie i zoptymalizowanie całego protokołu analitycznego opartego na ekstrakcji TFME i jego użycie do analizy LZO w próbkach biologicznych, jakimi były linie komórek nowotworowych A549.

Zakres analitów oznaczanych w próbce determinowany jest składem chemicznym fazy ekstrakcyjnej, a zatem pierwszym poczynionym przeze mnie krokiem optymalizacji protokołu była charakterystyka sorbentów użytych w testowanych siatkach TFME. W Większości przypadków, są to te same sorbenty co stosowane w komercyjnych włóknach SPME, w tym diwinylobenzen (DVB), carboxen (CXN) i polidimetylosiloksan (PDMS). Każdy sorbent ma inną strukturę powierzchni, zarówno pod względem budowy chemicznej, sieciowania monomerów (jeśli to polimer organiczny), obecności grup funkcyjnych czy porowatości, które sumarycznie determinują jego zakres zastosowań. Na przykład, ze względu na silnie rozwiniętą strukturę mikroporowatą (a przez to dużą powierzchnię sorpcyjną) i obecność grup funkcyjnych zawierających elektroujemny tlen, carboxen nadaje się idealnie do ekstrakcji związków wysoce lotnych, o małej masie cząsteczkowej (<150 g/mol). Jednak z tego samego powodu, większe cząsteczki (zwłaszcza zawierające grupy funkcyjne odpowiedzialne za dodatkowe oddziaływania z sorbentem, np.  $\pi$ - $\pi$ , dipol-dipol, wiązania wodorowe i inne), mogą adsorbować się zbyt mocno, wręcz nieodwracalnie, podczas gdy zastosowanie bardzo wysokich temperatur (>270°C), dla poprawienia ich desorpcji ze złoża, jest wykluczone (pomimo wysmienitej stabilności termicznej carboxenu) ze względu na degradację podłoża wiążącego sorbent z nośnikiem (węglową siatką) wykonanego z PDMS. Fakt ten znajduje potwierdzenie w wynikach niniejszej pracy, gdzie siatki TFME pokryte carboxenem osiągają najwyższą wydajność ekstrakcji dla wysoce lotnych węglowodorów niskocząsteczkowych (3-metylo-1-

buten, izoprene, 2-petnen), która jednak maleje ze wzrostem cząsteczki analitu i staje się najniższa (spośród testowanych sorbentów) dla nonanu i dekanu. Dla tych związków, niepolarnych, pozbawionych grup funkcyjnych, w którym główną rolę odgrywają niespecyficzne siły Van der Waalsa, lepsze rezultaty osiągnięto stosując diwinylobenzen jako fazę ekstrakcyjną. W tym niepolarnym polimerze, oprócz niespecyficznych sił Van der Waalsa, ważną rolę odgrywają także oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  analitu z usieciowanymi w strukturze sorbentu pierścieniami benzenu. Oddziaływania te będą znacznie słabsze dla analitów zawierających polarne grupy funkcyjne z silnie elektroujemnymi atomami, co przekłada się na słabszą adsorpcję i wypieranie takich cząsteczek przez związki o wyższym powinowactwie do sorbentu. Aby temu zapobiec można zmodyfikować znany sorbent, np. włączając grupy N-winylopirolidonowe do struktury polimeru DVB. Efektem tej modyfikacji są cząsteczki zrównoważone hydrofilowo-lipofilowo (HLB, ang. Hydrophilic-Lipophilic Balanced), o zwiększonej skuteczności adsorpcji względem utlenionych form LZO. Przeprowadzone doświadczenie potwierdza, iż najwyższą efektywność ekstrakcji alkoholi, ketonów i aldehydów otrzymano właśnie dla siatek TFME pokrytych sorbentem HLB. Tym samym, sorbent ten jest rekomendowany do zastosowań o szerokim zakresie, gwarantując najwyższą czułość końcowej analizy dla większości związków.

Z racji, iż obszarem badań na przestrzeni całego cyklu habilitacyjnego są choroby nowotworowe oraz infekcyjne płuc, praca z niebezpiecznym materiałem biologicznym, często zakaźnym (hodowle *in vitro* oraz tkanki i wydzieliny ludzkie) stanowią realne ryzyko dla analityka, zwłaszcza na etapie pobierania i ekstrakcji próbki. Dlatego też zbadałem możliwość zredukowania bezpośredniego kontaktu z próbką do absolutnego minimum i oszacowałem wydajność ekstrakcji dla trybu próbkowania zewnętrznego (EX-HS, ang. External Headspace). W trybie tym siatka TFME umieszczona jest w rurce szklanej, która za pomocą teflonowej kapilary połączona jest z jednej strony z fiolką zawierającą próbkę, a z drugiej strony ze strzykawką, służącą do wymuszania dwukierunkowego przepływu gazowej fazy nadpowierzchniowej z próbki poprzez siatkę TFME. Metoda ta skutkowała jednak znacznie gorszą wydajnością ekstrakcji dla każdego z oznaczanych analitów w porównaniu do standardowego próbkowania wewnętrznego (IN-HS, ang. Internal Headspace), w którym siatka TFME podwieszona była wewnątrz szczelnie zamkniętej fiołki zawierającej próbkę. Pomimo, iż w trybie IN-HS próbka musiała być przez krótki moment (kilka sekund) otwarta, co oczywiście zaburzyło równowagę w układzie, to jednak została ona szybko przywrócona w małej objętości fazy nadpowierzchniowej z jednocześnie szybką kinetyką dystrybucji LZO do

cienkiej warstwy sorbentu o dużej powierzchni, co pozwoliło na bardzo wydajną ekstrakcję analitów z próbki.

Kolejnymi zoptymalizowanymi przeze mnie parametrami były temperatura i czas ekstrakcji. Zgodnie z oczekiwaniem, utrzymywanie podwyższonej temperatury w 37°C w zamkniętym układzie gwarantuje wyższą stabilność całego procesu (w porównaniu do temperatury ~20°C otoczenia laboratoryjnego) oraz poprawia kinetykę (parowanie i dyfuzję LZO), przyspieszając osiągnięcie równowagi i poprawiając ogólną wydajność ekstrakcji. Z kolei podczas optymalizacji czasu ekstrakcji pamiętać należy, iż niskocząsteczkowe LZO mają wysokie prężności par więc i szybką dyfuzję, dzięki czemu szybko osiągają równowagę dynamiczną pomiędzy próbką gazową a fazą ekstrakcyjną. W rezultacie najwyższą skuteczność ekstrakcji tych LZO obserwuje się już od najkrótszych testowanych czasów. Niemniej, dla cięższych związków o mniejszej prężności par, wydłużenie czasu ekstrakcji (w podwyższonej temperaturze) sprzyja przejściu ciecz-gaz. Mimo, iż stan równowagi między fazami niekoniecznie jest osiągnięty dla każdego związku, pozwala to jednak zwiększyć ilość cięższych cząsteczek dyfundujących w kierunku powierzchni sorbentu, co uwidacznia się zwiększoną wydajnością ekstrakcji dla kolejnych testowanych czasów (10, 20, 35, 60 i 90 min).

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, ustaliłem końcowe parametry ekstrakcji LZO za pomocą siatek TFME jako: siatki węglowe pokryte sorbentem HLB, ekstrakcja w trybie IN-HS, w podwyższonej temperaturze 37°C, przez okres 90 minut. Parametry te zostały zastosowane w badaniu emisji LZO z nowotworowych komórek A549 (rak płuc) w warunkach *in vitro*. Było to pierwsze na świecie zastosowanie urządzeń TFME pokrytych sorbentem HLB do ekstrakcji lotnych metabolitów z próbek biologicznych. Przeprowadziłem ekstrakcje (oraz analizy GC-MS i interpretacje ich wyników) wszystkich próbek pobranych z komórek A549 oraz referencyjnego sterylnego medium. Sumarycznie, wykryłem 68 lotnych związków, a dla 40 z nich zakupiłem substancje wzorcowe, dzięki czemu mogłem przeprowadzić ich analizy GC-MS celem jednoznacznego potwierdzenia identyfikacji metabolitów komórek nowotworowych. Z tej grupy związków wytypowałem sześć metabolitów, dla których różnice w stężeniach w próbkach headspace z hodowli komórkowych i referencyjnego medium osiągnęły statystyczną istotność wg testu U-Manna-Whitney'a. Zastosowany protokół TFME pozwolił na uzyskanie bardzo niskich limitów detekcji (sub-ppb), a jednocześnie bardzo dobrej liniowości ( $R^2 > 0.99$ ) krzywych kalibracyjnych dla tych związków. Pięć metabolitów było produkowanych przez badane komórki A549, są to: disiarczek węgla, 2,3-butanodion, pirol, pirydynę i 2-metylopirazynę, podczas gdy benzaldehyd był przez komórki katabolizowany (jego stężenia były wyższe w próbkach medium niż komórek).

Wyniki eksperymentów *in vitro* z linią komórkową A549 pozwoliły nie tylko jednoznacznie zademonstrować użyteczność analityczną zoptymalizowanego protokołu TFME do ekstrakcji LZO z próbek biologicznych, ale też dostarczyły kolejnych informacji o metabolitach związanych z procesami onkogennymi. Potwierdzono bowiem, że związki takie jak pirydyna i 2,3-butanedion – które wcześniej obserwowano na statystycznie wyższych stężeniach w nowotworowych tkankach płuca względem tkanek zdrowego płuca [A-1] – są również produkowane przez nowotworowe komórki A549, jako modelowe dla raka płuc. Praca ta była ważna dla niniejszego cyklu również ze względu na późniejsze zastosowanie opracowanego tutaj protokołu w badaniach *ex vivo* skupionych na emisji LZO z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych pobranych od pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc (*vide*: publikacja [A-8]). Dodatkowo, protokół ten jest poddany szczegółowej charakterystyce jako ogólnodostępny standard badania LZO z próbek biologicznych opublikowany w Green Analytical Chemistry 2025 (doi: 10.1016/j.greeac.2025.100242).

[A-5]:

***Assessment of thermal and solvent stable SPME fibers for volatilome investigation through in vitro experiments with cancer cell lines***

**Analytica Chimica Acta 1378 (2025) 344708; doi: 10.1016/j.aca.2025.344708**

W poprzedniej pracy [A-4] podjęto jeden z problemów wskazanych w publikacji przeglądowej [A-3] wytyczającej kierunki dalszych badań, a mianowicie, dobór sorbentu o szerokim zakresie ekstrakcji LZO wraz z utworzeniem dla niego protokołu analitycznego umożliwiającego analizy śladowych ilości analitów (sub-ppb). Kolejne z pozostałych wyzwań – wytworzenie uniwersalnego sorbentu stosowalnego zarówno w chromatografii gazowej jak i ciekłowej, a przy tym biokompatybilnego z matrycą biologiczną – są adresowane w niniejszej pracy [A-5]. Wymaganie biokompatybilności dotyczy w większości przypadków analiz *ex vivo*, ale przede wszystkim *in vivo*, w których zamiast siatek TFME stosuje się włókna SPME ze względu na możliwość bezpośredniego wprowadzenia fazy ekstrakcyjnej do tkanki (tzw. *direct immersion*). Dodatkowym atutem włókien SPME jest możliwość całkowitej automatyzacji procesu ekstrakcji w przypadku analiz *ex vivo*, co przy obecnie znanych rozwiązaniach technicznych nie jest możliwe dla siatek TFME.

Będąc wykonawcą projektu microIVIVE (PolTur4) odbyłem staż naukowy do partnera naukowego projektu, Prof. Ezel Boyaci z Middle East Technical University w Ankarze

(będącego wiodącym ośrodkiem naukowym w Turcji). Grupa badawcza kierowana przez Prof. Boyaci zajmowała się tworzeniem nowej generacji włókien SPME, w których fazę ekstrakcyjną tworzą cząsteczki uprzednio scharakteryzowanego sorbentu HLB zanurzone w poli(tetrafluoro)etylenie (PTFE, nazwa handlowa: Teflon). Wybór polimeru PTFE nie był przypadkowy, bowiem jego bardzo dobra stabilność termiczna (do 300°C) gwarantuje wytrzymałość materiału w warunkach termicznej desorpcji w dozowniku GC, z kolei stabilność chemiczna – również wytrzymałość na działanie rozpuszczalników organicznych podczas desorpcji do analiz LC. Dodatkowo, chemiczna obojętność tego materiału zapobiega sorpcji, a nawet zwykłej adhezji, wielkocząsteczkowych składników matryc biologicznych (np. peptydów, oligosacharydów) co eliminuje zarówno problemy podczas ekstrakcji (wysycenie złoża, wypieranie zaadsorbowanych analitów) jak i podczas desorpcji (niepożądane reakcje chemiczne w wysokich temperaturach – niszczenie włókna SPME i zanieczyszczenie dozownika GC). Cechy te czynią materiał HLB/PTFE idealnym kandydatem do nowej generacji faz ekstrakcyjnych – biokompatybilnych z materiałem biologicznym, o uniwersalnym zastosowaniu LC/GC. Moim zadaniem podczas pobytu w Middle East Technical University było scharakteryzowanie wytworzonych włókien HLB/PTFE pod kątem ich stabilności, wykonanie optymalizacji protokołu analitycznego stosującego nowe włókna do ekstrakcji LZO ze złożonej matrycy oraz jego walidacji. Z kolei korzystając z zasobów i doświadczenia naszej grupy w Collegium Medicum UMK, włókna te zastosowałem także – poprzez analogię z poprzednimi badaniami – w eksperymentach *in vitro* z komórkami nowotworowymi, tym razem linią B16F10 (czerniak) i LL2 (rak płuc), rozszerzając wiedzę o dodatkowe metabolity związane z procesami onkogennymi.

W niecelowanej metabolomice mającej wskazać związki bezpośrednio powiązane z procesem chorobotwórczym identyfikacja wrytych analitów musi być absolutnie bezsprzeczna. Dlatego pierwszym podjętym krokiem było określenie, czy nowe włókna SPME nie generują sygnałów pochodzących z tzw. bleedingu (wspomnianego wcześniej rozkładu fazy stałej), które mogłyby zafałszować analizę śladowych ilości związków o znaczeniu biologicznym. Kluczowym etapem dla końcowej stabilności wytworzonego włókna jest proces sieciowania polimeru, zależny od zastosowanych warunków syntezy i późniejszego oczyszczania. W tym celu cząsteczki HLB po zakończonej syntezie poddano trzem różnym procesom oczyszczania: (1) przemywaniu metanolem z filtracją próżniową i późniejszym suszeniu w piecu w 70°C przez 24 godz., (2) przemywaniu metanolem w paracie Soxhleta przez 24 godz. i suszeniu w piecu próżniowym przedmuchanym azotem w temperaturze 210 °C przez 24 godziny, (3) również przemywaniu metanolem w aparacie Soxhleta przez 24 godz, ale z

późniejszym suszeniem w zwykłym piecu w 70°C przez 24 godz. Po tym procesie cząsteczki HLB mieszano z polimerem PTFE rozpuszczonym w CF-75 (tzw. perfluorocarbon solvent, a dokładnie: perfluoro-2-n-butyl tetrahydrofuran) i utworzoną jednorodną mieszaninę (tzw. *slurry*) nakładano kilkakrotnie na pręciki nitinolowe. Gotowe włókna wygrzewano w dozowniku GC w temperaturze 250°C przez 1 godz. w celu usunięcia wszelkich pozostałości rozpuszczalników, monomerów i inicjatorów mogących zalegać w porowatym materiale fazy ekstrakcyjnej i startowano analizę GC-MS (badając, jakie zanieczyszczenia uwolnione z włókna skumulowały się na kolumnie GC). Następnie dwukrotnie przeprowadzono analizę GC-MS po krótkim, 5-minutowym, wygrzewaniu włókna w dozowniku GC (250°C) badając czy włókno jest wolne od zanieczyszczeń. Uzyskane wyniki wskazały, iż oczyszczenie cząstek HLB po ich syntezie poprzez samo płukanie metanolem z filtracją próżniową jest niewystarczające, choć po kilkakrotnym wygrzewaniu włókna poziom tła maleje. Z kolei włókna przygotowane z cząstek HLB oczyszczanych metanolem w aparacie Soxhleta i wygrzewane w 70°C okazały się bardzo czyste już po pierwszym 1-godzinny wygrzewaniu, a po kolejnych krótkich cyklach wygrzewania (5 min w 250°C), włókno było wolne od zanieczyszczeń umożliwiając zastosowanie do analiz śladowych.

W kolejnym etapie zoptymalizowałem temperatury oraz czasy, zarówno dla adsorpcji jak i dla desorpcji, używając pożywki DMEM z dodanymi substancjami wzorcowymi, aby naśladować złożoną matrycę biologiczną. Innych parametrów wpływających na efektywność ekstrakcji, takich jak pH czy siła jonowa nie badałem, gdyż ich wartości nie mogą podlegać modyfikacjom w warunkach docelowego zastosowania (tkanki, wydzieliny, hodowle komórkowe) z powodu ich drastycznego wpływu na procesy życiowe komórek fałszującego naturalny profil LZO. W testowanym przedziale temperatury desorpcji, tj. 230°C, 250°C i 270°C zauważyłem dwa rozbieżne efekty: dla wysoce lotnych małych cząsteczek najlepsze wyniki uzyskano w temp. 230°C, zaś dla większych, mniej lotnych związków, lepszym wyborem była temp. 270°C zarówno ze względu na większą ilość desorbowanego analitu, jak i powtarzalność procesu. Analogicznie, wydłużenie czasu desorpcji z 30s do 60s a nawet 120s w trybie splitless zwiększało ilość analitów uwolnionych z włókna i dozowanych na kolumnę GC, poprawiając czułość analizy. Podobnie, optymalizując temperaturę ekstrakcji zauważyłem, iż związki małowcząsteczkowe osiągają lepszą ekstrakcję w ~20°C aniżeli w podwyższonej temp. 37°C. Może być to wytłumaczone przez słabe oddziaływania van der Waalsa małych cząstek z fazą ekstrakcyjną włókna, które są jeszcze mniejsze po wzroście energii w wyniku podwyższenia temperatury układu. Z kolei lekko podwyższona temperatura nie ma wpływu na silniejsze oddziaływanie większych cząsteczek z sorbentem (dodatkowo: oddziaływania  $\pi$ - $\pi$ ,

siły dyspersyjne), ale znacząco przyspiesza ich parowanie i dystrybucję w układzie, polepszając ich ekstrakcję na włóknie. Spośród testowanych czasów ekstrakcji wzorców z medium DMEM (5, 10, 20, 30 minut), adsorpcja 10-minutowa była optymalna dla wysoce lotnych związków niskocząsteczkowych (np. furan, siarczki dimetylu), które przy dłuższych czasach ekstrakcji wypierane były ze złoża przez cięższe anality o wyższym powinowactwie do sorbentu.

Kolejnym etapem badań, które wykonałem podczas swojego stażu w Ankarze była walidacja zoptymalizowanego protokołu, którą rozpocząłem od wyznaczenia powtarzalności oznaczania LZO za pomocą tego samego włókna (*intra-fiber*) oraz różnymi włóknami o tej samej fazie ekstrakcyjnej (*inter-fiber*). Dodatkowo, pomiary przeprowadziłem w dwóch różnych temperaturach desorpcji (230°C i 270°C), aby zbadać stabilność metody (*robustness*) pomimo małych zmian w jej parametrach, bowiem końcowa aplikacja – w przeciwieństwie do optymalizacji i walidacji – dotyczy analiz niecelowanych, więc może wymagać zastosowania np. wyższych temperatur desorpcji lub dłuższych czasów ekstrakcji. Wyniki wskazały, iż używając tego samego włókna SPME (*intra-fiber*), można osiągnąć bardzo dobrą precyzję dla 14 z 18 związków dodanych do medium DMEM (błędy RSD<10%) dla obu testowanych temperatur. Jednak porównując wyniki ekstrakcji z czterech różnych włókien (przygotowanych w tej samej partii), precyzja była zauważalnie gorsza osiągając RSD<10% dla 11 z 18 testowanych związków w temperaturze 230°C i zaledwie 5 LZO w temp. 270°C. Jest to najpewniej spowodowane małymi różnicami w grubości fazy ekstrakcyjnej, w porowatości jej powierzchni czy mikropęknięciach. Wobec powyższego zdecydowałem, iż w pozostałych doświadczeniach – zarówno do walidacji jak i końcowej aplikacji – używane będzie jedno włókno (tak jak w zautomatyzowanych autosamplerach nabudowanych na system GC-MS). Selektywność metody, czyli zdolność oznaczanie konkretnego analitu w matrycy przy minimalnej lub żadnej interferencji sygnału ze strony pozostałych jej składników, uzyskano optymalizując program temperaturowy kolumny gwarantujący rozdzielenie chromatograficzne składników próbki i dodatkowy pomiar powierzchni piku dla jedynie wybranego jonu (charakterystycznego dla związku) spośród wszystkich mierzonych przez spektrometr mas. Spośród pozostałych parametrów walidacyjnych wyznaczyłem zakres liniowości, limity detekcji, precyzję, dokładność i efekt przeniesienia (ang. *carry over*). Wszystkie te parametry wyznaczyłem na podstawie kalibracji związków wzorcowych dodawanych do medium DMEM aby możliwie najdokładniej odzwierciedlić złożoność matrycy biologicznej. W każdej z trzech serii kalibracyjnych użyłem sześciu kalibratorów (roztworów wzorcowych) w zakresie stężeń od 3.4 ng/ml do 880 ng/ml (wartości różnią się dla poszczególnych analitów). Współczynniki korelacji liniowej Pearsona w zakresie 0.91 do 0.99 świadczą o osiągnięciu satysfakcjonującej

liniowości w badanych zakresie stężeń wszystkich wzorców. Precyzję oraz dokładność wyznaczyłem dla niskiego, średniego i wysokiego stężenia (nr 2, 4, 6 spośród użytych w kalibracji). Precyzja, odzwierciedlająca powtarzalność analizy w tych samych warunkach, była w oczekiwanym zakresie ( $RSD < 15\%$ ) dla wszystkich związków na wszystkich poziomach (za wyjątkiem oktanalu). Dokładność – wyznaczona jako stosunek uśrednionej powierzchni piku danego związku ( $n=3$ ) przy określonym stężeniu, do jej wartości nominalnej obliczonej z równania krzywej kalibracyjnej (dla tego stężenia) – mieściła się w zakresie 85% do 115% dla większości związków. Jednym z najważniejszych parametrów w ewaluacji metody analitycznej jest limit detekcji (LOD, ang. Limit of Detection). W moim osobistym przekonaniu, LOD powinien być wyznaczany na podstawie krzywej kalibracyjnej, uwzględniając odchylenie standardowe linii regresji, zamiast sztywnego parametru  $S/N=3$ . W zastosowanym przeze mnie podejściu jakość krzywej kalibracyjnej będzie bowiem miała silny wpływ na obliczone LOD, zamiast generować sztucznie zaniżone wartości tego parametru. Pomimo restrykcyjnych kryteriów, osiągnięto bardzo niskie wartości LOD, w zakresie od 2.2 ng/ml dla eteru metylowo *tert*-butylowego do 43.3 ng/ml dla siarczku dimetylu. W ostatnim etapie walidacji wyznaczyłem tzw. efekt przeniesienia (*carry over*) poprzez desorpcję do systemu GC-MS z włókna SPME użytego tuż wcześniej do pomiaru najwyższego stężenia całej krzywej kalibracyjnej (tj. bez wcześniejszego kondycjonowanie włókna). Wykonane pomiary potwierdziły brak jakiegokolwiek sygnału pochodzącego od analitów, świadcząc o kompletnej desorpcji z włókna SPME nawet największych (testowanych) ilości LZO.

Zoptymalizowany i zwalidowany protokół ekstrakcji użyłem w eksperymentach *in vitro* z liniami komórkowymi: B16F10 (czerniak) i LL2 (rak płuc), potwierdzając użyteczność wytworzonych w Ankarze włókien SPME nowej generacji. Była to pierwsza na świecie aplikacja urządzeń SPME wykorzystujących fazy ekstrakcyjne bazujące na Teflonie do analizowania lotnych metabolitów z komórek nowotworowych. Łącznie, wykryłem 33 lotne metabolity o statystycznie istotnych różnicach stężeń w hodowli komórkowej B16F10 w porównaniu do referencyjnego medium, analogicznie 26 LZO dla komórek LL2. Po raz kolejny w swych badaniach zaobserwowałem wychwyt (degradację) aldehydów przez komórki nowotworowe, co jest w pełni zgodne z innymi niezależnymi eksperymentami *in vitro* (np. rozkład nonanal przez komórki gruczolakoraka szyjki macicy HeLa, heksanal przez komórki raka wątroby HepG2, i całej gamy aldehydów przez komórki raka płuc: CALU-1, NCI-H1666, Lu7466 i Lu7387). Analogicznie, inne spośród obserwowanych tu związków były zgłaszane jako produkowane przez komórki nowotworowe, np. węglowodory (2-metylopentan, 2-metylo-1-penten, 2,4-dimetylo-1-hepten), etery (tert-butylowo-etylowy i tert-butylowo-metylowy) lub

ketony (aceton, 2-butanon, 2-pentanon). Równie interesującym przedsięwzięciem było zbadanie wpływu kombretastatyny A4 (o znanym działaniu przeciwnowotworowym) na metabolizm LZO w badanych liniach komórkowych. Okazało się, że efekt taki zaobserwowano tylko dla komórek czerniaka B16F10, np. statystycznie istotne obniżenie poziomów węglowodorów, zwłaszcza 2,4-dimetylo-1-heptenu. Wpływu kombretastatyny A4 nie zaobserwowano jednak wobec komórek raka płuc LL2. Może to być związane z ogólnie słabym wpływem cytostatycznym tej substancji na proliferację komórek (tylko 5-krotne spowolnienie wzrostu komórek LL2 względem hodowli czystej), niemniej efekt ten nie został wyjaśniony.

Podsumowując badania w niniejszej pracy pokreślić należy, iż zaproponowany przeze mnie zoptymalizowany protokół analityczny potwierdza dobrą jakość nowych, bazujących na Teflonie, włókien SPME. Przeprowadzona walidacja wykazała dobrą liniowość, precyzję i dokładność oraz bardzo niskie limity detekcji. Wykonane doświadczenia *in vitro* nie tylko zademonstrowały pełną użyteczność nowych włókien (i protokołu) do analiz LZO w matrycy biologicznej, ale też rozszerzyły wiedzę o ich metabolizmie w kolejnych liniach komórek nowotworowych, a nawet modulacji ich profili w odpowiedzi na zastosowany lek.

### *Etap 3 – Metabolomika mikroorganizmów w modelach in vitro i ex vivo*

Na podstawie obszernego doświadczenia zebranego przez 11-letnie zatrudnienie w Innsbrucku i uczestnictwo w wielu interdyscyplinarnych projektach naukowych, samodzielnie zaplanowałem i przygotowałem pełen wniosek o nowy projekt naukowy pt. „*Analiza oddechu jako nowatorska metoda diagnozowania respiratorowego zapalenia płuc i monitorowania spersonalizowanej terapii*”, który złożyłem do Narodowego Centrum Nauki w roku 2017. Projekt ten miał na celu opracowanie nowej, całkowicie bezinwazyjnej, metody – opartej na selektywnej analizie lotnych biomarkerów w oddechu – do wczesnej diagnozy bakteryjnego zapalenia płuc w połączeniu z możliwością identyfikacji patogenu. Hipotezę badawczą stanowi fakt, iż komórki bakteryjne wytwarzają wiele lotnych związków organicznych (LZO), z których część stanowią specyficzne dla danego gatunku lotne metabolity mogące stanowić „biologiczny odcisk palca” świadczący o obecności danej bakterii. Projekt obejmował swym zakresem eksperymenty *in vitro* z bakteriami chorobotwórczymi, rozwój technik (i protokołów) analitycznych oraz badania kliniczne z pacjentami w stanie krytycznym, wymagającymi mechanicznego wspomagania oddychania. Wniosek został zaakceptowany i w dniu 2018-09-24 podpisano umowę o jego finansowaniu w wysokości 1 758 851 PLN (UMO-2017/26/D/NZ6/00136). Środki finansowe przyznane przez NCN umożliwiły mi stworzenie na

Wydziale Farmaceutycznym CM UMK pracowni GC-MS i wyposażenie w najnowszy dostępny wówczas system TD-GC-MS składający się z chromatografu gazowego Nexis 2030 sprzężonego ze spektrometrem mas QP-2020-NX i wyposażonego dodatkowo w autosampler do termicznej desorpcji TD-30R (całość z Shimadzu) wraz z aparaturą dodatkową, m.in. osobnym kondycjonerem rurek sorpcyjnych i licznym wyposażeniem laboratoryjnym (cieplarki, pompy, regulatory przepływu, liczne filtry, szkła laboratoryjne i około 200 substancji wzorcowych dla poprawnej identyfikacji analitów w analizach GC-MS i ich kalibracji). Poczynione z uzyskanego przeze mnie projektu inwestycje pozwoliły na zrealizowanie licznych, ambitnych i zróżnicowanych celów badawczych, których efektem są wszystkie pozostałe publikacje naukowe omawiane w dalszej części niniejszego cyklu habilitacyjnego (zaś sumarycznie jest to 6 z 9 publikacji w tym cyklu).

W 2008 roku Luis Rice zestawiał sześć gatunków bakterii najszybciej rozwijających lekooporność i przez to stanowiących śmiertelne zagrożenie w przypadkach infekcji szpitalnych (zakażenia krwi, zapalenia płuc), wykuwając termin ESKAPE jak akronim od pierwszych liter bakterii: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacter species*. W roku 2017 Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, World Health Organization) umieściła gatunki grupy ESKAPE na liście priorytetowych patogenów w kontekście pilnego opracowywania nowych antybiotyków, rozszerzając zbiór o najwyższym priorytecie 1 („krytyczne”) dodatkowo o różne *Enterobacteriaceae* (w tym *Escherichia coli*, *Serratia* i *Proteus*). Z tego powodu, do badań planowanych w pozyskanym przeze mnie w 2018 r. projekcie wytypowałem następujące bakterie: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*, jako bakterie stanowiące najczęstszy, a jednocześnie najgroźniejszy czynnik etiologiczny respiratorowego zapalenia płuc (VAP, ang. Ventilator-Associated Pneumonia).

**[A-6]:**

***GC-MS profiling of volatile metabolites produced by Klebsiella pneumoniae***

**Frontiers in Molecular Biosciences 9:1019290; doi: 10.3389/fmolb.2022.1019290**

Jednym z pierwszym patogenów grupy ESKAPE wybranym do eksperymentów *in vitro* we wspomnianym projekcie była *Klebsiella pneumoniae*. Do przeprowadzenia badań konieczne było stworzenie nowego, specjalnie zaprojektowanego systemu eksperymentalnego,

co stanowiło jedno z kluczowych innowacyjnych rozwiązań. System ten został zaprojektowany i zbudowany przeze mnie samodzielnie, a sfinansowany z w/w projektu NCN. Umożliwiał on jednocześnie prowadzenie hodowli bakteryjnych w optymalnych i ściśle kontrolowanych warunkach (temperatura, prędkość mieszania, wilgotność), ale jednocześnie pobieranie próbek fazy gazowej (w trybie dynamic headspace sampling, DHS) w sposób powtarzalny i bez ryzyka kontaminacji. Dla zapewnienia najwyższej jakości wyników system wyposażyłem w zewnętrzny obieg termostatu z wymiennikiem ciepła w łaźni wodnej wbudowanej wewnątrz ciepłarki, a także baterie ośmiu automatycznych kompensacyjnych regulatorów przepływu gazu (syntetycznego powietrza wzbogaconego w 5% CO<sub>2</sub> i oczyszczanego na filtrach węglowych). Zgodnie z doświadczeniem zebranych podczas badań opisanych w [A-1], dla zredukowania niepożądanego sorpcji wody zastosowałem metodę „*dry dilution*”, w której próbka gazowa z nad hodowli bakterii (5 ml/min headspace) była rozcieńczana czystym gazem nośnym (40 ml/min) aby obniżyć wilgotność względną próbki zanim trafi na złożę sorbentu. W celu zapewnienia wysokiej powtarzalności wyników, sprawdzałem również przepływ sumaryczny na wyjściu z systemu, tj. już za rurką sorpcyjną, co potwierdzało szczelność wszystkich linii transferowych. Aby zachować stabilne tło emisji LZO ze sterylnego medium TSB (ang. Tryptic Soy Broth) w czasie eksperymentu, gaz nośny o powolnym przepływie 5 ml/min, podłączany był do butli z medium dzień wcześniej, co wypłukiwało LZO uwalniane z gorącego medium po procesie sterylizacji w autoklawie parowej. Inokulum bakteryjne wstrzyknięte było dopiero następnego dnia rano bez otwierania butli z medium, jedynie przekłuwając się przez septę w specjalnie przystosowanych nakrętkach. Skonstruowany przeze mnie system pozwalał na hodowlę (i jednocześnie pobór próbek headspace) w czterech liniach równoległych, z czego jedna zawsze zarezerwowana była dla sterylnego medium TSB, jako kontroli jakości / próby referencyjnej. Próbki headspace zbierano w siedmiu punktach czasowych: T0 (przed wstrzyknięciem bakterii do sterylnego medium), 2 h 40min po dodaniu inokulum (T1), 4 h 10min (T2), 5 h 40min (T3), 7 h 10min (T4), 8 h 40min (T5) and 24 h (T6). Punkty te dobrałem (w konsultacji z dr Tomaszem Bogielem z Katedry Mikrobiologii CM UMK) na podstawie uprzednio scharakteryzowanej kinetyki wzrostu badanej bakterii w zastosowanych warunkach eksperymentalnych tak, aby pokrywały wszystkie fazy wzrostu mikroorganizmów, tj. fazę adaptacji („*Lag-phase*”), dynamiczną fazę logarytmicznego przyrostu („*Log-phase*”) oraz fazę ustabilizowaną/stacjonarną („*Steady-phase*”). Natychmiast po zakończeniu pobierania próbki gazowej headspace z każdej linii pobierano 300 µl zawiesiny bakteryjnej celem wykonania posiewu i obliczenia ilości bakterii w hodowli (jtk/ml) w momencie ekstrakcji LZO. W żadnej z tych czynności nie naruszano równowagi gazowej wewnątrz butli z mikroorganizmami, a

wszystkie próbki (gazowe i ciekłe) pobierane były za pomocą specjalnie zaprojektowanych i wykonanych portów. Czynności: Przygotowania hodowli bakteryjnej, pobierania próbek gazowych na rurki sorpcyjne oraz przeprowadzania posiewów i zliczeń bakterii wykonywane były przez Panią Martę Marszałek, którą – jako promotor i opiekun naukowy jej pracy magisterskiej – szczegółowo przeszkoliłem w tym celu i następnie nadzorowałem jej pracę. Próbkę LZO ekstrahowane na rurkach sorpcyjnych były zabezpieczone metalowymi nakrętkami i w ciągu kilku godzin poddane analizie TD-GC-MS, której wszystkie parametry osobiście zoptymalizowałem. Skonstruowanie złożonego systemu do eksperymentów *in vitro* (i optymalizacja całego protokołu analitycznego) było jednym z najważniejszych osiągnięć i umożliwiło przeprowadzenie wysoce precyzyjnych pomiarów dynamicznej emisji (tzw. profilowania) LZO dla wszystkich mikroorganizmów badanych w tym projekcie, czego efektem jest zarówno ta praca [A-6], jak i dwie kolejne [A-7], [A-8].

Zoptymalizowana przeze mnie procedura pobierania próbek w trybie DHS pozwoliła na wyodrębnienie 44 lotnych metabolitów, których ilości wykrywane w hodowlach wrażliwego na karbapenemy szczepu *K. pneumoniae* były istotnie odmienne od ich poziomów w sterylnym medium kontrolnym, z czego 32 LZO były wydzielane przez bakterie, a 10 związków było przez nie katabolizowanych. Analogicznie, 30 statystycznie istotnych związków wykryłem dla szczepu *K. pneumoniae* opornego na karbapenemy (25 produkowanych i 5 rozkładanych). Pobieranie próbek gazowych w 1,5-godzinnych odstępach (w zakresie 0-9 godz.) pozwoliło na poznanie dynamicznych zmian zachodzących w metabolizmie LZO w bakteriach i wyodrębnienie ich trzech podstawowych profili: (1) wydzielanie LZO wprost proporcjonalne do całkowitej ilości bakterii, (2) wydzielanie LZO z przejściowym maksimum w fazie logarytmicznej wzrostu bakterii i (3) degradacja LZO od początku hodowli bakterii.

Pierwszy z wyodrębnionych profili (19 z 44 LZO istotnych dla szczepu wrażliwego i 14 z 30 dla opornego) jest zbieżny z krzywą wzrostu bakterii w hodowli. Profil ten był szczególnie wyrazisty dla alkoholi (np. 3-metylo-1-butanol, 2-metylo-1-propanol) oraz ketonów i estrów. Z punktu widzenia zastosowań klinicznych, związki te są bardzo interesujące, gdyż monitorowanie ich stężenia w wydychanym powietrzu osób ze szpitalnym zapaleniem płuc (zwłaszcza VAP), może odzwierciedlać całkowitą ilość bakterii w płucach pacjenta, więc pośrednio postęp lub ustąpienie zakażenia (np. w wyniku zastosowanej terapii antybiotykowej).

Drugi profil dotyczy związków, których produkcja jest najintensywniejsza w okresie najszybszego podziału komórkowego (punkty T3/T4 przypadające na drugą połowę fazy logarytmicznej), niezależnie od całkowitej ilości mikroorganizmów w hodowli. Po tym czasie

wydzielanie LZO spowalnia, w niektórych przypadkach spada wręcz do zera, pomimo największych ilości bakterii w czasie trwania eksperymentu. Charakterystyczną grupą związków o tym profilu były związki siarkowe (np. siarczek etylowo-metylowy, disiarczek dimetylu, disiarczek węgla, metanotiol), z których część była w niniejszej pracy przypisana do aktywności metabolicznej *K. pneumoniae* po raz pierwszy. Metabolity wykazujące profil uwalniania z chwilowym maksimum osiągają duże ilości już w początkowej fazie wzrostu bakterii, wobec czego mają duży potencjał by posłużyć w zastosowaniu klinicznym jako wczesne indykatory rozwijającej się infekcji bakteryjnej.

Trzeci z profili dotyczy katabolizmu lotnych metabolitów, rozkładanych przez bakterie prawdopodobnie dla pozyskania źródła energii lub substratów do dalszych syntez i przemian metabolicznych. Za modelowy przykład mogą posłużyć aldehydy, zwłaszcza benzaldehyd, rozkładany przez dehydrogenazę benzaldehydową dla pozyskania NADPH jako alternatywnego źródła energii. Inne aldehydy mogą być utleniane do alkoholi, co tłumaczy ich odwrotnie proporcjonalne zależności (spadek ilości aldehydów pokrywa się z wykładniczym wzrostem alkoholi).

Jednym z ważniejszych osiągnięć tej pracy było wykazanie istotnych różnic w ilościach lotnych metabolitów (tzw. *volatilome*) pomiędzy szczepem *K. pneumoniae* opornym i wrażliwym na karbapenemy. W tym aspekcie, szczep oporny produkował znacznie więcej (względem szczepu wrażliwego) nieparzystowęglowych metyloketonów, takich jak 2-pentanon, 2-heptanon i 2-nonanon, będących produktami  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, co pośrednio znajduje odniesienie w literaturze, gdzie pacjenci z zakażeniem krwi wywołanym przez *K. pneumoniae* mają zaburzony metabolizm kwasów tłuszczowych.

Ciekawe obserwacje poczyniono podczas badań wpływu antybiotyków (imipenemu) na metabolizm LZO w *K. pneumoniae*. Otóż, dodany do hodowli bakteryjnej imipenem blokuje sieciowanie peptydoglikanu w ścianie komórkowej bakterii, wobec czego następuje jej rozpad. Niemniej jednak, powinno to spowodować wydzielenie zawartości komórki (wraz ze wszystkimi jej metabolitami) do otoczenia, a mimo to nie zaobserwowano ani jednego związku na istotnie wyższym stężeniu w próbkach headspace z hodowli po dodaniu antybiotyku. Przeciwnie, stężenie 28 spośród 44 związków uwalnianych poprzednio z badanego szczepu *K. pneumoniae* zmalało po dodaniu imipenemu, co koreluje z gwałtownym spadkiem ilości żywych bakterii w hodowli. Związki te mają więc duży potencjał dla odzwierciedlenia skuteczności antybiotykoterapii w warunkach klinicznych. Z drugiej strony, dodatek imipenemu spowodował znaczną modulację *volatilomu* szczepu opornego *K. pneumoniae*, bez wpływu na proliferację tych bakterii. Być może, przyczyną zmiany profili LZO może być

uruchomienie mechanizmów oporności w odpowiedzi na dodanie imipenemu, które albo są bezpośrednio związane z procesami wytwarzania LZO albo stymulują ich wydzielanie jako metabolitów sygnałowych w komunikacji międzykomórkowej mikrośrodowiska bakteryjnego.

Ostatnim osiągnięciem niniejszej pracy było wykazanie bardzo dużej stabilności profili LZO w szczepach klinicznych (n=19), izolowanych z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych pobranych bronchoskopowo od pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc. Aż 44 spośród wszystkich 50 związków istotnie metabolizowanych przez szczepy kliniczne obecnych było (na statystycznie istotnym poziomie) w 100% badanych izolatów. Pozwoliło to na zdefiniowanie tzw. „Core Volatilome”, czyli stabilnych metabolitów uwalnianych przez wszystkie szczepy *K. pneumoniae*. Co więcej, 33 spośród 44 związków tworzących „Core Volatilome” było istotnych również dla szczepów wzorcowych, potwierdzając wysokie znaczenie modeli *in vitro* w poszukiwaniu metabolitów ważnych również dla zastosowań w diagnostyce klinicznej.

[A-7]:

***Profiling of Volatile Metabolites of Escherichia coli Using Gas Chromatography – Mass Spectrometry***

**International Journal of Molecular Sciences 2025; 26(17): 8191.**

**doi: 10.3390/ijms26178191**

Na wstępie nadmienić należy, iż niniejsza praca stanowi osiągnięcie naukowe użyte zarówno w niniejszym cyklu habilitacyjnym, jak i rozprawie doktorskiej Pani mgr. Karoliny Żuchowskiej, której jestem promotorem pomocniczym.

W ramach planowej realizacji interdyscyplinarnego projektu NCN, skonstruowany przeze mnie system do eksperymentów *in vitro* został zastosowany w badaniach metabolizmu LZO w kolejnych bakteriach chorobotwórczych. Omówione w niniejszej pracy doświadczenia z *Escherichia coli* zaplanowałem osobiście według schematu wypracowanego w poprzednich eksperymentach. Całość badań wykonana została według zoptymalizowanego przeze mnie protokołu analitycznego, przy czym osobą manualnie wykonywującą prace laboratoryjne związane z hodowlami bakteryjnymi, pobieraniem próbek i zliczaniem bakterii, była Pani Alicja Tracewska, którą – jako promotor i opiekun naukowy jej pracy magisterskiej – osobiście przeszkoliłem i później nadzorowałem. Zbierane przeze mnie z laboratorium mikrobiologicznego 10. Szpitala Wojskowego izolaty kliniczne (próbki popłuczyn oskrzelowo-

pęcherzykowych pobierane były od pacjentów z VAP przez dr Roberta Włodarskiego), zabezpieczone zostały przez Dr Tomasza Bogiela i mgr Dagmarę Depkę do przechowywania w  $-80^{\circ}\text{C}$ , a po zebraniu odpowiedniej ich ilości (tu:  $n=21$ ) były przez nich kilkakrotnie przepasażowane w celu umożliwienia użycia ich w dalszej części doświadczeń (kontynuowanych przez Panią Alicję Tracewską).

Zoptymalizowana przeze mnie metoda TD-GC-MS, której używałem do analiz wszystkich zebranych próbek, gwarantowała bardzo czułą analizę, przez co zmierzone chromatogramy były bardzo skomplikowane i zawierały średnio około 200 pików. Z racji, iż większość tych związków pochodziła z medium, staranna i prawidłowa identyfikacja, ale też ilościowa integracja pola powierzchni pików chromatograficznych była kluczowa dla oszacowania, które spośród nich są pochodzenia bakteryjnego. Biorąc pod uwagę mnogość różnych wariantów wykonanych eksperymentów, m.in. poboru próbek w 7 punktach czasowych dla 21 izolatów klinicznych oraz 6 replikatów biologicznych dla obu szczepów wzorcowych (samy, ale też po dodaniu imipenemu), ilość zmierzonych próbek (wykonanych przez mnie analiz TD-GC-MS) przekracza 300. Doświadczony naukowiec potrzebuje ponad godziny czasu na rzetelną analizę każdego tak skomplikowanego chromatogramu, co oznacza parę miesięcy wymaganych na samą tylko interpretację surowych danych chromatograficznych. Niezbędne jest więc narzędzie skracające ten czas, ale z zachowaniem poprawności uzyskanych wyników. Niestety, nie mogłem użyć oprogramowania BreathView<sup>®</sup>, znanego z poprzednich badań [A-2], gdyż jest to jest to licencjonowany produkt, należący do centrum badawczo-rozwojowego ONCOTYROL Austria i którego zakup nie został przewidziany w moim projekcie. Wobec tego podjąłem się próby stworzenia procedury możliwie najbardziej zbliżonej do programu BreathView<sup>®</sup>: sporządziłem bazę danych zawierającą 140 najczęściej wykrywane metabolity, a dla każdego z nich potwierdziłem czas retencji za pomocą osobnych analiz chromatograficznych substancji wzorcowych (metodą użytą w eksperymentach *in vitro*). Dodatkowo, każdemu związkowi w bazie danych przyporządkowałem spektrum masowe zarejestrowane dla wzorca na parametrach roboczych metody (ustawienia MS i poziom tła mogą wpływać na widmo). Dla precyzyjnej integracji powierzchni pików chromatograficznych każdemu analitowi zdefiniowałem dedykowany jon z widma masowego, tzw. „target ion”, który wybrany był jako najsilniejszy sygnał widma w przypadku całkowitej separacji pików, lub jon selektywny (kosztem intensywności, więc i czułości) w przypadku nakładania się pików związków koeluowanych. W tym drugim przypadku, prawidłowy wybór pików do zintegrowania dodatkowo ułatwiała obecność trzech charakterystycznych jonów referencyjnych, o największej selektywności dla danego analitu

(względem ko-eluatów). Po przygotowaniu powyższej bazy danych dla 140 związków zintegrowałem ją z metodą automatycznej integracji pików oprogramowania PostRun firmy Shimadzu, dodatkowo maksymalizując jego możliwości poprzez zoptymalizowanie parametrów, m.in. czułości rozpoznawania pików po nachyleniu sygnału, sposobu odejmowania tła od widma pików czy wyboru metody forward/reverse search dla porównania widma. Z racji, iż program PostRun nie miał możliwości dekonwolucji sygnałów ze spektrometru mas (w przeciwieństwie do oprogramowania BreathView®), poprawność automatycznej identyfikacji i integracji, należało „ręcznie” zweryfikować pomimo zaimplementowania powyższej procedury. Niemniej sprowadzało się to tylko do szybkiego przeglądu przeanalizowanych chromatogramów (i wykonania ewentualnych korekt), co skracało czas interpretacji z ponad godziny do mniej niż 10 minut na każdy chromatogram. Osobą weryfikującą poprawność wyników uzyskanych z automatycznej interpretacji danych była Pani mgr Karolina Żuchowska, oczywiście po szczegółowym przeszkoleniu, które dla niej w tym celu przeprowadziłem.

Pod względem merytorycznym, obie prace – [A-6] i [A-7] – stanowią logicznie ciągły program badawczy ukierunkowany na stworzenie mikrobiologicznie ugruntowanej bazy lotnych metabolitów (niejako „biomarkerów”) dla ciężkich zakażeń płuc u pacjentów wymagających mechanicznego wspomagania oddychania. W obu przypadkach zastosowano ten sam wzorzec eksperymentalny: analiza kinetyki volatilomu szczepów referencyjnych (w tym szczepów o różnym profilu oporności), ocena wpływu antybiotyku imipenemu na emisję VOC jako wskaźnika skuteczności leczenia, a następnie włączenie izolatów klinicznych pochodzących od pacjentów z VAP. Zastosowana spójność koncepcyjna ma na celu przetestowanie swego rodzaju „narzędzia analitycznego”, jakim jest analiza lotnych metabolitów, na kolejnych ważnych patogenach wywołujących VAP, w warunkach klinicznie istotnych presji, takich jak antybiotykoterapia, lekooporność oraz zmienność klonalna szczepów izolowanych od pacjentów.

W rezultacie, wyniki obu badań są zgodne koncepcyjnie: badania kinetyki wydzielania LZO z *Escherichia coli* potwierdziło tych samych trzech głównych profili: (1) proporcjonalnego do całkowitej zawartości bakterii w hodowli, (2) z przejściowym maksimum w fazie logarytmicznej wzrostu mikroorganizmów oraz (3) degradacji w czasie. To ważna z klinicznego punktu widzenia informacja, potwierdzająca istnienie grupy związków chemicznych – np. związków siarkowych – mogących sygnalizować wczesne stadium kolonizacji (dopiero rozpoczynającego się zakażenia), podczas gdy inna grupa związków – np. alkoholi i estrów – może odzwierciedlać obciążenie bakteryjne, a więc przebieg (ciężkość) zakażenia. Dla drugiego z tych przypadków ważna jest też kolejna obserwacja niniejszej pracy,

mianowicie że ekspozycja na antybiotyk powoduje bardzo silną zmianę profilu lotnych metabolitów u szczepu wrażliwego, podczas gdy „sygnatura” szczepu opornego jest dużo mniej podatna na tę interwencję (w przypadku opornego szczepu *K. pneumoniae* w ogóle się nie zmienia). Obserwacja ta jest wręcz kluczowa dla potencjalnego zastosowania klinicznego analizy bakteryjnych metabolitów w oddechu pacjentów w celu monitorowania skuteczności spersonalizowanej terapii (tu: antybiotykoterapii), choć w obecnym stanie wiedzy ograniczona jedynie do szczepów wrażliwych.

Kolejnym aspektem wykazującym ciągłość koncepcyjną badań jest scharakteryzowanie emisji LZO ze szczepów wyizolowanych z materiału BAL pobranego od pacjentów z VAP. W niniejszej pracy przeanalizowano pełen profil dla 21 szczepów klinicznych *E. coli*, wykazując, iż 39 lotnych metabolitów wytwarzanych jest przez wszystkie badane izolaty, tworząc powtarzalny „rdzeń” LZO charakterystyczny dla tego patogenu. W dodatku 27 spośród tych związków było statystycznie istotnych również dla szczepów referencyjnych (komercyjnych), wykazując wysoką zgodność profili LZO izolatów z wzorcowym modelem *in vitro*. Jednak w przypadku w niniejszej pracy oprócz modelu „core volatilome”, odwzorowującego cechę gatunkową, zaobserwowano też zbiór kolejnych 32 lotnych metabolitów o zmiennej częstotliwości występowania definiując tzw. „pan volatilome” jako cechę zmienności szczepowej.

[A-8]:

***Molecular analysis of metabolites synthesized by Candida albicans and Staphylococcus aureus in in vitro cultures and bronchoalveolar lavage specimens reflecting single or duo-factor pneumonia***

**Biomolecules 2024, 14, 788; doi: 10.3390/biom14070788**

Ostatni z artykułów w 3. Etapie cyklu habilitacyjnego rozszerza problem badawczy o jeszcze jeden aspekt, często napotykanym w praktyce szpitalnej, mianowicie współwystępowanie różnych mikroorganizmów jako czynników etiologicznych wywołujących zapalenie płuc. Zgodnie z licznymi doniesieniami literaturowymi (m.in. raportem NHSN, **amerykańskiego systemu nadzoru epidemiologicznego** prowadzonego przez CDC – Centers for Disease Control and Prevention), *Staphylococcus aureus* jest jednym z najczęstszych patogenów powodujących respiratorowe zapalenie płuc, występującym u prawie 30% wszystkich pacjentów tej grupy. Jednocześnie szacuje się, że u około 50% populacji mechanicznie wentylowanych pacjentów występuje kolonizacja dróg oddechowych grzybem *Candida albicans*. Interakcje tych dwóch gatunków prowadzą do wzrostu antybiotykoodporności u

bakterii i zwiększają ich zjadliwość, przez co stanowią istotny czynnik ryzyka wpływający na przedłużoną konieczność mechanicznego wspomagania oddychania a także na zwiększoną śmiertelność pacjentów z VAP. Dlatego też wykrycie tych dwóch mikroorganizmów i wskazanie i wzajemnej aktywności metabolicznej jest ważnym wyzwaniem współczesnej diagnostyki klinicznej. Cel ten nie zawsze może być osiągnięty za pomocą nowoczesnych metod genetycznych bazujących na amplifikacji kwasów nukleinowych (LAMP, PCR), gdyż wykrywają one specyficzne fragmenty DNA, ale pochodzące zarówno od żywych jak i martwych mikroorganizmów, co utrudnia nie tylko samo rozróżnienie zakażenia aktywnego od dawniej przebytego, ale też uniemożliwia wskazanie zachodzących interakcji międzygatunkowych, wspomnianych powyżej. W tym aspekcie analiza lotnych metabolitów wydzielanych przez *S. aureus* i *C. albicans* mogłaby idealnie uzupełnić zapotrzebowanie klinicystów, ponieważ związki te są uwalniane tylko przez czynne metabolicznie komórki, a zmiany ich profili (sygnatur) mogą odzwierciedlać wzajemne interakcje obu gatunków.

Z tego powodu zaplanowałem badania nakierowane na szczegółowe profilowanie emisji LZO z pojedynczych hodowli *S. aureus* i *C. albicans* (tzw. monokultury) oraz z ich hodowli mieszanej (tzw. ko-kultury) i przedstawiłem te plany partnerom koordynowanego przeze mnie projektu NCN, czyli Profesorowi Chrisowi Mayhew (kierownikowi Instytutu Badań Oddechu na Uniwersytecie Leopolda Franza w Innsbrucku, w którym zatrudniony byłem wcześniej na pozycji Senior Scientist) oraz Profesorowi Markusowi Nagl (z Katedry Higieny, Mikrobiologii i Medycyny Społecznej Uniwersytetu Medycznego w Innsbrucku). Dla zachowania kontynuacji i porównywalności wszystkich dotychczasowych badań *in vitro*, zaproponowałem znany z poprzednich prac system, z tym samym zoptymalizowanym protokołem wykorzystującym rurki sorpcyjne. Po uzyskaniu aprobaty oraz wsparcia technicznego z ich strony (Prof. Mayhew użyczył aparatury analitycznej, zaś Prof. Nagl pomieszczeń laboratoryjnych i materiałów niezbędnych do hodowli mikroorganizmów), osobiście przeszkoliłem studenta, Pana Matthiasa Wenzel oraz nadzorowałem i weryfikowałem poprawność jego pracy na początkowym jej etapie (przygotowanie hodowli, pobieranie próbek gazowych, analizy TD-GC-MS). W kolejnym etapie uczestniczyłem w interpretacji danych chromatograficznych (analiza jakościowa i ilościowa LZO), które trafiały następnie do p. mgr Clemensa Ager wykonującego końcowe obliczenia statystyczne i przygotowującego wizualizację końcowych wyników z pierwszej części badań (eksperymentów *in vitro* z hodowlami pojedynczymi i mieszanymi) wykonanej w całości w Innsbrucku (Austria).

Druga, niezależna analitycznie, ale spójna koncepcyjnie część niniejszej pracy, wykonana już w całości w Polsce, skupiona była na analizie lotnych metabolitów z materiału

biologicznego, tj. próbek popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL, ang. Bronchoalveolar Lavage) pobranych bronchoskopowo (przez dr. płk. Roberta Włodarskiego z 10. Wojskowego Szpitala Klinicznego w Bydgoszczy) od pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc. Aby zachować jak największą spójność z poprzednią częścią badań, pod uwagę brano jedynie te próbki BAL, w których potwierdzono (klasycznym posiewem mikrobiologicznym) obecność albo samego *Staphylococcus aureus*, albo samego *Candida albicans*, albo obu tych mikroorganizmów razem. W tej części badań osobiście odbierałem próbki BAL ze szpitalnego laboratorium mikrobiologicznego, wykonywałem wszystkie ekstrakcje LZO i wszystkie analizy GC-MS. Do interpretacji wyników użyłem opracowanej wcześniej biblioteki 140 związków (opisanej szczegółowo w poprzedniej pracy [A-7]) i po weryfikacji wyników wykonałem wszystkie testy statystyczne. Z powodu ograniczonej ilości próbki BAL (maksymalnie 5 ml), składu chemicznego i samej konsystencji matrycy – jest to gęsta, lepka zawiesina biologicznie aktywna o dużej zawartości wody, białek, lipidów, komórek efektorowych układu odpornościowego, a przede wszystkim bakterii i ich wydzielin ropnych – emisja LZO jest znacznie utrudniona i ograniczona do zaledwie śladowej ilości. Jednocześnie przepłukiwanie fazy nadpowierzchniowej strumieniem gazu nośnego mogłoby doprowadzić do obumierania zawartych w próbce bakterii (gazem bez zawartości tlenu i CO<sub>2</sub>) lub utleniania wydzielin ropnych (gazem bogatym w tlen) co fałszowałyby wynik analizy LZO. W tym przypadku decydującym czynnikiem jest więc pozostawienie próbki bez żadnych ingerencji w jej skład chemiczny i biologiczny i przeprowadzenie ekstrakcji w zamkniętym układzie statycznym. Dlatego też zdecydowałem się na zastosowanie ekstrakcji TFME.

Innowacyjność publikacji [A-8] polega więc nie tylko na mikrobiologicznym aspekcie badań – czyli szczegółowym scharakteryzowaniu i porównaniu dynamiki metabolizmu LZO w warunkach mono- i ko-kultur oraz translacyjnym odniesieniu wyników *in vitro* do *ex vivo* – lecz także na praktycznym zastosowaniu nowatorskiej metody ekstrakcyjnej Thin-Film Microextraction (TFME), wprowadzonej we wcześniejszych badaniach własnych. Bezpośrednim punktem wyjścia była publikacja [A-4] (Etap 2 niniejszego cyklu), w której opracowałem i zoptymalizowałem protokół TFME (dobór sorbentu, warunki ekstrakcji, limity detekcji) i zademonstrowałem jego wdrożenie do matryc biologicznych (linie komórkowe). Niniejsza praca – jako pierwsza na świecie – demonstrowała zastosowanie TFME-GC-MS do analizy klinicznych próbek BAL od pacjentów z intensywnej terapii.

Uwzględniając uzyskane wyniki eksperymentalne zauważyć należy, iż po raz kolejny potwierdzono występowanie trzech głównych profili metabolizmu LZO (w obu gatunkach) – (1) proporcjonalnego do całkowitej zawartości mikrobów, (2) z przejściowym maksimum w

fazie logarytmicznej oraz (3) degradacji w czasie – których implikacje kliniczne omówiono przy poprzedniej pracy. W odniesieniu do oddziaływań międzygatunkowych, ważną obserwacją było, iż pomimo takiej samej kinetyki wzrostu każdego mikroorganizmu w jego hodowli pojedynczej i mieszanej, aktywowane są częściowo inne szlaki metaboliczne, co skutkuje dynamicznymi zmianami emisji LZO w czasie trwania hodowli. Na przykład, w monokulturze *C. albicans* aż 21 związków wykazuje profil przejściowego maksimum, a jedynie 14 związków osiąga najwyższe stężenia w fazie stabilnej pod koniec eksperymentu. Kinetyka uwalniania LZO z *S. aureus* w monokulturze jest znacznie wolniejsza, bowiem tylko 11 związków wykazuje przejściowe maksimum w fazie logarytmicznej, a aż 24 związki osiągają maksimum w fazie stałej wzrostu tej bakterii. Jednakże po zmieszaniu obu gatunków w ko-kulturze, ilość wydzielanych LZO jest niemal równomiernie rozłożona pomiędzy fazę logarytmiczną i stałą (odpowiednio: 18 i 19 związków, gdzie statystyczną istotność uwalniania danego metabolitu wyznaczano zawsze względem sterylnego medium, jako próby referencyjnej). Analizując wpływ interakcji bakteryjno-grzybiczych na wytwarzanie lotnych metabolitów (zamiast ich bezwzględnej ilości), zaobserwowałem dwa zasadnicze profile dla hodowli mieszanych:

- Profil zdominowany przez jeden z mikroorganizmów, ewentualnie lekko zmodyfikowany obecnością drugiego → czego najlepszym przykładem są disiarczki węgla czy octan izobutyli jako związki w ko-kulturze zależne od *C. albicans*, choć o kinetyce spowolnionej przez obecność gronkowca (w porównaniu do monokultury grzyba). Analogicznie obecność np. 2-metylomaślanu etylu jest determinowana obecnością *S. aureus*, jako że związek ten nie był w ogóle wykryty w monokulturze *C. albicans*.
- Profil wykazujący synergizm pomiędzy gatunkami → z dalszym podziałem na *profil addytywny*, w którym ilość LZO w hodowli mieszanej jest większa niż wynikałaby z sumy jego ilości z obu hodowli pojedynczych (np. ilość walerianianu izopentyli jest 3-krotnie większa niż jego suma w obu monokulturach dla fazy stałej hodowli) oraz na *profil specyficzny*, w którym metabolit obecny jest tylko w hodowli mieszanej, a nie był wykryty w żadnej z hodowli pojedynczych (np. keton metylowo izobutylowy, obecny w fazie logarytmicznej wzrost ko-kultury).

Porównując profile LZO analizowane w próbkach BAL pozyskanego od pacjentów zainfekowanych pojedynczym patogenem oraz z infekcją dwuczynnikową (*S. aureus* + *C. albicans*), zaobserwowano, iż wiele spośród wykrytych związków jest silnie związanych z

obecnością gronkowca. Dotyczy to przede wszystkim aldehydów i węglowodorów, które wykryte były w podwyższonych ilościach w próbkach BAL zawierających *S. aureus*, bez znaczenia na występowanie *C. albicans*. Natomiast związki obu tych klas (poza acetaldehydem) nie były wydzielane przez *S. aureus* w czystych hodowlach *in vitro* badanych w tej pracy, co wskazuje na istotne różnice między modelem kontrolowanym a materiałem klinicznym. Dowodzi to, że część związków wykrywanych w BAL nie musi być bezpośrednio produkowana wyłącznie przez samą bakterię, lecz stanowi dodatkową grupę metabolitów wtórnych, których obecność wynika z interakcji patogenu z tkanką gospodarza, środowiskiem zapalnym lub odpowiedzią immunologiczną. W materiale BAL mamy bowiem sytuację, której nie odtwarza hodowla *in vitro*: w matrycy tej znajdują się też uszkodzone nabłonki dróg oddechowych, surfaktant bogaty w lipidy, obecność komórek efektorowych układu odpornościowego i spowodowany tym silny stres oksydacyjny. Środowisko takie sprzyja peroksydacji lipidów błon komórkowych gospodarza i dalszej degradacji tych lipidów do aldehydów nasyconych i nienasyconych, a także do węglowodorów (jako produktów dekarbonylacji aldehydów). W tej konfiguracji *S. aureus* pełni rolę czynnika biologicznego wyzwalającego stan zapalny i uszkodzenie tkanek, ale nie musi sam wytwarzać każdego obserwowanego w BAL związku chemicznego jako swego pierwotnego metabolitu.

Analogicznie, obecność *C. albicans* w BAL była związana z podwyższonymi poziomami alkoholi i ketonów, a wzór ten utrzymywał się nawet w obecności *S. aureus* w próbce. Niektóre spośród tych związków (mianowicie 3-heptanon, cycloheksanon, 2-metylo-2-butanol, 2-etylo-1-hexanol) nie były emitowane z czystej hodowli *C. albicans* w zastosowanych warunkach *in vitro*. Jest to kolejny argument prowadzący do wniosku, iż wolatilom BAL odzwierciedla nie tylko metabolizm samego patogenu, ale również interakcję patogen–gospodarz i proces zapalny toczący się w płucach krytycznie chorego pacjenta.

W niniejszej pracy rozszerzono wcześniejsze eksperymenty *in vitro* o badanie wpływu interakcji międzygatunkowych *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* na ich metabolizm LZO wykazując zarówno dominację jednego z mikroorganizmów jak i efekty ich synergistycznych oddziaływań w hodowlach mieszanych. Dalsze porównanie profili metabolicznych uzyskanych w precyzyjnie kontrolowanych hodowlach i wydzielinach płucnych (BAL) od pacjentów z VAP wykazało, że oprócz związków lotnych produkowanych bezpośrednio przez chorobotwórcze mikroorganizmy, obecna jest też grupa metabolitów wynikających z interakcji patogen–gospodarz. W analizach zastosowano autorski protokół ekstrakcji TFME opracowany na wcześniejszym etapie cyklu [A-4], dostosowany do matrycy

klinicznej. Omawiana praca stanowiła kluczowy etap przejściowy między doświadczeniami laboratoryjnymi i klinicznymi (*in vitro* / *ex vivo*), wprowadzając badania w fazę translacyjną i przygotowując grunt pod końcowy etap cyklu, tj. analizę oddechów pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc.

#### *Etap 4 – Translacyjne badanie kliniczne*

[A-9]:

***Analysis of Bacterial Metabolites in Breath Gas of Critically Ill Patients for Diagnosis of Ventilator-Associated Pneumonia—A Proof of Concept Study***

**Biomolecules 2024, 14, 1480; doi: 10.3390/biom14121480**

Badania będące przedmiotem niniejszej pracy były nie tylko zwieńczeniem mojego kilkuletniego projektu NCN (który uzyskał wysokie punktacje końcowych ocen merytorycznych recenzentów obu recenzentów: 14/15 i 12/15), ale również domknięciem całego cyklu habilitacyjnego, skupionego na wykorzystaniu analizy lotnych metabolitów w oddechu do diagnostyki najważniejszych chorób układu oddechowego, w tym respiratorowego zapalenia płuc (VAP). We wcześniejszych etapach wprowadzono koncepcję wielopoziomowej ewaluacji biomarkerów oddechu, opracowano i zoptymalizowano metodologię pobierania i analizy próbek oddechu, zwalidowano techniki ekstrakcji LZO wykorzystujące nowatorskie w skali światowej rozwiązania oraz zdefiniowano zestaw metabolitów pochodzenia bakteryjnego, które mogą odgrywać rolę markerów zakażeń. Niniejsze badanie stanowiło połączenie zebranego doświadczenia i wiedzy oraz praktyczne ich przełożenie na grunt kliniczny, w celu określenia, czy lotne związki organiczne o potwierdzonym pochodzeniu mikrobiologicznym, zidentyfikowane wcześniej w modelach *in vitro*, mogą zostać wykryte w oddechu pacjentów z zakażeniem dolnych dróg oddechowych oraz czy ich profil może różnicować grupy kliniczne pacjentów wentylowanych mechanicznie w Oddziale Intensywnej Terapii. Obecne badanie pilotażowe, którego byłem pomysłodawcą, miało charakter translacyjny, a jego konstrukcja zakładała porównanie obowiązujących standardów diagnostyki klinicznej VAP z uzyskanymi tu wynikami bezinwazyjnej i szybkiej analizy oddechu.

Badania te miały charakter prospektywny, a przeprowadzone zostały w Oddziale Anestezjologii i Intensywnej Terapii (OAIT) 10. Szpitala Wojskowego w Bydgoszczy, pod nadzorem płk. dr Roberta Włodarskiego, który odpowiedzialny był za selekcję pacjentów, pobieranie próbek oddechu (do szklanych strzykawek), interpretację medycznych danych i diagnozę VAP. Do badań włączono pacjentów wentylowanych mechanicznie przez okres

przynajmniej 48 godzin, u których występowało podejrzenie VAP na podstawie objawów klinicznych, wyników badań laboratoryjnych (parametry zapalne) i radiologicznych. Od każdego pacjenta pobrano bronchoskopowo próbkę popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, którą poddaną standardowej procedurze mikrobiologicznej celem potwierdzenia diagnozy VAP. Dzięki temu możliwe było zestawienie wyników analizy oddechu z ostatecznym rozpoznaniem mikrobiologicznym i pełną charakterystyką czynnika etiologicznego. Uwzględniając gwałtowną dynamikę parametrów stanu zapalnego (białko C-reaktywne, prokalcytonina) i możliwą zmianę czynników etiologicznych powodujących VAP w krótkim czasie, próbki oddechu pobierano od pacjentów kilkakrotnie w różnych dniach, jeśli nie zakłócało to rutynowej praktyki klinicznej. Strategia ta pozwala pokryć różne warunki fizjologiczne i etapy infekcji oraz zmniejszyć ryzyko stroniczości wynikającej z pobierania próbek tylko przy najwyższych wartościach CRP/PCT (które niekoniecznie wynikać muszą z zakażenia bakteryjnego).

Procedura pobierania oddechu, bazująca w całości na doświadczeniach poprzednich badań klinicznych [A-2], polegała na zaczerpnięciu do szklanej strzykawki końcowej fazy wydechu (end-tidal air) z monitorowaniem wydychanego CO<sub>2</sub> i natychmiastowym przeprowadzaniu ekstrakcji próbki na rurki sorpcyjne w warunkach precyzyjnie kontrolowanego przepływu, objętości i temperatury próbki (redukcja sorpcji wody). System ten, który skonstruowałem osobiście, znajdował się w specjalnie wydzielonym do tego celu pomieszczeniu w OAIT, co skracało czas przechowywania oddechu w szklanych strzykawkach do zaledwie kilkunastu minut, gwarantując stabilność chemiczną i brak zanieczyszczeń. Pełen protokół analityczny, od ekstrakcji próbek oddechu na rurkach sorpcyjnych, przez analizę TD-GC-MS, na interpretacji danych chromatograficznych kończąc był przeze mnie zoptymalizowany. Przez kilka początkowych miesięcy osobiście wykonywałem ekstrakcję na rurki sorpcyjne wszystkich próbek oddechu, następnie przeszkoliłem w tym celu studentkę (Panią Magdalenę Winiarek, której byłem opiekunem naukowym i promotorem pracy magisterskiej), nadzorując przez kilka kolejnych tygodni jej pracę w szpitalu, aż do uzyskania przez nią pełnej samodzielności w tym zakresie. Końcowe analizy TD-GC-MS oraz interpretacja danych pozostały w kwestii moich obowiązków.

W myśl założeń wielopoziomowej ewaluacji lotnych metabolitów w oddechu zaproponowanej w [A-1], rozpatrywano jedynie związki o pochodzeniu bakteryjnym potwierdzonym w eksperymentach *in vitro*, a w następnej kolejności przeprowadzono systematyczną i logicznie uzasadnioną redukcją zmiennych. W tym celu zidentyfikowałem zanieczyszczenia egzogenne, wykonując pomiary emisji LZO z materiałów medycznych

używanych przy mechanicznym wspomaganiu oddychania (pacjentów włączonych do niniejszego badania) i mających bezpośredni kontakt z pobieraną próbką oddechu, czyli rurki dotchawicznej z mankietem oraz jednorazowych elementów połączeniowych obwodu respiratora. Zasadniczo związki te można podzielić na dwie grupy: zanieczyszczenia trwale uwalnianie z materiałów plastikowych na wysokim poziomie oraz związki szybko (tj. w ciągu 1-24 godzin) wypłukiwane z materiałów plastikowych do poziomu zerowego. Nadmienić przy tym należy, że niektóre spośród związków o eksperymentalnie potwierdzonym pochodzeniu bakteryjny (np., octan etylu, 1-butanol) również są emitowane z badanych materiałów medycznych, jednak ich wypłukiwanie jest bardzo szybkie i już po kilkunastu godzinach spadają do poziomu zerowego (względnie do poziomu tła przeprowadzonego doświadczenia), wobec czego nie wpływają na interpretację wyników analizy oddechu pacjentów mechanicznie wentylowanych. W dalszej redukcji zmiennych zastosowałem analizy statystyczne dla porównania ilości związków w oddechach pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc oraz pacjentów mechanicznie wentylowanych, ale bez infekcji dolnych dróg oddechowych (jako grupy kontrolnej). Należy w tym miejscu podkreślić, że grupę kontrolną nie tworzyli osobnicy zdrowi, lecz pacjenci w stanie krytycznym, u których niewydolność wielonarządowa choć niezwiązana z infekcją bakteryjną, odpowiadała za śmiertelność na poziomie aż 83%. Porównanie LZO w oddechach obu grup pacjentów za pomocą nieparametrycznego testu rang Wilcozona z korektą False Discovery Rate, pozwoliło mi wyeliminować te związki, które nie osiągnęły istotności statystycznej ( $p < 0.05$ ), za wyjątkiem siarczku dimetylu i metakroleiny, których wartości „p” dla porównywanych oddechów tylko minimalnie przekroczyły wartość progową (osiągając odpowiednio 0.059 i 0.077), a które to związki były zawsze statystycznie istotne dla wszystkich mikroorganizmów badanych w warunkach *in vitro*. W kolejnym etapie redukcji zmiennych przeprowadziłem analizę ROC z zastosowaniem penalizacji modelem LASSO, przy założeniu, że wartość częstotliwości LASSO  $> 70\%$  dla danego związku świadczy o jego dużej mocy predykcyjnej (zmienna wiarygodna dla modelu), zaś wartość częstotliwości LASSO równa 30% była najmniejszą akceptowalną wartością dla włączenia związku do modelu ROC, ale tylko przy spełnieniu dodatkowego warunku, że substancja ta ma udowodnione bardzo duże znaczenie biologiczne (np. jest produkowana przez wiele gatunków bakterii). Ostatecznie do wieloczynnikowego modelu ROC różnicującego pacjentów VAP i kontrolnych pacjentów bez infekcji, włączyłem 9 następujących związków: octan etylu, 3-metylo-1-butanol, n-heptan, disiarczek dimetylu, dekanal, 1-butanol, siarczek etylometylu, siarczek dimetylu i metakroleina. Model oparty na tych związkach wykazał wysoką zdolność klasyfikacyjną w analizie ROC, mianowicie: AUC = 0.893, czułość 0.870, swoistość 0.824,

dokładność 0.862 w rozróżnianiu pacjentów z VAP od grupy bez infekcji. Wyniki te są znacznie lepsze od analogicznych prób zróżnicowania pacjentów VAP i bez VAP za pomocą parametrów laboratoryjnych mierzonych w krwi pacjenta, czyli białka C-reaktywnego, prokalcytoniny i leukocytów, rozpatrywanych zarówno z osobna (dla których AUC wynosiła odpowiednio: 0.498, 0.575 i 0.69), jak i wszystkich trzech razem (AUC=0.707, dokładność=0.702). Włączenie tych trzech parametrów w jeden test razem z 9 LZO w oddechu praktycznie nie zmieniło zdolności klasyfikacyjnej pacjentów (AUC=0.887, dokładność=0.851), świadcząc o ich ograniczonej użyteczności do diagnozowania VAP. Ze względu na wysokie ryzyko śmiertelności u pacjentów z VAP proponowany test diagnostyczny powinien cechować się jak najwyższą czułością (prawidłowa klasyfikacja „true positive”). Uzyskana dla proponowanego tu testu oddechowego wartość czułości 0.87 jest wyższa niż dla rutynowo stosowanych testów mikrobiologicznych (0.71 dla posiewu z BAL i 0.61 dla posiewu z PSB) oraz punktacji CPIS, osiągającej czułość 0.6-0.8 (w zależności od lokalnej populacji i kryteriów ocen).

Podsumowując, oprócz osiągnięć składowych (pobocznych), takich jak: wskazanie LZO pochodzenia bakteryjnego, określenia egzogenego pochodzenia związków wykrywanych w oddechu, wprowadzenie usystematyzowanej redukcji zmiennych, głównym osiągnięciem naukowym niniejszej pracy było zastosowanie testu oddechowego do zróżnicowania mechanicznie wentylowanych pacjentów z bakteryjnym zakażeniem dolnych dróg oddechowych od analogicznej grupy pacjentów bez infekcji. Wysoka zdolność klasyfikacyjna testu oraz prostota i bezinwazyjność jego przeprowadzenia sugerują, że test ten może być obiecującym narzędziem w diagnostyce VAP, gdzie wysoka czułość jest szczególnie istotna w zapobieganiu rozwojowi zagrażających życiu infekcji płuc związanych z dużą zachorowalnością.

## *Podsumowanie*

Przedstawiony cykl dziewięciu publikacji stanowi spójną, interdyscyplinarną koncepcję badawczą, której celem było poznanie biologicznego pochodzenia lotnych związków organicznych (LZO) i wykorzystanie tej wiedzy do opracowania nieinwazyjnych metod diagnostycznych w chorobach układu oddechowego. Badania te obejmują pełne spektrum działań – od eksperymentów podstawowych w modelach komórkowych i tkankowych, przez rozwój technik analitycznych, po translacyjne badania kliniczne u pacjentów intensywnej

terapii. Cały cykl odzwierciedla stopniowe przejście od badań fundamentalnych do wdrożenia praktycznego testu diagnostycznego, opartego na analizie oddechu.

W **pierwszym etapie** zdefiniowałem biologiczne podstawy emisji LZO z różnych płaszczyzn ludzkiego organizmu (komórki → tkanki → cały organizm). W pracy [A-1] po raz pierwszy zestawiono równolegle dane z trzech poziomów biologicznych – hodowli komórek, tkanek płucnych i oddechu pacjentów – wskazując związki istotnie różnicujące raka płuc od tkanek zdrowych. Opracowałem wówczas protokół eksperymentów *ex vivo* z materiałem ludzkim oraz w pełni zautomatyzowanego poboru oddechu i jego analizy metodą TD–GC–MS. Następnie, w publikacji [A-2], koncepcję tą rozszerzyłem na choroby zapalne, wykazując, że profil LZO w oddechu pozwala różnicować stabilne i zaostrzone fazy POChP, co potwierdziło przydatność analizy oddechu jako markera zmian stanu klinicznego. W **drugim etapie** skoncentrowałem się na rozwoju technologii analitycznych. W artykule przeglądowym [A-3] podsumowałem aktualny stan wiedzy o technikach mikroekstrakcji, wskazując ich ograniczenia i kierunki rozwoju w analizie biologicznej. W odpowiedzi na te potrzeby zaadaptowałem nową metodę *Thin-Film Microextraction (TFME)* i zoptymalizowałem utworzony protokół analityczny pod kątem oznaczeń LZO w hodowlach komórkowych [A-4], zapewniając wysoką powtarzalność i niskie limity detekcji. Następnie w pracy [A-5] przeprowadziłem optymalizację oraz walidację metody wykorzystującej włókna SPME pokryte nowej generacji fazą ekstrakcyjną (HLB/PTFE), potwierdzając jej dokładność i stosując do analizy metabolitów komórek nowotworowych B16 i LL2. **Trzeci etap (ETAP 3)** poświęcony był metabolomice mikroorganizmów w modelach *in vitro* i *ex vivo*. W publikacji [A-6] scharakteryzowałem profile LZO charakterystyczne dla *Klebsiella pneumoniae* w różnych fazach wzrostu i przy ekspozycji na antybiotyki, identyfikując metabolity odzwierciedlające adaptację do stresu antybiotykowego. W pracy [A-7] badałem metabolizm LZO z *Escherichia coli*, kolejnej bakterii spośród krytycznych czynników etiologicznych VAP, wskazując grupy związków o potencjale diagnostycznym. Z kolei w publikacji [A-8] rozpatrywałem wpływ interakcji międzygatunkowych na emisję LZO w hodowlach mieszanych *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*, a uzyskane wyniki porównałem dodatkowo z analizami materiałów klinicznych (popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, BAL) z tymi samymi patogenami, wykazując częściową zgodność profili LZO między modelem laboratoryjnym i próbkami ludzkimi. W **etapie czwartym [A-9]** zaplanowałem i przeprowadziłem badania kliniczne, w którym opracowałem test oddechowy dla klasyfikacji pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc względem kontrolnej grupy krytycznie chorych pacjentów bez zakażenia dolnych dróg

oddechowych. Test ten finalnie bazował na analizie 9 LZO pochodzenia bakteryjnego i osiągnął sprawność klasyfikacyjną  $AUC=0.893$  względem diagnostyki opartej na BAL, co stanowi dowód na możliwość praktycznego wykorzystania analizy oddechu w rozpoznawaniu zakażeń płuc u pacjentów wentylowanych mechanicznie.

#### **4.1.4. Oświadczenia o wkładzie własnym w artykuły będące podstawą autoreferatu**

##### **[A-1]**

Jako główny autor artykułu byłem inicjatorem i współpomysłodawcą eksperymentów, przedstawiając koncepcję porównania trzech poziomów biologicznych – komórek, tkanek i oddechu, zawsze z odpowiednio dobraną grupą kontrolną – w jednym spójnym modelu analitycznym, potwierdzającym związek lotnych metabolitów z nowotworem płuc. Osobiście łączyłem poszczególne składowe tej interdyscyplinarnej współpracy pomiędzy jednostkami klinicznymi i laboratoryjnymi, odbierając tkanki płuc podczas operacji lobektomii od wszystkich pacjentów, przygotowując próbki tkanek i transportując je do patologa celem wyodrębnienia części użytecznej do dalszych badań metabolomicznych. Samodzielnie zaprojektowałem i skonstruowałem układ do ekstrakcji LZO *ex vivo* z tkanek płuc oraz zoptymalizowałem protokół, przeprowadzając szczegółową charakterystykę sorbentów i sposobów redukcji sorpcji wody. Stworzyłem pełną metodę analityczną TD-GC-MS optymalizując parametry desorpcji termicznej, krioskupiania z wtórną desorpcją, programu temperaturowego kolumny GC, kończąc na parametrach pracy spektrometru mas. Stosując protokół pobierania oddechu uwzględniający wpływ aktywności fizycznej na skład wydychanego powietrza (przebadany w moich poprzednich pracach) porównywałem dwie techniki pobierania oddechu: za pomocą zwykłej plastikowej słomki i nowo skonstruowanego zautomatyzowanego urządzenia, który następnie wdrożono w badaniach klinicznych. Przeprowadziłem wszystkie analizy chromatograficzne zebranych próbek, w tym osobne analizy wzorców celem potwierdzenia czasów retencji dla prawidłowej identyfikacji metabolitów oraz kalibracji dla ich oznaczenia ilościowego. Uczyłem, a potem nadzorowałem prace współpracowników (A. Filipiak, A. Sponring) w aspekcie interpretacji danych chromatograficznych. Uczestniczyłem w pisaniu manuskryptu łącznie z dyskusją wyników i odpowiedziami na recenzje.

### [A-2]

Jako współautor pierwszy z równorzędnym wkładem (*equal contribution*) uczestniczyłem w planowaniu całości badań, zdefiniowałem kolejne etapy usystematyzowanej redukcji zmiennych przed końcową analizą statystyczną wyników oraz wykonałem ich pełną dyskusję. Na wcześniejszym etapie, zoptymalizowałem parametry pracy nowego urządzenia skonstruowanego przez mgr. inż. Helmuta Wiesenhofera. W ramach zatrudnienia w centrum badawczo-rozwojowym ONCOTYROL byłem beta-testerem specjalistycznego programu do dekonwolucji sygnałów spektrometru mass dla automatycznej interpretacji danych GC-ToF-MS. Uczestniczyłem zarówno w pisaniu pierwotnego manuskryptu, jak i poprawianiu wersji końcowej w odpowiedzi na recenzje.

### [A-3]

Rozpoczynając swoje zatrudnienie na stanowisku adiunkta w Collegium Medicum UMK, skorzystałem z możliwości współpracy z Panią Profesor Barbarą Bojko (uznaną specjalistką w dziedzinie technik ekstrakcyjnych i analiz chromatograficznych) i wspólnie z nią napisałem pracę przeglądową, w której nakreślono wyzwania i dalsze perspektywy dla zastosowania SPME w badaniach ludzkiego metabolomu. Z technicznego punktu widzenia, mój wkład w pracę obejmował samodzielne napisanie wszystkich sekcji 2.1.-2.5. poświęconych analizie lotnych związków, a także współudział w pisaniu sekcji 1. (Introduction) i 4. (Concluding remarks) oraz zaplanowanie i przygotowanie grafik i tabel. Zaś z merytorycznego punktu widzenia, mój wkład był koncepcyjny: postulowałem aby ująć SPME nie tyle jako technikę, co platformę łączącą różne płaszczyzny badań (*in vitro* ↔ *ex vivo* ↔ *in vivo*) poprzez analogię do własnych poprzednich doświadczeń. W aspekcie programowym, zaproponowane przeze mnie przyszłe perspektywy: poszukiwanie alternatywnych form (geometrii) urządzeń do mikroekstrakcji czy stabilnych sorbentów o szerokim zakresie sorpcyjnym, były jednocześnie warstwą programową, zapowiadającą moje kolejne badania w tym kierunku (potwierdzeniem ich realizacji są kolejne prace tego cyklu).

### [A-4]

Oprócz wkładu koncepcyjnego – praca ta jest bowiem bezpośrednią odpowiedzią na wyzwania analityczne zdefiniowane przeze mnie w poprzedniej pracy przeglądowej [A-3] – zaproponowałem rozwiązania analityczne i osobiście zaplanowałem optymalizację protokołu TFME oraz przeprowadziłem wszystkie pełne doświadczenia w tym zakresie (ekstrakcja, analiza GC-MS, interpretacja wyników). Analogicznie, w fazie eksperymentów *in vitro* z

komórkami A549, osobiście przeprowadziłem ekstrakcję TFME ze wszystkich próbek dostarczonych przez mgr. Paulinę Szeliską i dr Karola Jarocho, a następnie wykonałem wszystkie analizy GC-MS i interpretację wyników (w tym statystycznych). Dostarczyłem również środków finansowych do zakupu substancji wzorcowych niezbędnych do potwierdzenia identyfikacji metabolitów i ich kalibracji. Nauczyłem mgr. Karolinę Żuchowską przygotowania mieszanin lotnych standardów (z ciekłych wzorców) i wykonania kalibracji wybranych związków, dodatkowo nadzorując jej pracę. Uczestniczyłem w pisaniu wszystkich części pierwszego draftu manuskryptu, a jako autor korespondencyjny przygotowałem odpowiedzi do recenzentów i wykonywałem korekty w finalnej wersji manuskryptu.

#### [A-5]

Podczas odbywania stażu naukowego w Middle East Technical University w Ankarze (Turcja) zaprojektowałem i w pełni wykonałem wszystkie doświadczenia w procesie optymalizacji warunków ekstrakcji i desorpcji za pomocą nowej generacji włókien HLB/PTFE-SPME przygotowanych w grupie Prof. Ezel Boyaci (wykonałem etapy: ekstrakcji, analiz GC-MS, interpretacji chromatogramów i omówienia wyników). Analogicznie, zaprojektowałem i wykonałem walidację uprzednio zoptymalizowanej metody dla nowych włókien SPME (wszystkie etapy). W czynnościach tych częściowo asystowali mi studenci METU (Merve Çakmakçı i Silanur Sevgen), co było formą przeszkolenia ich do samodzielnych prac w przyszłych projektach. Opracowany protokół analityczny zweryfikowałem analizując lotne metabolity w próbkach biologicznych. W tym celu zastosowałem nowej generacji włókna SPME i zwalidowaną procedurę analityczną w eksperymentach *in vitro* z liniami komórek nowotworowych B16F10 (czerniak) i LL2 (rak płuc), przeprowadzając samodzielnie wszystkie ekstrakcje LOZ, analizy GC-MS, interpretacje chromatogramów i omówienie uzyskanych wyników. Pod względem redakcyjnym, uczestniczyłem w pisaniu manuskryptu (materiały i metody, opis wyników i ich dyskusja) oraz odpowiedzi do recenzentów i związanych z tym poprawek końcowej wersji artykułu.

#### [A-6]

Jako wnioskodawca i kierownik projektu NCN, z realizacji którego powstała niniejsza praca, byłem autorem całej koncepcji badań, zarówno pod względem merytorycznym jak i technicznym, przy czym konkretne szczegóły dotyczące hodowli mikroorganizmów (dawki antybiotyków, rozcieńczenia do zliczeń posiewu, i inne) wymagały konsultacji ze specjalistą w dziedzinie mikrobiologii, tj. Dr. Tomaszem Bogielem. Samodzielnie zaprojektowałem i

skonstruowałem cały system do eksperymentów *in vitro*, umożliwiającego jednocześnie hodowlę bakterii 3D w stabilnych warunkach oraz dynamiczny pobór próbek gazowych (DHS) na rurki sorpcyjne w regularnych odstępach czasu (profilowanie emisji LZO) z gwarantowaną zabezpieczeniem przed kontaminacją próbek i powtarzalnością całej procedury (redukcja sorpcji wody, precyzyjna kontrola przepływów). Wykonałem analizy GC-MS i brałem udział w interpretacji zebranych danych chromatograficznych. Sfinansowałem z kierowanego przeze mnie projektu zakup aparatury TD-GC-MS, części niezbędnych do konstrukcji systemu *in vitro*.

Pod względem redakcyjnym jako autor główny i korespondencyjny, zaplanowałem konspekt publikacji – podział na sekcje poświęcone kolejnym problemom badawczym, uczestniczyłem w pisaniu wszystkich sekcji manuskryptu, zwłaszcza szczegółowej dyskusji wyników, odpowiedzi na recenzje i związanych z nimi korektach końcowej wersji manuskryptu.

#### [A-7]

Z racji, iż niniejsza praca jest kontynuacją tego samego projektu, rozszerzającą spójne koncepcyjnie wyniki o kolejny patogen z grupy „krytycznych” (wg raportu WHO z 2017r.), mój wkład jest identyczny jak w poprzedniej pracy, przy czym dodatkowo stworzyłem protokół do automatycznej interpretacji danych chromatograficznych, bazującego na bibliotece 140 metabolitów (zmierzonych przeze mnie metodą GC-MS użytą w badaniach *in vitro*). Koszt zakupu wszystkich wzorców, na podstawie których zbudowałem bibliotekę metabolitów, pokryty został z mojego projektu NCN nr 2017/26/D/NZ6/00136. Poczynione w tym celu czynności opisane są szczegółowo w poprzednich częściach niniejszego autoreferatu. Pod względem redakcyjnym, uczestniczyłem w pisaniu pierwotnego manuskryptu, a jako tzw. autor korespondencyjny odpowiadałem również za rewizję i korekty manuskryptu aż po końcową jego wersję oraz za szczegółowe odpowiedzi do recenzentów.

#### [A-8]

W pierwszej części niniejszej pracy, byłem pomysłodawcą badań, osobiście przeszkoliłem studenta (Matthias Wenzel) do wykonywania eksperymentów *in vitro* z pojedynczymi i mieszanymi hodowlami *S. aureus* i *C. albicans*, nadzorowałem i weryfikowałem poprawność jego pracy na początkowym jej etapie (pobieranie próbek gazowych z hodowli, analizy TD-GC-MS), a także uczestniczyłem w interpretacji danych chromatograficznych (analiza jakościowa i ilościowa LZO).

W drugim etapie pracy, samodzielnie zaplanowałem i zrealizowałem całość badań, poczynając od odbierania próbek BAL ze szpitalnego laboratorium mikrobiologicznego, przez wszystkie ekstrakcje TFME, pomiary GC-MS, interpretacje danych, na analizie statystycznej wyników kończąc. Pod względem redakcyjnym jako autor pierwszy i korespondencyjny, uczestniczyłem we wszystkich etapach pisania każdej części niniejszej pracy, dyskusji wyników, odpowiedzi do recenzentów i korekt w finalnej wersji manuskryptu.

#### [A-9]

Jako wnioskodawca i kierownik projektu NCN (nr 2017/26/D/NZ6/00136) opracowałem szczegółową koncepcję całości badań łączących eksperymenty laboratoryjne (hodowle *in vitro* mikroorganizmów) oraz kliniczne (oparte na analizie oddechu). Osobiście zaprojektowałem i skonstruowałem urządzenia stanowiące platformę analityczną wykorzystywaną w badaniach, opracowałem i zoptymalizowałem protokoły analityczne, szkoliłem studentów i nadzorowałem ich pracę na poszczególnych etapach, finansowałem zakup materiałów zużywalnych i środków trwałych niezbędnych do realizacji doświadczeń. Współwykonywałem interpretację danych chromatograficznych i przeprowadziłem wszystkie analizy statystyczne prowadzące do końcowego testu oddechowego. Pod względem redakcyjnym jako autor pierwszy i korespondencyjny, uczestniczyłem we wszystkich etapach pisania każdej części niniejszej pracy, dyskusji wyników, odpowiedzi do recenzentów i korekt w finalnej wersji manuskryptu.

#### 4.1.5. Przegląd najważniejszych osiągnięć naukowych będących podstawą autoreferatu

#### [A-1]

- Wykazanie większej użyteczności (tj. większej ilości oraz stężenia LZO) pobierania powietrza pęcherzykowego (*end tidal air*) za pomocą nowo skonstruowanego, zautomatyzowanego urządzenia kontrolowanego wbudowanym kapnometrem, względem pobierania powietrza całkowitego (*mixed expiratory air*) metodą klasyczną i wdrożenie nowej procedury w badaniu klinicznym (pacjenci z nowotworem płuc).
- Opracowanie, zoptymalizowanie i zastosowanie prototypowego systemu do ekstrakcji LZO *ex vivo* z materiału ludzkiego (tkanki płuc) gwarantującego wysoką czułość analiz z jednoczesną redukcją sorpcji wody na węglowych sitach molekularnych.
- Opracowanie, zoptymalizowanie i zastosowanie pełnej, uniwersalnej, metody analitycznej TD–GC–MS do oznaczania szerokiego zakresu LZO z wysoką czułością

(limity detekcji na poziomie ppt, wyznaczone z krzywej kalibracyjnej) we wszystkich matrycach biologicznych.

- Wykazanie różnic w profilach metabolicznych dla tkanek nowotworowych względem tkanek zdrowych płuca i analogicznie – dla oddechów pacjentów z rakiem płuc względem oddechów osób zdrowych.
- Wyselekcjonowanie związków występujących w sposób spójny (pod względem gradientu stężenia i istotności statystycznej) w próbkach z dwóch oraz wszystkich trzech poziomów biologicznych: komórkowym, tkankowym i oddechowym.
- Potwierdzenie użyteczności modelu wielopoziomowej ewaluacji biologicznego znaczenia lotnych metabolitów w oddechu, który stał się ramą dla późniejszych badań w cyklu habilitacyjnym – analiz biomarkerów bakteryjnych w oddechu pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc.

#### [A-2]

- Modyfikacja protokołu pobierania oddechu dla zwiększenia stabilności próbki i zapobiegania jej zanieczyszczeniu poprzez wyeliminowanie worków Tedlarowych i ekstrakcję LZO na rurkach sorpcyjnych w miejscu poboru próbek → protokół ten zastosowano w kolejnych badaniach klinicznych niniejszego cyklu oraz jako platformę startową do konstrukcji nowej generacji samplera (do ekstrakcji w czasie rzeczywistym) we współpracy z firmą PAS Technology Deutschland.
- Potwierdzenie użyteczności prototypowego oprogramowania z dekonwolucją sygnału MS do automatycznej identyfikacji i integracji złożonych danych chromatograficznych.
- Zastosowanie logicznie uzasadnionej sekwencji redukcji zmiennych, na etapie poprzedzającym końcową klasyfikację pacjentów, celem uniknięcia nieprawdziwych wyników (tzw. *voodoo correlations*) → strategię redukcji zmiennych zastosowano też w kolejnym badaniach oddechu w tym cyklu
- Chemiczna identyfikacja LZO w oddechu rozróżniających pacjentów w fazie zaostření POChP względem stabilnego POChP.

#### [A-3]

- Oryginalna koncepcja metodologiczna – kompleksowa analiza techniki SPME jako platformy łączącej badania kliniczne, farmakologiczne i biotechnologiczne z ludzkim metabolomem.

- Zdefiniowanie barier analitycznych (np. pojemność sorbentów, efekt matrycy, walidacja) i sformułowanie standardów dla zastosowań klinicznych.
- Nakreślenie dalszych perspektyw dla wykorzystania analizy ludzkiego metabolomu w praktyce klinicznej – zaproponowanie integracji mikroekstrakcji z metabolomiką LZO w modelach *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* – jako punkt odniesienia dla badań translacyjnych.
- Wskazanie kierunków rozwoju technik mikroekstrakcyjnych – ukierunkowanie dalszych rozwojowych w tym cyklu.

#### [A-4]

- Optymalizacja protokołu analitycznego wykorzystującego siatki TFME do ekstrakcji LZO z próbek biologicznych z wyznaczenie limitów detekcji dla wybranych LZO
- Pierwsze na świecie zastosowanie siatek TFME pokrytych sorbentem HLB dla ekstrakcji lotnych metabolitów z komórek nowotworowych
- Potwierdzenie zgodności emisji wybranych lotnych metabolitów (np. pirydyna, butanedion) w badaniach *in vitro* (linie komórkowe) i *ex vivo* (tkanki płuc) – potwierdzona translacyjność badań z różnymi matrycami biologicznymi
- Dostarczenie podstawy metodologicznej do dalszych badań w cyklu (analizy BAL), a nawet ogólnodostępnego protokołu analitycznego bo badania emisji LZO z próbek biologicznych (w formie „open access” w Green Analytical Chemistry 2025).

#### [A-5]

- Eliminacja bleeding’u z nowej generacji włókien SPME wytworzonych przez partnera projektu (faza ekstrakcyjna: Teflonu + HLB) i optymalizacja protokołu mikroekstrakcji z ich użyciem.
- Pełna walidacja analityczna wcześniej zoptymalizowanego protokołu (powtarzalność intra/inter-fiber, liniowość, LOD, precyzja, dokładność, efekt przeniesienia, stabilność).
- Pierwsze zastosowanie włókien z teflonową fazą ekstrakcyjną do analiz lotnych metabolitów z komórek nowotworowych (B16 i LL2).
- Potwierdzenie onkogenego pochodzenia LZO zgłaszanych wcześniej w literaturze i zaproponowanie kolejnych metabolitów.
- Wykazanie wpływu leku przeciwnowotworowego (Kombretastatyny A4) na metabolizm LZO w komórkach czerniaka (B16F10) i raka płuca (LL2).

#### [A-6]

- Stworzenie eksperymentalnego systemu *in vitro* do badań bakteryjnego volatylomu.
- Wykonano pierwsze pełne profilowanie dynamicznych zmian LZO dla *K. pneumoniae*  
→ wyodrębniono trzy główne profile kinetyki LZO: (1) proporcjonalny do całkowitej zawartości bakterii w hodowli, (2) z przejściowym maksimum w fazie logarytmicznej wzrostu mikroorganizmów oraz (3) degradacji w czasie.
- Wykazano istotne różnice w emisji LZO przez szczepy wrażliwy i oporny na karbapenemy (np. 2-pentanon, 2-heptanon, 2-nonanon).
- Udowodniono wpływ antybiotyków na metabolizm LZO bakterii, co świadczy o potencjale bakteryjnych LZO do odzwierciedlania odpowiedzi na antybiotykoterapię.
- Potwierdzono bardzo wysoką stabilność profili LZO uwalnianych z izolatów klinicznych *K. pneumoniae* – aż 44 z 50 istotnych ( $p < 0.05$ ) metabolitów wykryto w 100% badanych izolatów – definiując tzw. „core volatilome” dla *K. pneumoniae*.
- Potwierdzono użyteczność modeli *in vitro* dla identyfikacji biologicznie istotnych metabolitów poprzez wykazanie zgodności profili LZO izolatów klinicznych i szczepów wzorcowych.

#### [A-7]

Analogicznie, jak w poprzedniej pracy, lecz w odniesieniu do *Escherichia coli*, tj.:

- W pełnym profilowaniu LZO potwierdzono te same trzy główne profile ich emisji.
- Wykazano statystycznie istotne różnice w profilach LZO dla szczepu opornego i wrażliwego na antybiotyki.
- Wykazano silnie supresyjny wpływ antybiotyków na emisję LZO z wrażliwego *E. coli*.
- Rozszerzono koncepcję „core volatilome” (łącznie 39 LZO) odwzorowującego cechę gatunkową izolatów klinicznych *E. coli* ( $n=21$ ) o dodatkowy „pan volatilome” (łącznie 32 LZO) jako cechę zmienności szczepowej.
- Opracowano protokół automatycznej interpretacji danych z analiz chromatograficznych

#### [A-8]

- Na podstawie porównania pełnych profili LZO z hodowli pojedynczych i mieszanych *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*, wykazano wpływ interakcji bakteryjno-grzybiczych na emisję lotnych metabolitów:  
→ efekt dominacji jednego z mikroorganizmów  
→ efekt addytywny wynikający z synergizmu obu mikroorganizmów

- Po raz pierwszy na świecie zastosowano protokół TFME-GC-MS do analizy lotnych metabolitów w próbkach klinicznych BAL, potwierdzając jego przydatność w badaniach translacyjnych.
- Poprzez porównanie wyników badań *in vitro* (hodowle *S. aureus* i *C. albicans*) z analizą *ex vivo* materiału BAL wykazano, że:
  - obecność konkretnych patogenów kształtuje charakterystyczne profile metabolitów lotnych w wydzielinach płucnych pacjentów z VAP
  - wśród LZO wykrytych w materiale biologicznym znajdują się metabolity zdefiniowane w modelach *in vitro*
  - niektóre grupy związków (np. aldehydy, węglowodory) występują wyłącznie w materiale klinicznym, co dowodzi ich pochodzenia z interakcji patogen–gospodarz i procesów zapalnych w płucach

#### [A-9]

- Potwierdzenie wykrywalności wyselekcjonowanych związków o pochodzeniu bakteryjnym w oddechu pacjentów wentylowanych mechanicznie.
- Określenia egzogenego pochodzenia związków wykrywanych w oddechu pacjentów wentylowanych mechanicznie i tempa ich eliminacji.
- Wprowadzenie usystematyzowanej redukcji zmiennych w analizie oddechu.
- Zastosowanie końcowego testu oddechowego bazującego na dziewięciu wyselekcjonowanych metabolitach pochodzenia bakteryjnego do klasyfikacji pacjentów VAP względem pacjentów mechanicznie wentylowanych bez infekcji.
- Porównanie wydajności klasyfikacyjnej tego testu z innymi metodami diagnostycznymi VAP aktualnie stosowanymi w praktyce klinicznej.

#### 4.2. Drugie osiągnięcie naukowe – współpraca z partnerami nieakademickimi w ramach współpracy nauki z biznesem

Podczas zatrudnienia w centrum badawczym Oncotyrol oraz Uniwersytecie Leopolda Franza w Innsbrucku, jako Senior Scientist uczestniczyłem w badaniach naukowych, ale też działaniach rozwojowo-wdrożeniowych we współpracy z partnerami biznesowymi. Jednym z nich była firma Five Technologies GmbH (Monachium, Niemcy), która w tamtym czasie rozwijała się jako producent spektrometrów mas z analizatorem czasu przelotu (ToF-MS).

Jednocześnie z rozwojem zaawansowanej aparatury analitycznej firma ta opracowywała specjalistyczne oprogramowanie dedykowane do interpretacji bardzo złożonych danych pomiarowych. Jako klient i użytkownik aparatury ToF-MS zakupionej od tej firmy, a jednocześnie partner naukowy w koordynowanym przez Oncoytrol przedsięwzięciu byłem Beta-Testerem oprogramowania BreathView® (w latach 2012-2015) będąc odpowiedzialnym za: weryfikowanie poprawności detekcji i identyfikacji związków w próbce (w oparciu o stworzoną przeze mnie bazę danych zawierającą widma masowe zsynchronizowane z czasami retencji zmierzonymi dla substancji wzorcowych), a także poprawność integracji powierzchni pików chromatograficznych bazujących na sygnałach spektrometru mas poddanym procesowi dekonwolucji. Dodatkowo wykrywałem błędy w funkcjonowaniu programu i oceniałem jego użyteczność w zastosowaniu do rzeczywistych próbek (oddechy pacjentów w badaniach klinicznych w Austrii). Efekt współpracy była końcowa wersja oprogramowania BreathView® do chemometrycznej interpretacji złożonych danych GC-MS oraz GC-ToF-MS, którego licencja należy do centrum ONCOTYROL.

Drugą firmą, z którą współpracowałem już po zatrudnieniu na stanowisku adiunkta w Collegium Medicum UMK, była PAS Technology Deutschland (Magdała, Niemcy). Firma ta była partnerem kierowanego przeze mnie projektu (MNISW/2020/331/DIR: *Zminiaturyzowane i zautomatyzowane urządzenie do pobierania próbek wydychanego powietrza o potencjalnym znaczeniu w diagnostyce medycznej*) realizowanego w ramach programu Inkubator Innowacyjności 4.0. Nawiązana współpraca miała na celu skonstruowanie urządzenia do w pełni zautomatyzowanego pobierania powietrza pęcherzykowego (end-tidal air) poprzez elektroniczne sterowanie elektrozaworami zależne od wydychanego CO<sub>2</sub>, z jednoczesną ekstrakcją oddechu na rurkach sorpcyjnych w ściśle kontrolowanych warunkach temperatury, przepływu i objętości gazowej próbki. Moim udziałem było opracowanie koncepcji urządzenia i jego projektowanie w oparciu o doświadczenia z poprzednich badań w Austrii, a także testowanie urządzenia w warunkach rzeczywistych, tj. pobierania oddechu od pacjentów wentylowanych mechanicznie na Oddziale Anestezjologii i Intensywnej Terapii 10 WSK w Bydgoszczy.

#### 4.3. Analiza bibliometryczna

Dane naukometryczne zestawione zostały dnia 08.09.2025r. przez pracowników (Annę Kaszewską i Joannę Słomkowską) Biblioteki Medycznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, nr sygnatury: OBG-02-1.63.303.2025.

##### ***Całość dorobku naukowego:***

Łączna wartość punktacji KBN/MNiSW: 1976.000

Wartość wskaźnika IF: 136.492

Cytowania (Web of Science Core Collection): 3558

Cytowania bez autocytowań (Web of Science Core Collection): 3389

Index H=22 (Web of Science Core Collection)

Cytowania (Scopus): 3817

Cytowania bez autocytowań (Scopus): 3649

Index H=23 (Scopus)

##### ***Dorobek po uzyskaniu stopnia doktora:***

Łączna wartość punktacji KBN/MNiSW: 1710.000

Wartość wskaźnika IF: 111.434

#### 4.4. Podsumowanie pozostałego dorobku i osiągnięć naukowych poza cyklem habilitacyjnym

Poza realizacją badań stanowiących osiągnięcie naukowe niniejszego cyklu habilitacyjnego byłem wykonawcą grantów badawczych o zasięgu międzynarodowym, czego efektem były liczne publikacje naukowe dotyczące metodologii chromatograficznej, rozwoju technik ekstrakcyjnych oraz lotnych biomarkerów, stanowiących istotny wkład w dyscyplinie chemii analitycznej i badań metabolomicznych.

##### 4.4.1. Artykuły naukowe opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora

Dla lepszej przejrzystości, prace – opublikowane już po uzyskaniu stopnia doktora, ale nie wchodzące w cykl habilitacyjny – podzielone na zbiory określające tematykę ich badań.

## *Rozwój technik mikroekstrakcyjnych*

Zbiór obejmuje prace poświęcone rozwojowi i zastosowaniu nowoczesnych technik ekstrakcyjnych do analizy związków lotnych i nielotnych w materiałach biologicznych, w kontekście diagnostyki infekcji oraz monitorowania skuteczności terapii. Wspólnym mianownikiem tych badań jest dążenie do opracowania metod umożliwiających zintegrowaną ocenę stanu pacjenta poprzez równoległą analizę biomarkerów metabolomicznych i farmakokinetycznych. Takie podejście stanowi istotny krok w kierunku spersonalizowanej terapii zakażeń u pacjentów krytycznie chorych, zwłaszcza w warunkach intensywnej terapii, gdzie zarówno wczesna diagnostyka, jak i kontrola skuteczności leczenia antybiotykowego mają kluczowe znaczenie.

W ramach tego kierunku opracowano i zoptymalizowano szereg rozwiązań ekstrakcyjnych, pozwalających na efektywne pozyskiwanie i oznaczanie związków o szerokim zakresie polarności. Dotyczyło to zarówno lotnych metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego, jak i substancji nielotnych – frakcji wolnej (niezwiązanej z białkami osocza) antybiotyków stosowanych w leczeniu VAP. Opracowane tu po raz pierwszy na świecie pełne protokoły analityczne dla technik TD (dedykowany system dla rurek sorpcyjnych), SPME (nowej generacji włókna z fazą HLB/PTFE), TFME (siatki węglowe pokryte HLB) do końcowych analiz GC–MS – ale także LC–MS/MS – umożliwiły oznaczanie związków endo- i egzogennych (chemoterapeutyków) w różnych matrycach biologicznych: od oddechu pacjenta po krew i płyn oskrzelowo-pęcherzykowy (BAL). Zastosowane metody pozwoliły na ilościowe oznaczanie frakcji wolnych antybiotyków  $\beta$ -laktamowych (piperacyliny i imipenemu) w próbkach klinicznych pozyskanych od pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc (potwierdzonym mikrobiologicznie), co umożliwia ocenę rzeczywistej dostępności leku w miejscu zakażenia. Jak wykazano, dla pacjentów w stanie krytycznym ilości biologicznie aktywnego leku w ognisku zakażenia (płuca) różni się znacznie od informacji z oficjalnej Charakterystyki Produktu Leczniczego.

Kolejnym istotnym osiągnięciem zbioru jest rozwój narzędzi analitycznych umożliwiających zwiększenie zakresu analizowanych związków, czułości i powtarzalności analiz. Scharakteryzowano między innymi włókna SPME z nowatorską powłoką HLB/PTFE, charakteryzujące się wysoką odpornością chemiczną i trwałością oraz zademonstrowano ich użyteczność do analiz z użyciem chromatografii ciekowej i gazowej tych samych próbek biologicznych (linii komórek nowotworowych).

Sumarycznie, badania te potwierdziły, że mikroekstrakcja (SPME, TFME) stanowi uniwersalne narzędzie dla analizy biomarkerów w badaniach translacyjnych. Udowodniono, że zastosowane techniki umożliwiają integrację dwóch dotychczas odrębnych obszarów: diagnostyki za pomocą testów oddechowych oraz terapeutycznego monitorowania stężeń leków (Therapeutic Drug Monitoring, TDM), w spójną koncepcję metabolomiczno-farmakologiczną. Wkład naukowy tych prac polega zatem na scharakteryzowaniu i zastosowaniu metod analitycznych, które nie tylko umożliwiają identyfikację i ilościową ocenę związków lotnych w kontekście zakażeń, ale także pozwalają na kontrolę efektywności farmakoterapii, stanowiąc podstawę dla rozwoju spersonalizowanej medycyny w warunkach intensywnej terapii.

#### Lista publikacji:

- [B-1] Kahremanoğlu K, Jaroch K, Szeliska P, **Filipiak W**, Charemski B, Żuchowska K, Çetin E, Eroğlu A, Bojko B, Boyaci E  
*Assessment of thermal and solvent stable SPME fibers for metabolomics studies performed in living systems*  
Talanta, 2025, vol. 287, 127646; doi: 10.1016/j.talanta.2025.127646  
**IF:** 6.1                      **MNiSW:** 100                      **cytowań:** 1
- [B-2] Żuchowska K, **Filipiak W**, Bojko B  
*Protocol for the untargeted analysis of volatile metabolites in the headspace of biological samples using Thin-Film Microextraction coupled to GC–MS*  
Green Analytical Chemistry, 2025, vol. 13, 100242; doi: 10.1016/j.greeac.2025.100242  
**IF:** 6.2                      **MNiSW:** 5                      **cytowań:** 5
- [B-3] Włodarski R, Żuchowska K, **Filipiak W**  
*Quantitative Determination of Unbound Piperacillin and Imipenem in Biological Material from Critically Ill Using Thin-Film Microextraction-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*  
Molecules, 2022, vol. 27, nr 3, s.1-20; doi: 10.3390/molecules27030926  
**IF:** 4.6                      **MNiSW:** 140                      **cytowań:** 8

- [B-4]** Filipiak W, Beer R, Sponring A, Filipiak A, Ager C, Schiefecker A, Lanthaler S, Helbok R, Nagl M, Troppmair J, Amann A  
*Breath Analysis for In Vivo Detection of Pathogens Associated with Ventilator-Associated Pneumonia in Neurocritical Care Patients: A Prospective Pilot Study*  
Journal of Breath Research vol. 9 (2015) 016004; doi: 10.1088/1752-7155/9/1/016004  
IF: 4.177                      MNiSW: 40                      cytowań: 91

### *Wolatilom – prace przeglądowe*

Zbiór obejmuje prace przeglądowe i redakcyjne poświęcone biologicznym źródłom lotnych związków organicznych (LZO), ich znaczeniu diagnostycznemu oraz metodologicznym wyzwaniom w badaniach nad metabolizmem lotnym. Wspólnym celem tych publikacji było zintegrowanie wiedzy z rozproszonych dziedzin – mikrobiologii, onkologii, biochemii i chemii analitycznej – w celu stworzenia spójnych ram pojęciowych dla interpretacji wyników badań wolatilomicznych w medycynie.

Chronologicznie pierwsza z prac w tym zbiorze **[B-9]**, dostarczyła szczegółowego kompendium lotnych związków organicznych wykrytych we wszystkich badanych dotychczas próbkach biologicznych pochodzących z organizmu zdrowego człowieka (jako ogółu), zestawiając łączną ich ilość 1840 substancji chemicznych, z których 872 emitowanych było w oddechu, 532 ze skóry, 381 z fekalii, 359 ze śliny, 279 z moczu, 256 z mleka i 154 z krwi. Całościowo, praca ta dostarczyła pełnego fizjologicznego obrazu źródła LZO dla ludzkiego wolatilomu. Był to pierwszy w światowej literaturze tak szeroki przegląd lotnych metabolitów endogennych, stanowiący punkt odniesienia dla interpretacji zmian zachodzących w patologii. Publikacja ta przyczyniła się do opracowania pojęcia „wolatilomu fizjologicznego”, stanowiącego bazę porównawczą dla dalszych badań diagnostycznych.

Z kolei, w pracy opublikowanej w Current Medicinal Chemistry **[B-8]** dokonano kompleksowego przeglądu danych dotyczących LZO pochodzenia komórkowego w chorobach nowotworowych. Artykuł ten stanowił pierwsze syntetyczne opracowanie łączące dane z badań *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*, podkreślając różnice w profilach LZO pomiędzy zdrowymi i nowotworowymi tkankami ludzkimi. W publikacji tej omówiono biologiczne pochodzenie LZO, a szczególny nacisk położono na naznaczenie standaryzacji protokołów analitycznych, w tym pobierania próbek, identyfikacji analitów i rzetelności stosowanej metody analitycznej.

Praca ta położyła podwaliny pod moje późniejsze badania dotyczące metabolizmu LZO, wskazując na konieczność jednoznacznego i rzetelnego określania źródeł emisji LZO.

Opracowanie redakcyjne [B-7], otwierające specjalne wydanie czasopisma poświęcone komórkowemu pochodzeniu LZO, porządkowało wiedzę dotyczącą metabolizmu lotnych związków w układach biologicznych. Prace nadesłane na wezwanie sformułowane w tym opracowaniu podkreślały fundamentalne dla dyscypliny (wolatilomu ludzkiego) znaczenie badań *in vitro* dla interpretacji analiz oddechu w badaniach klinicznych. Opublikowana równocześnie w European Respiratory Journal [B-6] perspektywa przedstawiała dalsze strategie klinicznych zastosowań analizy LZO w diagnostyce respiratorowego zapalenia płuc. W pracy zwrócono uwagę na ograniczenia ówczesnych metod mikrobiologicznych oraz potencjał bezinwazyjnych technik analitycznych w szybkim wykrywaniu infekcji. Publikacja ta stanowiła kolejny ważny głos w dyskusji nad koniecznością walidacji biomarkerów LZO w badaniach translacyjnych, co uwzględnione zostało w moich projektach z badaniami klinicznymi w kolejnych latach.

Najbardziej aktualna w tym zbiorze praca [B-5], stanowi pierwsze całościowe podsumowanie dotychczasowych badań nad LZO w kontekście metabolizmu bakteryjnego. Oprócz sporządzonego przeze mnie omówienia technik analitycznych stosowanych w analizie bakteryjnych LZO, dodatkowo, razem z mgr Karoliną Żuchowską (której doktoratu jest promotorem pomocniczym) dokonaliśmy systematycznej analizy literatury i porównaliśmy profile wydzielania LZO między różnymi gatunkami bakterii, zestawiając dane uzyskane w warunkach *in vitro* z obserwacjami *ex vivo* i *in vivo*. W pracy wskazano najczęściej powtarzające się biomarkery infekcji oraz zwrócono uwagę na znaczenie interakcji międzygatunkowych, które modyfikują sygnaturę LZO w warunkach klinicznych. Publikacja ta, ugruntowała rolę LZO jako narzędzia diagnostycznego w mikrobiologii klinicznej, a jednocześnie wskazała najważniejsze kierunki dalszego rozwoju w tej dziedzinie.

Łącznie, prace tego zbioru stanowią podstawę teoretyczną całego cyklu badań habilitacyjnych, definiując pojęcia „komórkowego” i „mikrobiologicznego” wolatilomu oraz wskazując na potrzebę zintegrowania danych metabolomicznych z klinicznymi uzyskanymi standaryzowanymi i rzetelnymi metodami analitycznymi. Ich znaczenie polega na stworzeniu interdyscyplinarnego pomostu między biochemią, mikrobiologią a diagnostyką oddechową, a także na sformułowaniu metodologicznych standardów, które umożliwiły późniejsze wdrożenie analiz LZO w badaniach translacyjnych.

Lista publikacji:

**[B-5] Żuchowska K, Filipiak W**

*Modern approaches for detection of volatile organic compounds in metabolic studies focusing on pathogenic bacteria: Current state of the art*

Journal of Pharmaceutical Analysis 14 (2024) 100898; doi: 10.1016/j.jpha.2023.11.005

**IF:** 8.9

**MNiSW:** 140

**cytowań:** 24

**[B-6] Filipiak W, Ager C, Troppmair J**

*Predicting the future from the past: volatile markers for respiratory infections*

European Respiratory Journal 2017; 49: 1700264; doi: 10.1183/13993003.50264-2017

**IF:** 12.244

**MNiSW:** 45

**cytowań:** 7

**[B-7] Filipiak W, Hill J**

*Focus issue on the cellular origin of volatile metabolites*

Journal of Breath Research vol. 11 (2017): 010201; doi: 10.1088/1752-7163/aa6227

**Editorial**

**[B-8] Filipiak W, Mochalski P, Filipiak A, Ager C, Cumeras R, Davis C, Agapious A, Unterkofler K, Troppmair J**

*A Compendium of Volatile Organic Compounds (VOCs) Released by Human Cell Lines*

Current Medicinal Chemistry 2016, 23(20): 2112-2131;

doi: 10.2174/0929867323666160425113836

**IF:** 3.249

**MNiSW:** 35

**cytowań:** 104

**[B-9] de Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H, Flynn C, Filipiak W, Khalid T, Osborne D, Ratcliffe N**

*A review of the volatiles from the healthy human body*

Journal of Breath Research **8** (2014) 014001 (29pp); doi: 10.1088/1752-7155/8/1/014001

**IF:** 4.631

**MNiSW:** 35

**cytowań:** 903

### *Pozostałe publikacje naukowe*

Zbiór ten obejmuje różnorodnie tematycznie publikacje naukowe z zakresu chemii analitycznej, bioanalitik, chemii organicznej oraz nauk o żywności, stanowiące rezultat współpracy krajowej (Politechnika Gdańska i Instytut Sportu w Warszawie) a także międzynarodowej (Uniwersytet Komeńskiego w Bratysławie, Słowacja). Prace te nie są bezpośrednio powiązane z głównym cyklem habilitacyjnym, ale ilustrują szerokie spektrum zainteresowań badawczych oraz kompetencji autora w zakresie opracowywania i walidacji metod analitycznych stosowanych w złożonych matrycach biologicznych i środowiskowych. W szerszej perspektywie potwierdzają one zdolność autora do prowadzenia badań o charakterze interdyscyplinarnym, łączącym rozwój metod GC-MS z praktycznym zapotrzebowaniem w dziedzinie analitik farmaceutycznej i chemii żywności.

#### Lista publikacji:

**[B-10]** Waraksa E, Kowalski K, Kłodzinska E, Rola R, Ciekot J, **Filipiak W**, Bienkowski T, Namiesnik J

*A rapid and eco-friendly method for determination of the main components of gamma-oryzanol in equestrian dietary and nutritional supplements by liquid chromatography—Tandem mass spectrometry*

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2019, vol. 172, s. 339–348;

doi: 10.1016/j.jpba.2019.04.029

**IF:** 3.209

**MNiSW:** 100

**cytowań:** 11

**[B-11]** Kubinec R, Katora P, Ferenczy V, Blaško J, Podolec P, Hengerics Szabó A, Behúlová D, Bierhanzl V, Čabala R, Stuchlík S, **Filipiak W**, Tháňg NM

*Simultaneous analysis of carbohydrates, polyols and amines in urine samples using chemical ionization gas chromatography with tandem mass spectrometry*

Journal of Separation Science 2018 Jan; 41(2):449–458; doi: 10.1002/jssc.201700715

**IF:** 2.516

**MNiSW:** 30

**cytowań:** 12

**[B-12]** Gabrisova L, Galbava P, Szaboova Z, Juriga M, Macho O, Blasko J, Kubinec R, **Filipiak W**, Kubincova J, Peciar M

*HTGC–MS for determination of flavonol glycosides in nutritional supplement with extract from Vaccinium macrocarpon*

Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly 2018, vol. 149, nr 9, s.1623-1627;

doi: 10.1007/s00706-018-2235-6

**IF:** 1.501

**MNiSW:** 25

**cytowań:** 1

**[B-13]** Galbava P, Kubinec R, Szaboova Z, Blasko J, Gabrisova L, Macho O, Cabala R, Stuchlik S, **Filipiak W**, Thang NM

*GC–MS analysis of waxes in candle without chromatographic separations*

Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly 2018, vol. 149, nr 9, s.1543-1548;

doi: 10.1007/s00706-018-2222-y

**IF:** 1.501

**MNiSW:** 25

**cytowań:** 1

**[B-14]** Szaboova Z, Blasko J, Galbava P, Niznansky L, Gorova R, **Filipiak W**, Musil K, Cabala R, Gabrisova L, Peciar M, Kubinec R

*Analysis of triglycerides in butter, plant oils, and adulterated butter with LPGC-MS*

Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly 2018, vol. 149, nr 9, s. 1573-1578;

doi: 10.1007/s00706-018-2228-5

**IF:** 1.501

**MNiSW:** 25

**cytowań:** 4

**[B-15]** Waraksa E, **Filipiak W**, Klodzinska E, Ozimek M, Konop M, Namiesnika J

*Nonsteroidal anti-inflammatory drug metabolism studies in horses in view of doping control: analytical strategies and challenges*

Analytical Methods, 2019, vol. 11, s. 3767; doi: 10.1039/c9ay00692c

**IF:** 2.596

**MNiSW:** 70

**cytowań:** 0

#### 4.4.2. Realizacja grantów o zasięgu krajowym i międzynarodowym

Projekty, których byłem wnioskodawcą i kierownikiem (a także wykonawcą):

- NCN SONATA-13 – nr 2017/26/D/NZ6/00136 – (2018-2022) – *Analiza oddechu jako nowatorska metoda diagnozowania respiratorowego zapalenia płuc i monitorowania spersonalizowanej terapii*

- *Inkubator Innowacyjności UMK\_4.0* realizowanego w ramach programu MNiSW – nr MNISW/2020/331/DIR – (2021-2023) – *Zminiaturyzowane i zautomatyzowane urządzenie do pobierania próbek wydychanego powietrza o potencjalnym znaczeniu w diagnostyce medycznej*
- Österreichische Krebshilfe Tirol – projekt nr 14018 – (2014-2015) – “*Volatile Biomarkers of Lung Tumors – A Clinical Study*”

Projekty naukowe, w których uczestniczyłem jako **wykonawca**:

- NCBiR – POLTUR4/MicroIVIVE/5/2021 – (2021-2024) – “*Innovation in translational research: biocompatible microprobe devices for in vitro and in vivo cancer study*”. Kierownik projektu: Prof. dr hab. Barbara Bojko.
- NCN – HARMONIA – nr 2015/18/M/ST4/00059 – (2016-2020) – “*New analytical solutions in oncology: from basic research to rapid intraoperative diagnostics*”. Kierownik projektu: Prof. dr hab. Barbara Bojko.
- ONCOTYROL Center for Personalized Cancer Medicine GmbH (Oncotyrol Phase II, Area 1: Biomarker and Drug Target Identification, projekt nr 2.1.1. – (2012-2015) – “*Volatile compound signatures for lung cancer*”. Kierownik projektu: Prof. dr hab. Anton Amann.
- FFG (Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft mbH) – nr 818803 – (2008-2012) – “*OEPK: Ortung eingeschlossener Personen nach Katastrophen*”. Kierownik projektu: Prof. dr hab. Anton Amann.
- FFG & ROCHE – nr 822696 – (2009-2012) – “*Atemgasanalyse zur Detektion einer Ventilator-assoziierten Pneumoniae*”. Kierownik projektu: Prof. dr hab. Anton Amann.
- VII Program Ramowy Unii Europejskiej – nr 217967 (2008-2012) – “*SGL for USaR: Second Generation Locator for Urban Search and Rescue Operations*”. Kierownik projektu: Prof. Milt Statheropoulos.
- VI Program Ramowy Unii Europejskiej – nr LSHC-CT-2005-019031 (2006-2009) – “*BAMOD: Breath-gas analysis for molecular-oriented detection of minimal diseases*”. Kierownik projektu: Prof. dr hab. Anton Amann.

#### 4.4.3. Recenzje artykułów w czasopismach naukowych

- *Trends in Analytical Chemistry*
- *Scientific Reports*
- *Frontiers in Molecular Biosciences*
- *Frontiers in Pharmacology*
- *Analytica Chimica Acta*
- *Metabolites*
- *Pathogens*
- *Journal of Breath Research*
- *Rapid Communication in Mass Spectrometry*
- *BMC Pulmonary Medicine*
- *Intensive Care Medicine*
- *Oncotarget*
- *Molecules*
- *Journal of Separation Science*
- *AMB Express*
- *Biomedical Chromatography*
- *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*
- *Microchemical Journal*
- *International Journal of Analytical Chemistry*
- *Atmospheric Measurement Techniques*
- *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly*

#### 4.4.4. Wyróżnienia i nagrody

- Nagroda Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców – w 2020 roku (nr STYP/15/0378/E-337/2020)
- Nagroda za najlepszy poster podczas konferencji naukowej 11<sup>th</sup> IABR Summit 2016, Zurich, Szwajcaria, zorganizowana (i finansowana) przez czasopismo Journal of Breath Research
- Dissertations-Förderungspreise 2014 der Österreichischen Krebshilfe-Krebsgesellschaft Tirol – Nagroda Austriackiego Stowarzyszenia Przeciwdziałania

Nowotworom za najlepszą rozprawę doktorską w 2013r. bezpośrednio związaną z badaniami onkologicznymi

- Zespołowa Nagroda I Stopnia od Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2021 roku
- Zespołowa Nagroda II Stopnia od Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2019 roku
- Indywidualna Nagroda II stopnia od Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie organizacyjnej w 2018 roku - stworzenie Pracowni Spektrometrii Mas na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum UMK i wyposażenie jej w nowoczesny sprzęt analityczny z pozyskanych przeze mnie źródeł zewnętrznych (grant NCN nr 2017/26/D/NZ6/00136)
- Jednorazowe stypendia Rektora UMK za wysokopunktowane publikacje naukowe w roku 2018 i 2019

#### 4.4.5. Organizacja oraz udział w kursach i szkoleniach

##### **Organizacja:**

- 2021-10: Organizacja i prowadzenie międzynarodowego kursu pt. „*Annual Sample Prep Summer Course- Sample Preparation for MS Bioanalysis, Theory, Practice and Application*”, Bydgoszcz, Polska
- 2019-09: Organizacja i prowadzenie międzynarodowego kursu pt. „*Sample Preparation Course*”, Bydgoszcz, Polska

##### **Udział jako uczestnik:**

- 2023-09: Warsztaty „*Podstawy Hodowli Komórkowej*”, Zakład Inżynierii Tkankowej, Wydział Lekarski CM UMK, Bydgoszcz, Polska
- 2022-09: Kursy „*Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej*”, Zakład Medycyny Regeneracyjnej, Bank Komórek i Tkanek, Wytwórnia ATMP, Wydział Lekarski CM UMK, Bydgoszcz, Polska
- 2019-04: Warsztaty „*Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas we współczesnej chemii analitycznej*” prowadzone w ramach „Akademii Chemii Analitycznej” przez firmę „Shim-Pol” pod patronatem Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mass i Komitetu Chemii Analitycznej PAN, Jachranka, Polska

- 2013-02: Warsztaty „*PTR-MS – theory and practice*” prowadzone przez IONICON Analytik, Innsbruck, Austria
- 2005-10: Praktyki zawodowe jako nauczyciel chemii w szkole średniej, I Liceum Ogólnokształcące im. Mikołaja Kopernika, Toruń, Polska
- 2005-08: Kursy “*Chemometric Aspects of Environmental Analysis*”, Wydział Chemii Politechniki Gdańskiej, Polska
- 2005-07: Praktyki zawodowe w Pracowni Analityki Ogólnej, Biochemii i Hematologii Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Zespołonego Szpitala Uniwersyteckiego w Toruniu, Polska
- 2005-06: Studium podyplomowe “*Analytic in Environmental Protection*” z zakresu chromatografii i technik pokrewnych, metod przygotowania próbek, walidacji i modelowania komputerowego w analityce, przeprowadzone przez Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska
- 2004-07: Praktyki zawodowe w Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Toruniu, przeprowadzone przez “Toruńskie Wodociągi Sp. Z.o.o.”, Toruń, PL
- 2004-06: Międzynarodowy kurs „*The Baltic Sea Environment*” przy współpracy z Uppsala University (Szwecja), jeden semestr, przeprowadzony przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska
- 2003-09: Praktyki zawodowe jako nauczyciel chemii w Gimnazjum nr 15 im. Władysława Broniewskiego w Toruniu, Polska

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

### 5.1. Staże naukowe

**10. 2005 – 01. 2006.** Wydział Chemii Uniwersytetu w Ljublanie, Słowenia, wyjazd finansowany przez program Central European Exchange Programme for University Studies (CEEPUS).

**Zadania:** badanie właściwości sorpcyjnych sorbentów stałych stosowanych w analizach vVOC metodą TD-GC-MS.

**03. 2006 – 06. 2006.** Wydział Chemii Uniwersytetu w Porto, Portugalia, wyjazd finansowany przez program Unii Europejskiej w zakresie edukacji i szkoleń Socrates/Erasmus

**Zadania:** oznaczanie rakotwórczych LZO w dymie papierosowym metodą TD-GC-MS.

Wyniki uzyskane z moich doświadczeń wykonanych podczas obu poprzednich staży (Słowenia, Portugalia) użyte były zarówno do pracy magisterskiej, jak i publikacji naukowej: Buszewski, B., Ligor, T., **Filipiak, W.**, Vasconcelos, M. T., Pompe, M., & Veber, M. (2007). Study of sorptive properties of trap systems for selective enrichment of volatile organic compounds from tobacco smoke samples. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 90(1), 51–64. Doi: 10.1080/02772240701384418.

**01 - 12. 03. 2020.** Institut für Atemgasanalytik, Leopold Franzens Universität Innsbruck, Austria, wyjazd finansowany przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA).

**Zadania:** przeszkolenie badaczy z LFU zakresie eksperymentów *in vitro* z hodowlami bakterii (analiza lotnych metabolitów) oraz pobierania i analizy próbek oddechu pacjentów z VAP w ramach współpracy w kierowanym przeze mnie grantie NCN (konkurs SONATA-13).

Efektem niniejszego stażu (Innsbruck 2020) było skonsolidowanie współpracy w ramach koordynowanego przeze mnie projektu NCN (nr.: 2017/26/D/NZ6/00136) i zestawienie wyników do napisania wspólnie z partnerami austriackimi manuskryptu będącego częścią cyklu habilitacyjnego, tj.: **Filipiak W**, Wenzel M, Ager C, Mayhew C, Bogiel T, Włodarski R, Nagl M, *Molecular analysis of metabolites synthesized by Candida albicans and Staphylococcus aureus in in vitro cultures and bronchoalveolar lavage specimens reflecting single or duo-factor pneumonia*, *Biomolecules* **2024**, 14(7), 788; doi:10.3390/biom14070788

**25.01. – 08.02. 2025.** Institut für Atemgasanalytik, Leopold Franzens Universität Innsbruck, Austria, wyjazd finansowany przez program Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (IDUB).

**Zadania:** przeszkolenie badaczy z LFU w zakresie nowoczesnych technik mikroekstrakcyjnych (TFME) do badań metabolomicznych (*ex vivo*),

planowanie nowych kierunków badań i współpracy naukowych z nowymi partnerami do kolejnych wniosków grantowych.

**17.02. – 02.03. 2025.** Wydział Chemii, Middle East Technical University, Ankara, Turcja, wyjazd finansowany przez program Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (IDUB).

**Zadania:** charakterystyka nowatorskich włókien SPME z pokryciem HLB w Teflonie – optymalizacja i walidacja urządzeń oraz jego zastosowanie w eksperymentach *in vitro* z liniami komórek nowotworowych.

Niniejszy staż (Ankara 2025) był częścią realizacji bilateralnego projektu NCBiR z tureckim TUBITAK (nr. POLTUR4/MicroIVIVE/5/2021), a jego efektem była praca będąca częścią cyklu habilitacyjnego, tj.:

**Filipiak W**, Çakmakçı M, Sevgen S, Szeliska P, Jaroch K, Kara A, Kahremanoğlu K, Bojko B, Boyaci E; *Assessment of thermal and solvent stable SPME fibers for volatilome investigation through in vitro experiments with cancer cell lines*, *Analytica Chimica Acta* 1378 (2025) 344708, doi: 10.1016/j.aca.2025.344708

## **5.2. Projekty naukowe – jako wnioskodawca i kierownik**

- NCN SONATA-13 – nr 2017/26/D/NZ6/00136 – (2018-2022) – *Analiza oddechu jako nowatorska metoda diagnozowania respiratorowego zapalenia płuc i monitorowania spersonalizowanej terapii*

Byłem pomysłodawcą, aplikantem i koordynatorem całego projektu. Projekt został wykonany i rozliczony pozytywnie, uzyskując uznanie recenzentów wyrażone m.in. wystawionymi przez nich wysokimi punktacjami w końcowej ocenie merytorycznej (14/15 i 12/15). Projekt ten definiuje znaczną część niniejszego cyklu habilitacyjnego określając cele badawcze, planowanie doświadczeń, użytą metodologię oraz dostarczając środków finansowych na realizację badań (zakup aparatury TD-GC-MS i innych środków trwałych oraz zużywalnych niezbędnych do realizacji wszystkich eksperymentów). Efekty grantu to między innymi 6 spośród 9 publikacji stanowiących cykl habilitacyjny: [A-3], [A-4], [A-6], [A-7], [A-8], [A-9] oraz publikacje spoza cyklu: [B-2], [B-3], [B-5], ale przede wszystkim to zdobyta wiedza i umiejętności planowania, zarządzania i koordynowania wielozespołowymi i interdyscyplinarnymi badaniami o szerokim zakresie.

- *Inkubator Innowacyjności UMK\_4.0* realizowanego w ramach programu MNiSW – nr MNISW/2020/331/DIR – (2021-2023) – *Zminiaturyzowane i zautomatyzowane urządzenie do pobierania próbek wydychanego powietrza o potencjalnym znaczeniu w diagnostyce medycznej*

Projekt ten bazował na wcześniejszych doświadczeniach z mojej pracy w Innsbrucku (Austria) i został przeprowadzony w ścisłej współpracy z niemiecką firmą PAS Technology Deutschland, w ramach której powstało prototypowe przenośne urządzenie do zautomatyzowanego pobierania oddechu. Urządzenie rozszerzało znane możliwości kontroli kapnografem o dodatkowe funkcje, takie jak redukcja sorpcji wody przez podgrzewanie podczas ekstrakcji w czasie rzeczywistym dwóch rurek sorpcyjnych, regulowanie żądanej prędkości przepływu gazu czy objętości zaadsorbowanej próbki oddechu, po osiągnięciu której zastępuje automatyczne zakończenie samplingu.

- Österreichische Krebshilfe Tirol – projekt nr 14018 – (2014-2015) – *“Volatile Biomarkers of Lung Tumors – A Clinical Study”*

Projekt ten, sfinansowany przez Austriackie Stowarzyszenie Przeciwdziałania Nowotworom, umożliwił zakończenie etapu badań nad biomarkerami nowotworu płuc, rozpoczętymi kilka lat wcześniej podczas 6-go Programu Ramowego Unii Europejskiej BAMOD, a jednocześnie dostosowanie infrastruktury analitycznej do użytku w kolejnych badaniach klinicznych.

### 5.3. Projekty naukowe – jako wykonawca

- NCBiR – POLTUR4/MicroIVIVE/5/2021 – (2021-2024) – *“Innovation in translational research: biocompatible microprobe devices for in vitro and in vivo cancer study”*.  
Kierownik projektu: Prof. dr hab. Barbara Bojko.

Projekt realizowany we współpracy z Middle East Technical University (METU, Ankara, Turcja), mający na celu opracowanie nowoczesnych technik mikroekstrakcyjnych, uniwersalnych dla analiz LC/GC-MS. W ramach realizacji tego projektu opiekowałem się studentami programu Erasmus Panem Enes Çetin oraz Panią Kübra Kahremanoğlu, którzy byli studentami w ośrodku partnera zagranicznego (METU, Ankara, Turcja). Podczas ich pobytu w naszej jednostce naukowej uczyłem ich podstaw pracy z chromatografią gazową sprzężoną ze

spektrometrią mas oraz optymalizowaniem protokołów dla technik ekstrakcyjnych, zwłaszcza SPME. W ramach tego samego projektu odbyłem staż w ośrodku partnera w Ankarze, gdzie przeprowadziłem pełną optymalizację oraz walidację protokołu analitycznego SPME. Techniki te zostały z powodzeniem zastosowane w eksperymentach *in vitro* skupionych na oznaczaniu lotnych metabolitów komórek nowotworowych. W wyniku realizacji tego projektu powstały dwie publikacje naukowe z moim współautorstwem [A-5], [B-1], a jedna z nich włączona jest w niniejszy cykl habilitacyjny [A-5].

- NCN – HARMONIA – nr 2015/18/M/ST4/00059 – (2016-2020) – *“Nowe rozwiązania analityczne w onkologii: od badań podstawowych do szybkiej diagnostyki śródoperacyjnej”*. Kierownik projektu: Prof. Dr hab. Barbara Bojko.

Projekt miał na celu opracowanie platformy analitycznej do niskoinwazyjnych badań *in situ* w zakresie oznaczania metabolitów tkanki nowotworu mózgu, glejaków i oponiaków, na potrzeby badań podstawowych oraz neurochirurgii onkologicznej. Oryginalność projektu polegała na wprowadzeniu włókien SPME bezpośrednio do guza mózgu zarówno *in vivo* (podczas operacji), jak i *ex vivo* (do tkanki chirurgicznie wyciętej). Moją funkcją była pomoc w analizach metabolomu.

- ONCOTYROL Center for Personalized Cancer Medicine GmbH (Oncotyrol Phase II, Area 1: Biomarker and Drug Target Identification, projekt nr 2.1.1. – (2012-2015) – *“Volatile compound signatures for lung cancer”*. Kierownik projektu: Prof. Dr hab. Anton Amann.

Projekt ten naceLOWany był na identyfikację biomarkerów oraz celi terapeutycznych w terapii przeciwnowotworowej raka płuc, co stanowiło kontynuację badań rozpoczętych podczas programu ramowego BAMOD. W tym projekcie byłem odpowiedzialny za pobieranie tkanek płuc (nowotworowych oraz zdrowych) wyciętych chirurgicznie podczas lobektomii, profilowanie ich lotnych metabolitów (sampling LZO i ich analiza GC-MS) oraz porównanie uzyskanych wyników do analiz oddechów pacjentów (chorych na raka płuc oraz zdrowych). Osiągnięte rezultaty wykorzystałem do napisania publikacji naukowej wchodzącej w skład niniejszego cyklu habilitacyjnego [A-1]. Projekt ten sfinansował również modyfikację metodologii pobierania próbek oddechu wykorzystanej w moich kolejnych badaniach skupionych na zróżnicowaniu pacjentów z zaostrzeniem od regularnego stanu POChP, co

stanowiło przedmiot kolejnej publikacji w cyklu habilitacyjnym, mianowicie [A-2]. W trakcie realizacji tego projektu powstała również kolejna praca z moim współautorstwem: zestawienie wolatilomu ludzkiego w różnych próbkach biologicznych [B-9], która wywarła znamieny wpływ na międzynarodowe środowisko naukowe osiągając ponad 800 cytowań.

- FFG & ROCHE – nr 822696 – (2009-2012) – "*Atemgasanalyse zur Detektion einer Ventilator-assoziierten Pneumoniae*". Kierownik projektu: Prof. Dr hab. Anton Amann. Projekt ten skupiony był na scharakteryzowaniu bakteryjnych lotnych związków organicznych i zawierał zarówno rozwój metodologii analitycznej, podstawowe eksperymenty *in vitro*, jak i badania kliniczne. Podczas realizacji tego projektu pełniłem aktywną rolę w strategicznym planowaniu badań, projektowaniu urządzeń do ekstrakcji próbek oraz opracowaniu eksperymentów i ich przeprowadzaniu. Optymalizację techniki do ekstrakcyjnego zatężania LZO z ludzkiego oddechu, wykorzystującą mikroekstrakcję w igłach (NTME, Needle Trap Microextraction) opublikowałem jako pracę [C-4] i użyłem jako bazy do dalszej optymalizacji samplingu w badaniach zaprezentowanych w niniejszej habilitacji [A-2]. Dalsze badania z hodowlami bakterii, opublikowane jako [C-1] i [C-3] oraz pilotażowymi badaniami klinicznymi [B-4] ukształtowały moje zainteresowania naukowe, które realizowałem przez kolejne lata, m.in. poprzez pozyskanie własnego grantu NCN w roku 2018 (omówione powyżej).

- FFG (Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft mbH) – nr 818803 – (2008-2012) – "*OEPK: Ortung eingeschlossener Personen nach Katastrophen*". Kierownik projektu: Prof. Dr hab. Anton Amann.
- VII Program Ramowy Unii Europejskiej – nr 217967 (2008-2012) – "*SGL for USaR: Second Generation Locator for Urban Search and Rescue Operations*". Kierownik projektu: Prof. Milt Statheropoulos.

Oba projekty nakierowane były na bardzo zbliżone cele badawcze, tj. opracowanie technologii czujników do ratowania ofiar uwieczonych w zawalonych budynkach. Moim zadaniem było scharakteryzowanie ludzkich sygnatur chemicznych, które mogłyby być wykrywane i identyfikowane przez zintegrowany system czujników. W tym celu używałem PTR-MS (Proton Transfer Reaction - Mass Spectrometry) umożliwiającego analizę jakościową i ilościową – w czasie rzeczywistym – LZO emitowanych przez ciało ludzkie. Projekt ten rozszerzał zebrane

dotychczas doświadczenie o profilowanie dynamicznych zmian emisji LZO pod wpływem wysiłku fizycznego, co przedyskutowano w pracy naukowej [C-7].

- VI Program Ramowy Unii Europejskiej – nr LSHC-CT-2005-019031 (2006-2009) – *"BAMOD: Breath-gas analysis for molecular-oriented detection of minimal diseases"*.  
Kierownik projektu: Prof. Dr hab. Anton Amann.

Był to pierwszy projekt, w którym uczestniczyłem, rozpoczynający mój 11-letni okres pracy naukowej w Austrii. Do moich licznych obowiązków należało zoptymalizowanie warunków analitycznych, w tym określenia wzorów fragmentacji zjonizowanych analitów, dla analiz on-line oraz off-line z użyciem spektrometrii mas (opublikowane jako [C-11]), planowanie i przeprowadzanie eksperymentów *in vitro* z liniami komórek nowotworowych z identyfikacją metabolitów i ich analizą ilościową za pomocą GC-MS (opublikowane jako [C-6], [C-8], [C-13], [C-14]), określenie analitów egzogennych w oddechu osób zdrowych (opublikowane jako [C-2] na podstawie doświadczenia zebranego w [C-16]), kończąc na analizie oddechu w badaniach klinicznych z pacjentami z nowotworem płuc ([C-9], [C-10], [C-15]).

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

### **6.1. Prowadzenie zajęć dydaktycznych**

W ramach pracy naukowo-dydaktycznej od 2017 roku prowadziłem ćwiczenia, seminaria oraz wykłady, byłem zaangażowany w tworzenie sylabusów, tworzenie prezentacji oraz przygotowywanie ćwiczeń praktycznych dla następujących przedmiotów i kierunków:

- a) Farmakologia i Farmakodynamika I na kierunku Farmacja
- b) Farmakologia i Farmakodynamika II na kierunku Farmacja
- c) Biotechnologia Farmaceutyczna na kierunku Farmacja
- d) Farmakologia z Toksykologią na kierunku Kosmetologia
- e) Pharmacology with Pharmacodynamics I w ramach programu Erasmus

Moja praca dydaktyczna w ostatnim 5-leciu utrzymywała się na stałym, wysoko ocenianym poziomie (wg Uniwersyteckiego Systemu Obsługi Studiów):

| Rok akademicki | Ilość ankiet | Średnia ocena z ankiet studenckich |
|----------------|--------------|------------------------------------|
| 2021/22        | 342          | <b>4.71</b>                        |
| 2022/23        | 214          | <b>4.81</b>                        |
| 2023/24        | 614          | <b>4.73</b>                        |
| 2024/25        | 136          | <b>4.87</b>                        |

## 6.2. Opieka na stażystami

Kübra Kahremanoglu oraz Enes Çetin – studenci wizytujący w ramach współpracy w projekcie bilateralnym POLTUR4/MicroIVIVE/5/2021

## 6.3. Opiekun naukowy i promotor prac magisterskich

2019 – Magdalena Winiarek (nr albumu: 277209), Karolina Żuchowska (nr albumu: 277216), Monika Puszko (nr albumu: 277184)

2020 – Marta Marszałek (nr albumu: 283637)

2021 – Alicja Tracewska (nr albumu: 289870), Rafał Juszczyk (nr albumu: 282222)

2022 – Dawid Daszkiewicz (nr albumu: 294245), Wojciech Bobrowski (nr albumu: 282215)

2025 – Weronika Poznańska (nr albumu: 310591)

## 6.4. Opiekun naukowy i współpromotor prac magisterskich studentów zagranicznych

**2024/2025 – Eva Polutnik (nr albumu: 31180105 – Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Slovenia).** Tytuł pracy magisterskiej: *“Application of gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of exhaled breath from mechanically ventilated patients hospitalised at the Intensive Care Unit”*

## 6.5. Promotor pomocniczy prac doktorskich

**2026 – Karolina Żuchowska – nr albumu 503216 – Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.**

Pani Karolina Żuchowska najpierw była moją magistrantką (nr albumu: 277216), a jednocześnie stypendystką koordynowanego przeze mnie projektu NCN (Sonata-13). Wyniki jej pracy magisterskiej, zatytułowanej *„Opracowanie metody oznaczania stopnia wiązania wybranych antybiotyków w materiale biologicznym”* zostały opublikowane w czasopiśmie

naukowym *Molecules* (IF=4.6, MNiSW=140) jako [B-3], co świadczy o bardzo wysokiej jakości jej pracy laboratoryjnej, a jednocześnie wpisuje się idealnie w kierunek rozwoju technik mikroekstrakcyjnych stosowanych a terapii spersonalizowanej. Nasza współpraca naukowa jest nadal kontynuowana, gdyż po zakończeniu studiów magisterskich Pani Karolina Żuchowska w dniu 01.10.2010. pomyślnie przeszła rekrutację do Szkoły Doktorskiej na Wydziale Farmaceutycznym CM UMK, a ja pełnię rolę jej promotora pomocniczego. Pod moim nadzorem, Pani Karolina Żuchowska realizuje Projekt Doktorski pt.: „*Metabolomiczna ocena fenotypu mikroorganizmów chorobotwórczych o potencjalnym znaczeniu dla bezinwazyjnej metody diagnostyki zapalenia płuc*”, będący kontynuacją badań rozpoczętych przeze mnie w roku 2018. Starając się odpowiednio ukierunkować rozwój naukowy p. Karoliny Żuchowskiej, w celu realizacji jej doktoratu powstały nasze kolejne wspólne prace w wysoko punktowanych czasopismach naukowych, których jestem autorem korespondencyjnym, m.in. wyczerpująca praca przeglądowa na temat lotnych metabolitów bakteryjnych w *Journal of Pharmaceutical Analysis* (IF=8.9, MNiSW=140 jako [B-5]) czy dokładny protokół analityczny dla mikroekstrakcji cienkowarstwowej z próbek biologicznych w *Green Analytical Chemistry* (IF=6.2 praca [B-2]). Dodatkowo, szkoląc Panią Karolinę Żuchowską jako młodą kadrę naukową naszego Uniwersytetu, staram się przekazywać jej nie tylko jak najwięcej wiedzy naukowej, doświadczenia laboratoryjnego, lecz również uczyć ją umiejętności planowania i projektowania samodzielnych badań naukowych, czego zwieńczeniem było uzyskanie przez p. Karolinę Żuchowską w roku 2022 projektu NCN z konkursu Preludium 21, zatytułowanego: „*Zastosowanie nowoczesnych technik mikroekstrakcyjnych (NTME, TFME) w profilowaniu metabolomu drobnoustrojów chorobotwórczych*” (nr projektu: 2022/45/N/ST4/01948).

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

- Od 01.10. 2024r. jestem członkiem **Senatu UMK** oraz **Rady Collegium Medicum**
- Od 2020r. jestem członkiem **Uniwersyteckiego Centrum Doskonałości „W Kierunku Medycyny Spersonalizowanej”** w grupie badawczej: *Interdisciplinary Innovation in Personalized Medicine Team (IPM Team)*.

  
.....  
(podpis wnioskodawcy)