Doktorant: Karol Jaroch

studia doktoranckie z zakresu nauk farmaceutycznych

Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej

Promotor: dr hab. n. farm. Barbara Bojko

Tytuł rozprawy doktorskiej: Badania cytotoksyczności i metabolizmu kombretastatyny A4 oraz analizy metabolomiczne linii komórkowych z wykorzystaniem nowatorskich metod mikroekstrakcyjnych

Streszczenie pracy

W trakcie badań nowych kandydatów na leki istotną rolę odgrywają badania przedkliniczne, do których zalicza się między innymi badania *in vitro* z wykorzystaniem modeli komórkowych oraz badań metabolizmu. Wyniki tych badań służą do oszacowania odpowiedzi pacjentów na potencjalny lek i są kluczowym etapem limitującym wejście substancji do badań z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych oraz kolejno badań klinicznych.

Nadal trwają poszukiwania nowoczesnych metod analitycznych umożliwiających uzyskanie dogłębnych informacji, w przeciwieństwie do standardowych badań cytotoksycznych, dotyczących zmian biochemicznych komórek po indukcji nowymi kandydatami na leki. Równocześnie, opracowywanie nowych technik ekstrakcyjnych, które pozwalają uniknąć interferencji ze strony składników próbki biologicznej przy wykorzystaniu do spektrometrów mas, są wydajnym i nowoczesnym rozwiązaniem dla analiz nowych leków.

W prezentowanym badaniu zastosowano mikroekstrakcję do fazy stałej (ang. Solid Phase Microextraction, SPME) w połączeniu ze spektrometrią mas o wysokiej rozdzielczości w celu analizy zmian metabolomicznych hodowli komórkowych pod wpływem działania leku, oraz przebiegu reakcji metabolizmu tego leku z wykorzystaniem enzymów mikrosomalnych.

Do oceny wpływu kombretastatyny A4 (CA4) na nowotworową linię komórkową niedrobnokomórkowego raka płuc za pomocą metabolomiki niecelowanej wykorzystano SPME w postaci mikrowłókien. Generowanie szlaków metabolizmu CA4 prowadzono wielokierunkowo: obliczeń *in silico*, reakcji elektrochemicznych oraz szczurzych mikrosomów wątrobowych analizowanych metodą precypitacji białek (PP) i SPME.

Analiza głównych składowych wykazała różnicę między komórkami eksponowanymi i nieeksponowanymi na CA4. Wykorzystanie SPME umożliwiło analizę hodowli komórkowych bezpośrednio z płytek wielokołowych, gdzie objętość materiału jest wysoce ograniczona. Najważniejsze zmiany metabolomiczne dotyczyły poziomów aminokwasów, kwasów o niskiej masie cząsteczkowej oraz amidów będących zarówno związkami wewnątrzkomórkowymi jak i składnikami medium hodowlanego. Głównymi ścieżkami metabolizmu CA4 są odpowiednio O-demetylacja i aromatyczna hydroksylacja. Nie stwierdzono, pod względem zidentyfikowanych metabolitów, różnic pomiędzy analizą PP i SPME w, ale bardziej wydajne oczyszczanie próbki i możliwość oceny zmian w czasie za pomocą SPME sprawia, że technologia ta jest wysoce zalecana do kolejnych analiz metabolizmu.

Ze względu na brak fizycznego poboru próbki oraz ekstrakcję nieprowadzącą do zużycia matrycy SPME jest odpowiednim narzędziem do badań *in vitro* próbek o ograniczonej ilości. Dzięki temu, po przeprowadzeniu żądanej ilości pomiarów z użyciem SPME możliwe jest zastosowanie tradycyjnych metod badania linii komórkowych tj. barwienia. Możliwość wytwarzania sond SPME o różnej długości pokrycia fazą ekstrakcyjną umożliwia elastyczność aplikacji. Specyfika SPME pozwalająca na przeprowadzanie badań *in vivo* na zwierzętach i ludziach, w połączeniu z przeprowadzonymi testami *in vitro* daje mocne przesłanki w kierunku wykorzystania opisywanej technologii jako obiecującego narzędzia w badaniach ekstrapolacji *in vitro-in vivo*.