

**dr n. farm. Jan Matysiak**

**AUTOREFERAT**



Omówienie cyklu publikacji pt.

**Zastosowanie strategii analityczno-bioinformatyczno-klinicznej  
w analizie jadu pszczelego jako złożonej matrycy pochodzenia naturalnego.  
Proteomiczno-metabolomiczne badania odpowiedzi  
organizmu ludzkiego na użądlenie.**

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

**Wydział Farmaceutyczny**

**POZNAŃ 2016**

## Spis treści

1. Dane osobowe .....	4
1.1. Imię i nazwisko .....	4
1.2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe .....	4
1.3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	4
2. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego .....	5
3. Osiągnięcia naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego wynikające z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.).....	6
3.1. Spis publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe .....	6
3.2. Wprowadzenie dotyczące tematyki badawczej oraz zwięzłe omówienie wyników zamieszczonych w publikacjach dotyczących osiągnięcia naukowego .....	8
3.3. Zastosowanie metod rozdzielczych wspartych analizą chemometryczną w badaniach jadu pszczelego .....	10
3.3.1. Charakterystyka jadu pszczelego z wykorzystaniem wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej HPCE i metod chemometrycznych .....	10
3.3.2. Oznaczanie aktywności hialuronidazy w próbkach biologicznych z użyciem wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej HPCE .....	12
3.4. Zastosowanie technik łączonych opartych o spektrometrię mas w proteomicznych badaniach jadu pszczelego .....	15
3.4.1. Charakterystyka jadu pszczelego z wykorzystaniem metod spektrometrii mas z jonizacją MALDI i ESI .....	15
3.4.2. Badania jadu pszczelego oparte na technice shotgun z wykorzystaniem różnych strategii wzbogacania próbek .....	17
3.4.3. Proteomiczna charakterystyka jadu pszczelego w oparciu o łączone techniki LC-MALDI-TOF/TOF MS i LC-ESI-QTOF MS .....	20
3.5. Zastosowanie strategii analityczno-bioinformatyczno-klinicznej w badaniach odpowiedzi organizmu na jad pszczeli na poziomie proteomicznym i metabolomicznym .....	22
3.5.1. Badania wpływu jadu pszczelego na aktywność CYP1A2 w warunkach <i>in vitro</i> ....	22
3.5.2. Badania wpływu użądlenia przez pszczołę miodną ( <i>Apis mellifera</i> ) na profil wolnych aminokwasów w surowicy ludzkiej .....	24
3.5.3. Badania wpływu użądlenia przez pszczołę miodną ( <i>Apis mellifera</i> ) na profil peptydomiczny w surowicy ludzkiej .....	26
3.6. Podsumowanie .....	28
Piśmiennictwo .....	29

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....	37
4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora .....	37
4.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora (niezwiązana z habilitacją) .....	38
4.3. Udział w projektach naukowych .....	39
4.4. Odbyte staże i szkolenia .....	40
5. Działalność dydaktyczna.....	40
6. Nagrody i wyróżnienia.....	41
7. Recenzje prac naukowych.....	41
8. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego.....	41

## **1. Dane osobowe**

### **1.1. Imię i nazwisko**

Jan Matysiak

### **1.2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe**

2006 – dyplom magistra farmacji uzyskany na podstawie pracy pt. „Spektroskopowe i chromatograficzne badania składu jadu pszczoły miodnej (*Apis mellifera L.*) w zależności od warunków atmosferycznych. Wskazania do standaryzacji preparatu”, promotor: prof. dr hab. Zenon J. Kokot, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Praca została wyróżniona w XLI Konkursie Prac Magisterskich Wydziału Farmaceutycznego AMiKM w Poznaniu. Studia ukończone z wyróżnieniem, medal Rektora Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za zasługi w rozwój studenckiego ruchu naukowego, aktywną pracę społeczną i organizacyjną oraz bardzo dobre wyniki w nauce, wyróżnienie Zarządu Studenckiego Towarzystwa Naukowego.

Maj 2010 – stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych, specjalność naukowa bioanaliza na podstawie rozprawy pt. „Bioanalityczne badania jadu pszczelego”, promotor: prof. dr hab. Zenon J. Kokot, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Rozprawa doktorska została wyróżniona na wnioski złożone przez recenzentów pracy.

### **1.3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

Październik 2006 – wrzesień 2010 – asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Październik 2010 – nadal – adiunkt w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

## 2. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego

Prace oryginalne:

- łącznie – 19 publikacji, w tym 17 z listy filadelfijskiej
- po uzyskaniu stopnia naukowego doktora – 14, w tym 12 z listy filadelfijskiej

Prace pogładowe

- łącznie – 5
- po uzyskaniu stopnia naukowego doktora – 4

Sumaryczny IF wszystkich prac: 40,514

Suma punktów MNiSW: 539

**Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego: 20,268**

**(2,5335 na jedną pracę)**

**Suma punktów MNiSW prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego: 235**

**(29,375 na jedną pracę)**

Sumaryczny IF prac przed uzyskaniem stopnia doktora: 4,421 (1,474 na jedną pracę)

Suma punktów MNiSW prac przed uzyskaniem stopnia doktora: 89 (14,833 na jedną pracę)

Sumaryczny IF prac po uzyskaniu stopnia doktora: 36,093 (2,578 na jedną pracę)

Suma punktów MNiSW prac po uzyskaniu stopnia doktora: 450 (25 na jedną pracę)

Całkowita liczba cytowań (wg bazy ISI Web of Science): 64 (19.01.2016)

Całkowita liczba cytowań z wyłączeniem autocytowań (wg bazy ISI Web of Science): 51 (19.01.2016)

Indeks Hirscha (wg ISI Web of Science): 5 (19.01.2016)

Całkowita liczba cytowań (wg bazy Scopus): 66 (19.01.2016)

Całkowita liczba cytowań z wyłączeniem autocytowań (wg bazy Scopus): 47 (19.01.2016)

Indeks Hirscha (wg bazy Scopus): 5 (19.01.2016)

**3. Osiągnięcia naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego wynikające z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

Tematem wiodącym prezentowanego osiągnięcia naukowego było: „**Zastosowanie strategii analityczno-bioinformatyczno-klinicznej w analizie jadu pszczelego jako złożonej matrycy pochodzenia naturalnego. Proteomiczno-metabolomiczne badania odpowiedzi organizmu ludzkiego na użądlenie**”. Przedstawiony do oceny w postępowaniu habilitacyjnym jest monotematyczny cykl publikacji składający się z 8 prac naukowych opublikowanych w latach 2011-2016, o łącznym wskaźniku Impact Factor równym 20,268 i wartości punktacji MNiSW równej 235.

**3.1.Spis publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe**

A1.**J. Matysiak**, C. E. H. Schmelzer, R. H. H. Neubert, Z. J. Kokot.

Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry.

J. Pharm. Biomed. Anal. 2011, 54(2): 273-278

IF = 2,967

MNiSW = 30

A2.Z. J. Kokot, **J. Matysiak**, B. Urbaniak, P. Dereziński.

New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product.

Anal. Bioanal. Chem. 2011, 399: 2487–2494

IF = 3,778

MNiSW = 35

A3.**J. Matysiak**, P. Dereziński, B. Urbaniak, A. Klupczyńska, A. Zalewska, Z. J. Kokot.

A new method for determination of hyaluronidase activity in biological samples using capillary zone electrophoresis.

Biomed. Chrom. 2013, 27: 1070-1078.

IF = 1,662

MNiSW = 20

A4.**J. Matysiak**, P. Dereziński, A. Klupczyńska, J. Matysiak, E. Kaczmarek, Z. J. Kokot

Effects of a honeybee sting on the serum free amino acid profile in humans. PLoS

ONE 2014, 9(7): e103533. doi:10.1371/journal.pone.0103533

IF = 3,234

MNiSW = 40

- A5. **J. Matysiak**, J. Hajduk, Ł. Pietrzak, C. Schmelzer, Z. J. Kokot. Shotgun proteome analysis of honeybee venom using targeted enrichment strategies. *Toxicon* 2014, 90: 255–264.  
IF = 2,492  
MNiSW = 30
- A6. **J. Matysiak**, P. Dereziński, A. Klupczyńska, M. Cichocki, Z. J. Kokot. Wpływ jadu pszczelego na aktywność CYP1A2. *Med. Wet.* 2014, 70, 12: 781-785  
IF = 0,218  
MNiSW = 15
- A7. **J. Matysiak**, A. Światły, J. Hajduk, J. Matysiak, Z. J. Kokot. Influence of honeybee sting on peptidome profile in human serum. *Toxins* 2015, 7, 5: 1808-1820  
IF = 2,938  
MNiSW = 30
- A8. **J. Matysiak**, J. Hajduk, F. Mayer, R. Hebel, Z. J. Kokot. Hyphenated LC-MALDI-TOF/TOF and LC-ESI-QTOF approach in proteomic characterization of honeybee venom. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 121: 69-76  
IF = 2,979  
MNiSW = 35

### **3.2. Wprowadzenie dotyczące tematyki badawczej oraz zwięzłe omówienie wyników zamieszczonych w publikacjach dotyczących osiągnięcia naukowego**

W 2001 roku w wyniku realizacji Projektu Poznania Ludzkiego Genomu (ang. Human Genome Project) opublikowano wstępny opis genomu człowieka. Był to początek genomiki jako nowej dziedziny naukowej, która zajmuje się badaniem całych genomów w przeciwieństwie do genetyki molekularnej badającej do tej pory tylko pojedyncze geny [1]. Wydawało się, że naukowcy są już o krok od pełnego poznania mechanizmów funkcjonowania ludzkiego organizmu [2, 3]. Przypuszczano, że dalsze badania doprowadzą do szybkiego wprowadzenia innowacyjnych testów diagnostycznych a także terapii genowej, co miało potencjalnie doprowadzić do eradykacji wielu chorób takich jak: nowotwory oraz choroby przewlekłe (choroby układu sercowo-naczyniowego, choroby układu nerwowego, choroby metaboliczne). Rozszyfrowanie kodu genetycznego człowieka nie wyjaśnia jednak wszystkich aspektów łączących przebieg procesu chorobowego z ekspresją genu i wynikającą z tego zmianą fenotypu. Dlatego obecnie można zaobserwować gwałtowny rozwój interdyscyplinarnej systemiki stanowiącej połączenie takich dziedzin nauki jak: genomika, transkryptomika, proteomika, metabolomika i innych [4]. Pod pojęciem „omiki” należy rozumieć wszystkie dziedziny nauki mające na celu pełne i holistyczne zrozumienie procesów zachodzących w organizmach żywych.

Dotychczas nie udało się jeszcze określić kompletnego proteomu dla żadnego z organizmów żywych. Jest to spowodowane tym, iż proteom jest strukturą wysoce dynamiczną i niejednorodną, zmieniającą się w czasie w zależności od środowiska (temperatury, czynników stresowych, diety) oraz fazy cyklu komórkowego. Poznanie białek i peptydów ulegających ekspresji w danym narządzie, tkance czy komórce nie jest wystarczające w charakterystyce proteomu. Określenie zmian, jakim podlegają białka pod wpływem bodźców zewnętrznych (o podłożu fizjologicznym jak i patologicznym), może stanowić ważny element w wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów procesów wewnątrzkomórkowych leżących u podstaw patomechanizmów wielu chorób [5]. Istotą jest określenie różnic pomiędzy profilami białkowymi chorych i zdrowych ludzi, które mogą być przyczyną lub skutkiem rozwoju procesu chorobowego. Kolejną dziedziną postgenomowej ery badań bioanalitycznych jest metabolomika, która zajmuje się pełną analizą zarówno jakościową jak i ilościową wielu złożonych katabolicznych i anabolicznych cykli biochemicznych zachodzących w żywych organizmach [6]. Metabolomika określa profile biochemiczne oraz ich funkcje w całym organizmie poprzez analizę płynów ustrojowych lub poszczególnych organów.

Do opisywania i lepszego zrozumienia proteomiczno-metabolomicznych zależności służą chemometria oraz bioinformatyka. [7]. W badaniach naukowych, a zwłaszcza tych prowadzonych z wykorzystaniem technik spektrometrii mas, uzyskuje się bowiem ogrom danych, których analiza jest możliwa jedynie przy użyciu specjalistycznego oprogramowania dedykowanego do chemometrii. Dzięki temu możliwe jest między innymi pozyskanie informacji o potencjalnej wartości diagnostycznej czy kompleksowe odzwierciedlenie aktualnego stanu fizjologicznego organizmu i odróżnienie go od stanu patologicznego. Ponadto obliczeniowe techniki komputerowe umożliwiają połączenie informacji dotyczących genomu, ekspresji białek i zmian metabolicznych z danymi klinicznymi. To stwarza potencjał ukierunkowania nowoczesnej medycyny na indywidualnego pacjenta.



Obecnie laboratoria badawcze na całym świecie poszukują innowacyjnych leków pochodzenia naturalnego łączących w sobie skuteczność oraz bezpieczeństwo stosowania [8]. Produkty naturalne stanowią nieograniczone źródło związków o zróżnicowanych właściwościach chemicznych oraz biologicznych i są alternatywą dla leków syntetycznych charakteryzujących się możliwością wystąpienia poważnych działań niepożądanych w trakcie ich stosowania. Ponadto substancje pochodzenia naturalnego mogą służyć nie tylko jako leki, ale również wykorzystywane są one w badaniach pozwalających zrozumieć rolę szlaków metabolicznych zaangażowanych w rozwój chorób oraz lepiej wyjaśnić działanie już istniejących leków. Jako źródło innowacyjnych związków biologicznie aktywnych najlepiej nadają się te organizmy, których genom został w pełni rozszyfrowany, dzięki czemu identyfikacja oraz poznanie struktury nowoodkrytych substancji za pomocą nowoczesnych technik spektrometrii mas nie stanowi większego problemu. Modelowym organizmem może być tutaj pszczoła miodna (*Apis mellifera*) ze względu na to, że obecnie dysponujemy w pełni odkodowanym genomem tego owada [9]. Metody proteomiczne i metabolomiczne bardzo dobrze nadają się do analiz jadu pszczelego jako matrycy złożonej z szeregu protein, peptydów oraz innych związków małowcząsteczkowych o niewyjaśnionej strukturze i mechanizmie działania.

Postęp który dokonał się w ostatnim dwudziestoleciu w zaawansowanych technikach analitycznych opartych o metody rozdzielcze sprzężone ze spektrometrią mas, pozwolił na nieosiągalną dotąd złożoną analizę tysięcy związków. Spektrometry mas wyposażone w źródła jonów typu MALDI (ang. matrix assisted laser desorption ionization, jonizacja przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą) i ESI (ang. electrospray ionization, jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym) stały się obecnie podstawowym narzędziem pracy naukowców zajmujących się proteomiką i metabolomiką [10]. Zastosowanie spektrometrii mas nie ogranicza się tylko do analizy już wcześniej poznanych biopolimerów, ale dzięki wykorzystaniu programów bioinformatycznych oraz internetowych baz danych możliwa jest identyfikacja nieznanych dotąd związków o potencjalnym działaniu biologicznym. Dlatego metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE) w połączeniu z metodami spektrometrii mas dzięki wysokiej czułości, dokładności, specyficzności oraz przepustowości najlepiej nadają się do pełnej charakterystyki wieloskładnikowych matryc [11].

Niniejsze opracowanie stanowi opis nowatorskiego modelu analizy złożonych matryc pochodzenia naturalnego w oparciu o techniki łączone wsparte zaawansowaną analizą chemometryczną. Modelowymi matrycami w badaniach były: jad pszczeli oraz surowica ludzka. Wielokierunkowe badania skupiały się z zarówno na pełnej charakterystyce matrycy złożonej z wielu toksyn i alergenów, jak i na ocenie reakcji organizmu na użądlenie przez pszczołę. W analizach wykorzystywano spektrometrię mas ze źródłami jonów typu MALDI i ESI, wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), wysokosprawną elektroforezę kapilarną (HPCE) oraz analizę elektroforetyczną On-Chip. Otrzymane dane bioanalityczne zostały poddane analizie statystycznej z użyciem takich metod chemometrycznych jak: PCA (ang. principal component analysis, analiza głównych składowych), PLS-DA (ang. partial-least squares discriminant analysis, analiza dyskryminacyjna z metodą cząstkową najmniejszych kwadratów), SAM (ang. significance analysis of microarray, analiza istotności mikromacierzy), krzywe ROC (ang. receiver operating characteristic), ANOVA (ang. analysis

of variance, analiza wariancji) oraz regresja wieloraka. Przedstawiona złożona strategia analityczno-bioinformatyczno-kliniczna stanowi propozycję nowych rozwiązań diagnostycznych w dziedzinie analiz bioanalitycznych, w badaniach przesiewowych i w praktyce klinicznej.

### **3.3.Zastosowanie metod rozdzielczych wspartych analizą chemometryczną w badaniach jadu pszczelego**

#### **3.3.1. Charakterystyka jadu pszczelego z wykorzystaniem wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej HPCE i metod chemometrycznych**

Odżywcze i terapeutyczne właściwości produktów pszczelich znane już były w czasach starożytnych. Spośród produktów pszczelich takich jak: miód, mleczko pszczele, propolis, wosk, pyłek kwiatowy i pierzga, szczególne miejsce zajmuje jad pszczeli, jako bogate źródło związków biologicznie czynnych. Doniesienia w uznanych czasopismach naukowych potwierdzają skuteczność jadu pszczelego w leczeniu takich schorzeń jak: artretyzm [12], reumatyzm, ból, [13, 14] choroby nowotworowe [15] oraz choroby skóry. Tak wielokierunkowe działanie tego surowca spowodowane jest jego bardzo złożonym składem. Dodatkowe informacje dotyczące składu [8] i właściwości biologicznych jadu pszczelego [16] przedstawione są w oddzielnych opracowaniach autora. Zarówno na rynku europejskim jak i światowym znajdują się zarejestrowane preparaty na bazie jadu pszczelego. Jednakże brak jest jednoznacznych wskazań do standaryzacji tego produktu. Problem standaryzacji dotyczy wszystkich surowców pochodzenia naturalnego ze względu na to, że na zmianę ich składu mogą wpływać następujące czynniki: pochodzenie geograficzne, pora pozyskiwania surowca (rok, miesiąc), technologia otrzymywania, warunki przechowywania, a w przypadku surowców zwierzęcych – rasa, linia i płeć [17-21]. Dlatego do celów diagnostycznych jak i terapeutycznych potrzebne są czułe i selektywne metody rozdziału i oznaczania poszczególnych składników jadu pszczelego. Przyczynią się one ponadto do szerszego poznania alergenów odpowiedzialnych za reakcje uczuleniowe po ukąszeniu owadów.

Do rozdziału jadu pszczelego najlepiej nadają się techniki analityczne takie jak: wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), wysokosprawna elektroforeza kapilarna (HPCE) oraz spektrometria mas. Metody oparte na HPLC pozwoliły na rozdział i identyfikację głównych składników jadu do których należą proteiny (apamina, peptyd MCD, melittyna) oraz enzymy (fosfolipaza A<sub>2</sub>, hialuronidaza) [22-24]. Ponadto w skład jadu pszczelego wchodzi niewielkie ilości amin biogennych, węglowodanów, fosfolipidów, aminokwasów i feromonów. Piśmiennictwo podaje zaledwie kilka przykładów zastosowania HPCE w badaniach jadu. Technikę tą wykorzystano do oznaczania zaledwie dwóch głównych składników jadu (fosfolipazy A<sub>2</sub> i melittyny) [24, 25] oraz do wyznaczenia aktywności hialuronidazy w tym produkcie [26]. Ponadto dokładność prezentowanych w literaturze metod opartych na HPCE nie była potwierdzona z uwagi na brak dostępności materiałów referencyjnych dla składników jadu pszczelego, a badania prowadzono na zaledwie kilku niereprezentatywnych próbkach. Dlatego opracowano nową metodę HPCE z użyciem cytochromu c jako wzorca wewnętrznego do oznaczania głównych składników jadu.

Cytochrom c jest białkiem nie wchodzącym w skład jadu pszczelego i nie wpływa na rozdział jego pozostałych składników.

Nowo opracowana metoda analizy jadu pszczelego w oparciu o HPCE pozwoliła na rozdział przynajmniej dziewięciu jego składników oraz oznaczenie czterech z nich: apaminy, peptydu MCD, fosfolipazy A<sub>2</sub> oraz melittyny. Były to pierwsze badania elektroforetyczne jadu pszczelego w których wykorzystano wzorzec wewnętrzny. Analizy prowadzono przy użyciu aparatu do wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej Agilent G1600 (Agilent Technologies) z detektorem diodowym UV-DAD.

Nowo opracowaną metodę poddano walidacji określając jej: selektywność, precyzję (powtarzalność i odtwarzalność), dokładność (odzysk), liniowość i zakres oraz granicę wykrywalności (LOD) i granicę oznaczalności (LOQ). Wszystkie wyznaczone parametry walidacyjne potwierdziły przydatność opracowanej metody do analizy jadu pszczelego. Analizie poddano 38 próbek jadu pszczelego. Jad pozyskiwano metodą impulsów elektrycznych w formie suchego krystalicznego proszku. We wszystkich próbkach oznaczono zawartość apaminy, peptydu MCD, fosfolipazy A<sub>2</sub> oraz melittyny. Jako metodę referencyjną użyto wcześniej opracowaną i opublikowaną przez autora metodę HPLC [23].

Do porównania wyników otrzymanych obiema metodami posłużono się testami statystycznymi. Ponieważ test F wykazał, że analizowane dane nie spełniały warunku równości wariancji (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ;  $f_1 = n_1 - 1$ ,  $f_2 = n_2 - 1$ df) do oceny różnic pomiędzy średnimi czterech analizowanych zmiennych (stężeń apaminy, peptydu MCD, fosfolipazy A<sub>2</sub> oraz melittyny) użyto testu C-Cochrana i Coxa. Zgodnie z hipotezą zerową nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnimi stężeń analizowanych związków metodą HPLC i HPCE, co dowodzi dokładności metody elektroforetycznej.

W celu sprawdzenia statystycznie istotnych różnic pomiędzy zmiennymi niezależnymi (stężenie analizowanych związków w jadzie) otrzymane dane poddano analizie wariancji ANOVA. Do obliczeń wzięto pod uwagę trzy czynniki: linię pszczół, miesiąc oraz rok pozyskiwania jadu. Badania wykazały, że zawartość fosfolipazy A<sub>2</sub> oraz melittyny zależy od linii pszczół, od których pochodził jad. Dodatkowo stwierdzono statystycznie istotne różnice w stężeniu melittyny pomiędzy próbkami z różnych lat. W przypadku stężeń apaminy oraz peptydu MCD nie wykazano statystycznie istotnych różnic.

Analiza głównych składowych PCA posłużyła do wyjaśnienia różnic oraz wzajemnych korelacji pomiędzy głównymi składnikami jadu oznaczanymi w próbkach pochodzących od różnych linii pszczół oraz pozyskiwanymi w różnych miesiącach i latach. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że większość próbek rozmieszczona była wzdłuż PC1 zgodnie z linią pszczół. Takiego podziału nie zaobserwowano dla miesiąca oraz roku pozyskiwania próbek jadu. Dlatego można sądzić, że linia pszczół jest w przypadku analizowanych danych jedynym kryterium klasyfikacji próbek, co z kolei nasuwa wniosek o wpływie różnic genetycznych na zmienność składu jadu pszczelego. Ponadto zbudowana macierz korelacji potwierdziła silne liniowe zależności pomiędzy wszystkimi oznaczanymi składnikami jadu ( $r > 0,8$ ).

W związku z tym, że jad pszczeli jest złożoną matrycą pochodzenia naturalnego, zawartość jego poszczególnych składników może ulegać zmianom w zależności od wielu czynników. Zastosowana w niniejszej pracy metodyka wykorzystująca narzędzia chemometryczne w analizie danych elektroforetycznych pozwoliła na stwierdzenie różnic w

zawartości głównych składników jadu pszczelego w zależności od pochodzenia, linii pszczół, roku oraz miesiąca pozyskiwania jadu. Wykazano również wzajemne relacje pomiędzy tymi składnikami. Dlatego w procesie standaryzacji surowca oprócz jakościowej i ilościowej analizy jadu przy użyciu technik rozdzielczych opartych o HPCE lub HPLC powinno zastosować się również badania statystyczne takie jak: ANOVA i PCA.

### **3.3.2. Oznaczanie aktywności hialuronidazy w próbkach biologicznych z użyciem wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej HPCE**

Hialuronidazy to grupa enzymów, która odpowiada za hydrolizę kwasu hialuronowego (HA), będącego głównym składnikiem macierzy międzykomórkowej kręgowców [27]. Udział w wielu biologicznych procesach, takich jak: zapłodnienie, dyfuzja toksyn i mikroorganizmów, reakcje zapalne i alergiczne oraz rozwój nowotworów sprawił, że hialuronidazy są postrzegane jako markery diagnostyczne i potencjalny cel terapeutyczny [28]. Obecnie wykorzystanie hialuronidaz w medycynie opiera się najczęściej na zwiększeniu przepuszczalności tkanek łącznych, co skutkuje łatwiejszą i szybszą dyfuzją podawanych parenteralnie leków. W związku z szerokim występowaniem hialuronidaz w płynach biologicznych, tkankach, jadach i toksynach konieczne jest stosowanie zwalidowanych metod do oznaczania aktywności tego enzymu. Literatura podaje wiele metod służących do badania aktywności hialuronidaz, które oparte są o różne techniki analityczne: biologiczne, fizykochemiczne (turbidymetryczne [29-32] i wiskozymetryczne [33]), chemiczne (kolorymetryczne [34], fluorymetryczne [35-37], immunoenzymatyczne [38, 39], zymograficzne [40] oraz elektroforetyczne [41]). Klasyczne metody często charakteryzują się niską czułością oraz selektywnością, a do analizy wymagane są duże ilości próbki [42]. Z kolei do wad nowszych metod należy zaliczyć skomplikowaną metodykę badawczą, konieczność stosowania drogich odczynników oraz długi czas analizy. Dlatego niezbędne jest poszukiwanie nowych precyzyjnych i dokładnych metod służących do oznaczania aktywności hialuronidazy. Wysokosprawna elektroforeza kapilarna (HPCE) spełnia wszystkie wyżej wymienione warunki i została wykorzystana w badaniach aktywności hialuronidazy przez Pattanaargsona i wsp [26]. Opracowana przez niniejszy zespół metoda pozwalała tylko na potwierdzenie aktywności hialuronidazy w analizowanych próbkach jadu pszczelego. Autorzy próbowali oznaczać aktywność hialuronidazy poprzez wyznaczenie czasu niezbędnego do zmniejszenia rozmiaru pików kwasu hialuronowego trawionego przez hialuronidazę. Jednakże zgodnie z danymi literaturowymi [43, 44] oraz badaniami własnymi produkty degradacji kwasu hialuronowego pojawiają się natychmiast po jego zmieszaniu z hialuronidazą, a czasy migracji odpowiadających im pików na elektroferogramie pokrywają się z czasami migracji kwasu hialuronowego. Dlatego takie podejście uniemożliwia prawidłową integrację analizowanych pików, co w konsekwencji nie daje możliwości otrzymania wiarygodnych danych ilościowych.

W związku z powyższym opracowano nową metodę oznaczania aktywności hialuronidazy w próbkach biologicznych opartą o HPCE. Badania prowadzono z wykorzystaniem aparatu do wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej Agilent G1600 (Agilent Technologies) z detektorem diodowym UV-DAD. W metodzie wykorzystano analizę

głównych produktów enzymatycznej hydrolizy kwasu hialuronowego. Badana była aktywność hialuronidazy jadu pszczelego oraz hialuronidazy z jąder wołowych.

Aktywność hialuronidazy wyznaczana była z wykorzystaniem modelu regresji wielorakiej. W celu wyznaczenia zmiennych objaśniających (pola powierzchni pików pochodzących od produktów hydrolizy kwasu hialuronowego) użytych do konstrukcji modelu regresji wielorakiej oraz określenia optymalnego czasu trwania reakcji hydrolizy przeprowadzono dodatkowe badania. Mieszaniny kwasu hialuronowego i hialuronidazy poddawano analizie HPCE po 1,5 h, 3,0 h, 4,5 h oraz 6,0 h inkubacji w temperaturze 37 °C. W związku z dynamicznym procesem trawienia kwasu hialuronowego ograniczono się do analizy głównych produktów hydrolizy: tetrasacharydu, heksasacharydu i oktasacharydu HA. Współczynniki zmienności odnoszące się zarówno do czasów migracji jak i pól powierzchni powyższych pików były odpowiednio niższe od 1% i 10%. Piki pochodzące od oligosacharydów o wyższych masach cząsteczkowych nie były dostatecznie rozdzielone i szybko zanikały. Aby zoptymalizować czas trwania reakcji enzymatycznej przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA). Analiza ta posłużyła do wyjaśnienia związku pomiędzy powierzchniami pików odpowiadających produktom degradacji kwasu hialuronowego analizowanych w różnych odstępach czasowych (1,5 h, 3,0 h, 4,5 h oraz 6,0 h), a aktywnością hialuronidazy (zmienna grupująca). Aby stwierdzić korelację pomiędzy analizowanymi zmiennymi wyniki badań elektroforetycznych uporządkowano w macierzy i poddano standaryzacji, a następnie przeprowadzono analizę PCA. Analizy PCA przeprowadzono oddzielnie dla każdego czasu inkubacji (1,5 h; 3,0 h; 4,5 h i 6,0 h) oraz dokonano analizy zbiorczej wykorzystującej dane otrzymane po wszystkich czasach inkubacji. Przeprowadzone analizy wykazały, że wszystkie próbki można podzielić na cztery podzbiory zgodnie z aktywnością hialuronidazy. W związku z tym można przyjąć, że czas trwania reakcji enzymatycznej degradacji HA nie wpływa na wyniki badań aktywności hialuronidazy. Zatem dalsze badania prowadzono stosując 0,5-godzinny czas inkubacji.

Do budowy modelu wykorzystywano co najmniej 10 roztworów hialuronidazy pochodzącej z jąder wołowych o wzrastających stężeniach. Zarówno roztwory hialuronidazy jak i roztwory kwasu hialuronowego (200 µg/g) przygotowane były w buforze octanowym, pH = 4,00. Preinkubowane roztwory (15 min., temp: 37 °C) mieszano w stosunku 1:1 i inkubowano w temp. 37 °C przez 30 min. Następnie mieszaniny kwasu hialuronowego z hialuronidazą analizowano za pomocą HPCE. Czas trwania każdej analizy wynosił 15 minut. Pola powierzchni pików trzech głównych produktów degradacji kwasu hialuronowego (disacharydu, tetrasacharydu oraz heksasacharydu) użyto jako zmienne objaśniające w modelu regresji wielorakiej. Zmienną grupującą stanowiła aktywność enzymatyczna hialuronidazy. Na podstawie przeprowadzonych badań wyprowadzono równanie umożliwiające obliczenie aktywności hialuronidazy:

$$\text{aktywność hialuronidazy [U]} = aA + bB + cC + d$$

gdzie: A, B, C – pola powierzchni pików pochodzących od produktów degradacji kwasu hialuronowego, odpowiednio: tetra-, hekso- i oktasacharydu HA (zmienne objaśniające); a, b, c – współczynniki proporcjonalności wyliczone w modelu; d – składnik resztowy (realizacja składnika losowego).

Następnie roztwory próbek o nieznannej aktywności hialuronidazy analizowano w taki sam sposób, jak w przypadku roztworów hialuronidazy użytych do budowy modelu regresji wielorakiej. Każdy eksperyment powtórzono trzykrotnie. W celu potwierdzenia otrzymanych danych, przeprowadzono walidację metody określając: selektywność, precyzję, dokładność, liniowość, zakres, granicę wykrywalności oraz granicę oznaczalności. Wszystkie parametry walidacyjne potwierdziły, że opracowana procedura analityczna nadaje się do realizacji założonych celów.

Nowoopracowana metoda została wykorzystana do oznaczania aktywności hialuronidazy w próbkach jadu pszczelego oraz hialuronidazy pochodzącej z jąder wołowych (próbki zakupione w firmie Sigma). Aktywność hialuronidazy w analizowanych próbkach jadu pszczelego ( $n = 10$ ) wahała się w zakresie od  $825,2 \pm 30,7$  U/mg s.m. do  $1450,7 \pm 101,1$  U/mg s.m. Aktywność hialuronidazy wołowej oznaczona niniejszą metodą pokrywała się z aktywnością hialuronidazy deklarowaną przez producenta, co dodatkowo potwierdziło dokładność metody HPCE. Ponadto uzyskane wyniki porównano z wynikami otrzymanymi z użyciem powszechnie stosowanych metod farmakopealnych wykorzystywanych do badania aktywności hialuronidazy: metody turbidymetrycznej i wiskozymetrycznej. Przeprowadzone testy t-studenta dla próbek niezależnych, poprzedzone potwierdzeniem normalności (test Shapiro-Wilka) oraz potwierdzeniem spełnienia warunku równości wariancji (test F), wykazały brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy wynikami aktywności hialuronidazy otrzymanymi metodą HPCE, a metodami farmakopealnymi ( $p=0,730$ ). Na podstawie tych danych można wnioskować, że pozostałe składniki jadu pszczelego nie wpływają na wyniki aktywności hialuronidazy.

Obecnie wyróżnia się trzy klasy hialuronidaz: EC 3.2.1.35, EC 3.2.1.36, EC 4.2.2.1 [27]. Hialuronidazy pochodzące z jadu pszczelego oraz jąder wołowych analizowane w niniejszych badaniach należą do klasy EC 3.2.1.35, do której zaliczane są hialuronidazy pochodzące od ssaków oraz jądów węży i owadów błonkoskrzydłych (*Hymenoptera*). Enzymy te hydrolizują wiązania  $\beta$ -1-4-glikozydowe zarówno w kwasie hialuronowym jak i chondroitynie, siarczanie chondroityny oraz siarczanie dematanu [42]. Enzymy z tej klasy oprócz aktywności hydrolitycznej mają zdolność do transglikozylacji, która prowadzi do powstawania jednostek di-, tri-, okta- i nonasacharydowych HA [45]. Zaproponowana metodyka oparta o HPCE pozwala na analizę wszystkich wyżej wymienionych oligosacharydów. Dlatego należy sądzić, że może być ona zastosowana do badań aktywności wszystkich hialuronidaz z klasy EC 3.2.1.35.

Nowoopracowana metoda wykorzystująca HPCE do oznaczania aktywności hialuronidazy pozwala na otrzymanie wiarygodnych wyników w krótkim czasie z dużą precyzją i dokładnością. Jest to pierwsza w pełni zwalidowana metoda oznaczania aktywności hialuronidazy, która pozwala na otrzymanie danych ilościowych w przeciwieństwie do innych metod, które dostarczały tylko danych jakościowych odnośnie procesu trawienia kwasu hialuronowego z udziałem hialuronidazy. Nowa metoda może być wykorzystana do analizy hialuronidaz różnego pochodzenia (np. hialuronidaza z jadu pszczelego lub jąder wołowych). Ponadto charakteryzuje się ona łatwą metodyką, niewielką objętością próbki niezbędnej do przeprowadzenia badań, małą ilością zużywanych tanich odczynników i w związku z tym niskim kosztem jednostkowym analiz. Metoda ta pozwala na monitorowanie procesu

enzymatycznego trawienia kwasu hialuronowego w szerokim przedziale czasowym (od kilku minut do kilku godzin, a nawet dni). Brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy aktywnością hialuronidazy wyznaczoną za pomocą nowej metody, a wynikami otrzymanymi przy użyciu powszechnie używanych metod (turbidymetrycznej i wiskozymetrycznej) wskazuje na to, że metoda HPCE może być stosowana alternatywnie do metod klasycznych.

### **3.4. Zastosowanie technik łączonych opartych o spektrometrię mas w proteomicznych badaniach jadu pszczelego**

#### **3.4.1. Charakterystyka jadu pszczelego z wykorzystaniem metod spektrometrii mas z jonizacją MALDI i ESI**

Istnieją dwa podejścia do standaryzacji złożonych produktów pochodzenia naturalnego. W przypadku, gdy właściwości biologiczne standaryzowanego produktu mogą być przypisane konkretnym związkom, jest możliwość oznaczania tych substancji z użyciem odpowiednich metod analitycznych. W drugim przypadku, gdy nie jest w pełni poznany skład chemiczny matrycy lub gdy aktywność biologiczna wynika z synergistycznego działania wielu składników, w celach standaryzacji analizowane są wybrane substancje czynne [46]. W związku z tym, że jad pszczeli jest złożoną mieszaniną związków o niescharakteryzowanych właściwościach, standaryzację tego produktu powinno prowadzić się w odniesieniu do wytypowanych analitów. Jednakże wciąż jest brak jednoznacznych wytycznych w tym zakresie i wykorzystywane są metody stosowane do standaryzacji szczepionek alergenowych używanych w immunoterapii. Do metod tych zalicza się: wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) [22-24] i wysokosprawną elektroforezę kapilarną (HPCE) [24, 25] – stosowane do oznaczania głównych związków białkowych; testy immunoenzymatyczne (ELISA) – do wyznaczania całkowitego potencjału alergennego [47]; elektroforezę żelową (SDS-PAGE) w połączeniu z testami immunoblot – do ilościowej analizy białka całkowitego oraz antygenów wiążących się z przeciwciałami IgE [48, 49].

Do charakterystyki właściwości jadu pszczelego wykorzystywano różne techniki analityczne: spektroskopię UV i IR [50, 51], spektrofluorymetrię [52], spektroskopię <sup>1</sup>H NMR [53, 54], różnicową kalorymetrię skaningową [55] oraz spektrometrię mas z jonizacją plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS) [56]. Techniki rozdzielcze, takie jak: HPLC i HPCE w połączeniu z detekcją diodową (DAD) lub fluorymetryczną (FLD) pozwalają na analizę kilku lub kilkunastu związków jadu pszczelego w trakcie jednej analizy [23]. Jednakże w związku ze złożonością jadu pszczelego metody te nie są wystarczające do jego pełnej charakterystyki. Od technik tych wyraźnie odróżniają się zaawansowane metody spektrometrii mas, które pozwalają na analizę wielu peptydów, białek oraz innych związków w trakcie jednego cyklu analitycznego.

W wyniku rozwoju dwóch metod miękkiej jonizacji, MALDI (desorpcja laserowa z udziałem matrycy) i ESI (elektrozpylenie), spektrometria mas stała się niezbędnym narzędziem do analizy próbek biologicznych złożonych z peptydów i białek [57-60]. Większość klasycznych protokołów służących do analizy jadu pszczelego z udziałem spektrometrii mas wykorzystuje metody rozdzielcze takie jak: HPLC lub elektroforezę

dwukierunkową (2-DE) [61, 62]. Techniki te pozwalają na identyfikację wielu związków wchodzących w skład mieszaniny. Jednakże wymagają one stosunkowo dużych ilości próbki oraz są czasochłonne i pracochłonne w porównaniu do bezpośrednich analiz z użyciem spektrometrów wyposażonych w źródła jonów MALDI lub ESI [63]. Technika MALDI nie nadaje się do uzyskiwania danych ilościowych, ale istnieje możliwość otrzymania danych półilościowych [64]. Pomiar pojedynczych próbek może być łatwo zautomatyzowany i dzięki temu technika ta pozwala na prowadzenie badań o wysokiej przepustowości. Wyniki otrzymane za pomocą techniki MALDI są często komplementarne w stosunku do wyników otrzymanych z użyciem techniki ESI i w związku z tym zastosowanie ich obu w badaniach złożonych mieszanin peptydowo-białkowych pozwala na otrzymanie bardziej szczegółowych danych. Dlatego do analizy jakościowej i półilościowej różnych próbek jadu pszczelego wykorzystano spektrometrię mas z jonizacją MALDI i ESI. Podejście to umożliwiło otrzymanie wartościowych danych odnośnie różnic w składzie próbek jadu pszczelego w zależności od kraju pochodzenia (Polska, Gruzja, Estonia), linii pszczół, roku i sezonu pozyskiwania jadu. Analizy statystyczne posłużyły do wyznaczenia czynników mających wpływ na skład badanych próbek.

Spektrometria MALDI-TOF posłużyła głównie do badań półilościowych ze względu na jej dużą czułość, krótki czas analizy, odporność oraz przewagę tworzenia się pojedynczo naładowanych jonów co ułatwia interpretację otrzymanych widm masowych [60]. Do badań wykorzystywano spektrometr mas Voyager-DE PRO (AB Sciex) wyposażony w impulsowy laser azotowy. Analizy prowadzono z użyciem kwasu sinapinowego jako matrycy. Ocenie poddano kilkanaście peptydów o największej intensywności w 41 różnych próbkach jadu pszczelego w zakresie mas od 2845 Da do 3644 Da.

Analiza półilościowa z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI-TOF może sprawiać pewne trudności z powodu możliwej niskiej powtarzalności pomiędzy analizowanymi spotami, niskiej odtwarzalności pomiędzy poszczególnymi próbkami oraz możliwością degradacji sygnału pomiędzy strzałami lasera [65]. Aby zminimalizować te problemy w badaniach wykorzystano wzorzec wewnętrzny którym był peptyd GLP (glucagon-like peptide-1-(7-36)). Peptydy o monoizotopowych masach 2859,84 Da oraz 2872,83 Da obserwowano głównie w archiwalnych próbkach (od kilku do kilkunastu lat przechowywania) podczas gdy w świeżych próbkach zawartość tych peptydów była znacznie niższa. Podobnie peptydy o masach 2886,80 Da i 2952,84 Da wykryto tylko w próbkach starszych. W związku z tym można sądzić, że były to produkty rozkładu innych składników białkowych lub peptydowych jadu. Do sprawdzenia istotnych różnic pomiędzy zmiennymi niezależnymi (zawartość analizowanych peptydów) przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA). Do analiz wzięto pod uwagę trzy czynniki: linia pszczół, miesiąc oraz rok pozyskiwania próbek jadu pszczelego. Analiza wieloczynnikowa nie wykazała statystycznie istotnych różnic. Z kolei jednoczynnikowa ANOVA potwierdziła statystycznie istotny wpływ roku pobierania jadu na zawartość analizowanych peptydów.

W celu identyfikacji badanych związków zastosowano spektrometrię mas nanoESI-QqTOF. W związku z obecnością mostków disiarczkowych w peptydach wchodzących w skład jadu pszczelego analizy poprzedzono redukcją tych wiązań za pomocą ditiotreitolu (DTT). Zidentyfikowano 17 sekwencji peptydowych, w tym: melittynę (10 różnych produktów rozkładu i prekursorów), apaminę, peptyd degranulujący komórki tuczne (MCDP)



i sekapinę. Ważnym osiągnięciem niniejszych badań było dodatkowe zidentyfikowanie małego białka (LOC408363) nieopisywanego w literaturze, którego ekspresja dotąd nie była udowodniona w warunkach *in vivo*. Cztery spośród zidentyfikowanych peptydów będących produktami degradacji i prekursorami melittyny oraz apaminę i MCDP zaobserwowano również za pomocą użytej techniki MALDI-TOF-MS. Ponadto potwierdzono niektóre modyfikacje potranslacyjne oraz modyfikacje chemiczne: amidację C-końca melittyny, apaminy i peptydu degranulującego komórki tuczne oraz przekształcenie glutaminianu (Glu) w piroglutaminian (p-Glu) na N-końcach prekursorów melittyny.

Należy podkreślić, że w przypadku jadu pszczelego traktowanego jako produktu naturalnego o potencjalnym działaniu biologicznym niezbędne jest monitorowanie zawartości wszystkich jego składników, nawet tych, które nie zostały zidentyfikowane. Wiadomo bowiem, że niektóre peptydy obecne w jadzie pszczelim w bardzo niskich stężeniach nie posiadają właściwości toksycznych, ale mogą wykazywać inne działanie biologiczne mające wpływ na odpowiedź organizmu na jad [9]. Z tego powodu metody spektrometrii mas zastosowane w niniejszych badaniach mogą być wykorzystywane do pełnej charakterystyki oraz standaryzacji tego surowca. Zaproponowana metodyka wykorzystująca bezpośrednią analizę MALDI-TOF-MS nie wymagającą czasochłonnego wstępnego przygotowania próbek daje możliwość przeprowadzenia czułych i szybkich badań skryningowych próbek jadu pszczelego. Potwierdzenie tożsamości surowca może odbywać się na podstawie białkowo-peptydowego odcisku palca, a wykryte peptydy oraz produkty rozkładu białek mogą być jednoznacznie zidentyfikowane za pomocą spektrometrii nanoESI-QqTOF lub spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF.

#### **3.4.2. Badania jadu pszczelego oparte na technice shotgun z wykorzystaniem różnych strategii wzbogacania próbek**

W dostępnej literaturze naukowej przedstawionych jest wiele strategii dotyczących charakterystyki proteomicznej złożonych matryc biologicznych [66-70]. Jednak ich główną wadą jest brak optymalizacji metodyki, która mogłaby być wytyczną do pracy dla ogółu naukowców. To prowadzi w ostatecznym rozrachunku do małej powtarzalności wyników. W laboratoriach skierowanych na badania proteomiczne można spotkać się aktualnie z 3 podstawowymi procedurami: bottom-up, top-down i shotgun. W związku ze złożonością materiału biologicznego najczęściej stosowana jest strategia bottom-up, wykorzystująca rozdział materiału przy użyciu dwukierunkowej elektroforezy żelowej, a następnie rozdzielone białka poddawane są trawieniu proteolitycznemu i identyfikowane przy wykorzystaniu tandemowej spektrometrii mas [71]. Jednakże otrzymywane tą strategią wyniki charakteryzują się niską powtarzalnością, a stosowanie wymienionej techniki rozdziału jest czasochłonne, co przy kilkukrotnym powtórzeniu badania staje się bardzo uciążliwe. Rozwój metod fragmentacji związków pozwolił na wprowadzenie do laboratoriów mniej skomplikowanej strategii top-down, zakładającej analizę białek natywnych pomijając etapy ich rozdziału i proteolizy. Przygotowanie próbki do badań tą metodą jest znacznie mniej skomplikowane. Jednak ocena widm po fragmentacji dużych peptydów jest bardzo złożona, a powstawanie kilkukrotnie zjonizowanych cząstek może prowadzić do nieprecyzyjnej

interpretacji wyników. Coraz częściej badania proteomiczne opierane są na technice shotgun, która polega na trawieniu proteolitycznym całej próbki, a następnie rozdzieleniu powstałej mieszaniny przy wykorzystaniu metod chromatograficznych. Identyfikację białek prowadzi się przy wykorzystaniu tandemowej spektrometrii mas.

W złożonych układach biologicznych wiele protein występuje w małych ilościach, które nie pozwalają na bezpośrednie ich oznaczenie w badanej próbce. Dlatego też niezwykle ważny jest proces zagęszczania analitu, który pozwala identyfikować substancje występujące w niższych stężeniach. Do tego celu wykorzystywane są między innymi takie metody jak: wirowanie, ultrawirowanie [72, 73], elektroforeza, metody chromatograficzne [74], wyrównywanie stężeń [75] oraz ekstrakcja do fazy stałej [76, 77]. Szczególną wydajnością procesu oczyszczania i zagęszczania odznaczają się kombinatoryczne biblioteki peptydowe (CPLL) [78]. Metoda ta opiera się na adsorpcji elementów próbki na nośniku posiadającym taką samą pojemność względem wszystkich składników. Białka o dużych stężeniach w analizie wiązane są jedynie w małym stopniu, gdyż szybko wysyczone zostają miejsca ich wiązania. Z kolei proteiny o małych stężeniach mogą wiązać się niemal w całości z uwagi na niepełne wysycenie ligandów. Technika ta jest więc szczególnie przydatna do usuwania białek o największych stężeniach, które mogą maskować obecność pozostałych składników analitu i jest dostępna w handlu między innymi pod nazwą ProteoMiner. Na wyniki analiz proteomicznych dodatkowy wpływ mogą mieć zanieczyszczenia próbki różnego pochodzenia, czy też jej zbyt duże zasolenie [79]. Dzięki zastosowaniu ekstrakcji do fazy stałej (SPE) otrzymuje się materiał o bardzo dużej czystości i wysokim stężeniu, co pozwala na znaczną poprawę identyfikacji produktów oczyszczania. Metoda SPE jest obecnie szeroko stosowana w postaci końcówek ekstrakcyjnych do mikropipet, co pozwala na wykorzystanie minimalnych ilości analitu [80].

Celem tego etapu prac było zoptymalizowanie strategii shotgun do proteomicznej charakterystyki próbek jadu pszczelego, a także ocena i wybór odpowiedniego systemu do oczyszczania i zagęszczania złożonych próbek pochodzenia naturalnego. Do badań wykorzystano zestaw złożony z chromatografu „EASY-nLC II” (Bruker Daltonics), kolektora frakcji „Proteiner-fc II” (Bruker Daltonics) oraz spektrometru mas MALDI-TOF/TOF „UltrafleXtreme” (Bruker Daltonics). W pierwszym etapie badań w celu zwiększenia możliwości identyfikacyjnych analizowanych białek jadu pszczelego testowano przydatność strategii oczyszczania opartych o kombinatoryczne biblioteki peptydowe (ProteoMiner, Bio-Rad) oraz ekstrakcję do fazy stałej z wykorzystaniem końcówek ekstrakcyjnych (OMIX, Agilent). Do tego celu wykorzystano badania profilowania peptydowego w zakresie mas od 900 do 4500 Da w trybie reflektrometrycznym, co zapewniło uzyskanie wysokiej rozdzielczości i dużej dokładności analizowanych mas. Analiza otrzymanych widm masowych wykazała, że zastosowanie obu strategii oczyszczania pozwala na stwierdzenie obecności nowych, wcześniej nieobserwowanych związków. Stosując różne drogi przygotowania próbek jadu, stwierdzono obecność 62 unikalnych wcześniej maskowanych peptydów po zastosowaniu strategii OMIX oraz 26 unikalnych peptydów po zastosowaniu strategii ProteoMiner. Świadczy to o dużej komplementarności wyników otrzymanych po zastosowaniu powyższych strategii wzbogacania i oczyszczania próbek. Również analiza elektroforetyczna On-Chip wykazała dobrą wydajność zastosowanych metod przygotowania próbek. Jedną z głównych zalet tej metody w stosunku do klasycznej elektroforezy żelowej jest wyeliminowanie

czasochłonnych procedur oraz minimalizacja zużycia odczynników i badanych próbek. Badania prowadzono w zakresie mas od 5 do 250 kDa. Na wirtualnym obrazie żelowym otrzymanym w wyniku analizy oczyszczonych próbek jadu za pomocą technologii OMIX wyraźnie widać nowe prążki odpowiadające białkom w zakresie mas powyżej 40 kDa. W przypadku próbek wzbogacanych z użyciem strategii ProteoMiner również zaobserwowano nowe pasma w zakresie od 10 do 150 kDa niewidoczne w próbkach nieoczyszczonych.

W kolejnym etapie badań podjęto próbę charakterystyki próbek jadu pszczelego w oparciu o strategię shotgun. Próbki jadu pszczelego trawione były trypsyną, a powstała mieszanina peptydów rozdzielana była za pomocą kapilarnej chromatografii cieczowej na 192 frakcje i następnie poddawana analizie za pomocą tandemowej spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF. Zastosowanie płytek MALDI typu PAC (Prespotted AnchorChip, Bruker Daltonics), których spoty pokryte są specjalnie przygotowaną matrycą i kalibrantami odpowiednimi do badania na MALDI-TOF/TOF, pozwoliło na identyfikację 18 białek jadu. Płytki PAC dedykowana jest jednak do wykorzystania przy szybkich skryningowych analizach, a piśmiennictwo przytacza wiele badań wskazujących na jej gorsze właściwości w porównaniu z klasyczną płytką AnchorChip (Bruker Daltonics) [81-84]. Możliwość zastosowania na płytce AnchorChip większej ilości nakładanej wraz z analitem matrycy opartej na HCCA, oraz wspólnej ich krystalizacji powoduje, że prowadzone z jej użyciem badania stają się dokładniejsze, co pozwala z kolei na zwiększenie ilości zidentyfikowanych związków jadu pszczelego [85]. Wykorzystanie płytki Anchorchip pozwoliło na zidentyfikowanie aż 26 białek jadu pszczelego. Zastosowanie technologii ProteoMiner doprowadziło do identyfikacji kolejnych 4 wcześniej maskowanych białek wchodzących w skład jadu pszczelego (białko podobne do karboksypeptydazy X-prolilowej, prekursor peptydyl-prolil cis-trans izomerazy B, białko podobne do receptora reninowego, izoforma 1 kalretikuliny), a technologia OMIX pozwoliła na stwierdzenie obecności jednego dotychczas niescharakteryzowanego białka (LOC100577054). Wskazuje to na znaczną komplementarność wyników uzyskiwanych powyższymi drogami.

Stosując powyższą metodykę w sumie zidentyfikowano 33 białka jadu pszczelego pozyskiwanego metodą impulsów elektrycznych. Li i wsp. zidentyfikowali w takim samym materiale zaledwie 17 białek stosując zarówno metodykę bottom up z wstępnym rozdziałem za pomocą elektroforezy żelowej (14 zidentyfikowanych białek) jak i shotgun (15 zidentyfikowanych białek) [86]. W badaniach tych porównywano skład jadu pszczelego pozyskiwanego dwiema metodami: za pomocą impulsów elektrycznych oraz ekstrahowanego z gruczołów jadowych. Zasugerowano, że jad otrzymywany bezpośrednio z gruczołów jadowych zawiera więcej składników białkowych w związku z możliwością dostania się do tego materiału składników tkanek uszkodzonego zbiornika jadowego. Jednakże obecne badania dowiodły, że białka zidentyfikowane przez zespół Li i wsp. [86] tylko w jadzie pozyskiwanym z gruczołu jadowego obecne były również w jadzie zbieranym metodą impulsów elektrycznych. Rozbieżności te spowodowane były prawdopodobnie różnicami pomiędzy zastosowaną metodyką rozdziału chromatograficznego. W niniejszych badaniach próbki jadu pszczelego rozdzielane były na 192 frakcje i następnie poddawane analizie MALDI-TOF/TOF-MS. Natomiast w cytowanej pracy analizowano zaledwie 7 frakcji z użyciem techniki LC-Qq-TOF-MS. Fakt ten wyraźnie wpłynął na liczbę rozdzielonych i zidentyfikowanych białek jadu.

W celu ustalenia homologii nowoodkrytych, niescharakteryzowanych białek jadu pszczelego (LOC408666, LOC725074, LOC725163, LOC100577054) z proteomami innych organizmów zastosowano program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), który służy m. in. do określenia regionów podobieństwa pomiędzy sekwencjami aminokwasów białek hipotetycznych i białek występujących w innych organizmach (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). W przypadku białka kodowanego przez gen *Apis mellifera* LOC408666 potwierdzono homologię z hipotetycznymi białkami kodowanymi przez geny obecne u *Apis florea* (pszczoła karłowata), *Camponotus floridanus* (gatunek mrówki gmachówki), *Megachile rotundata* (miesierka lucernówka) i *Nasonia vitripennis* (gatunek pasożytniczej osy). Dla białka kodowanego przez gen LOC725074 wykazano najwyższą zgodność z *Apis florea*, *Solenopsis invicta* (mrówka ogniowa) oraz *Bombus terrestris* (trzmiel ziemny). W przypadku sekwencji aminokwasowej białka kodowanego przez gen LOC100577054 stwierdzono podobieństwo z proteomem *Bombus terrestris*, a dla hipotetycznego białka LOC725163 nie znaleziono żadnego istotnie statystycznego podobieństwa.

Zaproponowana w powyższych badaniach proteomiczna strategia shotgun w połączeniu z różnymi procedurami wzbogacania i oczyszczania próbek takimi jak: kombinatoryczne biblioteki peptydowe oraz ekstrakcja do fazy stałej doprowadziła do identyfikacji 33 różnych białek wchodzących w skład jadu pszczelego. Wśród nich potwierdzono obecność 11 z 12 znanych alergenów jadu pszczelego oraz zidentyfikowano 4 dotąd niescharakteryzowane białka jadu. Przedstawiona metodyka umożliwia otrzymanie komplementarnych danych w proteomicznej charakterystyce złożonych matryc pochodzenia naturalnego.

### **3.4.3. Proteomiczna charakterystyka jadu pszczelego w oparciu o łączone techniki LC-MALDI-TOF/TOF MS i LC-ESI-QTOF MS**

Niezależnie prowadzone badania proteomiczne jadu pszczelego przez różne grupy naukowców potwierdziły obecność w tym produkcie dziesiątek niescharakteryzowanych białek mogących pełnić rolę związków o właściwościach toksycznych i/lub alergicznych [61, 62, 86-88]. Problem analizy tak złożonego materiału biologicznego może być częściowo rozwiązany poprzez zastosowanie różnych strategii wzbogacania próbki oraz wykorzystanie technik łączonych LC-MS [89]. Pomimo wykorzystania odpowiednich metod deplecji i oczyszczania, przed analizą MS próbki jadu muszą być dodatkowo rozdzielone. W odniesieniu do zakresu dynamicznego białek w złożonych matrycach biologicznych takich jak jad pszczeli, identyfikacja wszystkich białek nie jest możliwa przy zastosowaniu pojedynczej techniki proteomicznej [88]. Dlatego też kolejnym etapem prac było określenie składu jadu pszczelego za pomocą technik łączonych LC-MALDI-TOF/TOF i LC-ESI-QTOF poprzedzonych wzbogacaniem próbki poprzez zastosowanie kombinatorycznych bibliotek peptydowych (ProteoMiner, Bio-Rad). Analizy LC-MALDI prowadzono na zestawie składającym się z chromatografu „EASY-nLC II” (Bruker Daltonics), kolektora frakcji „Proteineer-fc II” (Bruker Daltonics) oraz spektrometru mas MALDI-TOF/TOF „UltrafleXtreme” (Bruker Daltonics). Analizy LC-ESI wykonywano z użyciem zestawu

złożonego z chromatografu cieczowego nRSLC (Dionex) oraz spektrometru mas Impact II (Bruker Daltonics). Widma MS/MS uzyskane z użyciem dwóch technik LC-MALDI i LC-ESI były przetwarzane w oparciu o platformę ProteinScape 3.1. Do identyfikacji białek wykorzystano bazę danych NCBI nr z taksonomicznym dopasowaniem do *Apis mellifera*. Przy wyszukiwaniu białek uwzględniono następujące modyfikacje potranslacyjne: oksydacja metioniny, histydyny oraz tryptofanu; metylacja kwasu asparaginowego oraz kwasu glutaminowego; dioksydacja metioniny; deaminacja asparaginy i glutaminy; transformacja glutaminy do kwasu piroglutaminowego oraz stała modyfikacja – karbamidometylacja cysteiny. Główne składniki jadu takie jak melittyna i fosfolipaza A<sub>2</sub> blokują miejsca wiązania do ligandów C18 fazy stałej kolumny chromatograficznej. Dlatego użycie strategii ProteoMiner było w pełni uzasadnione, ponieważ spowodowało to wzrost stężenia w próbce związków obecnych w niskich stężeniach co umożliwiło ich identyfikację. Zastosowana w badaniach nowa strategia pozwoliła na otrzymanie czterech różnych sekwencyjnie eluowanych frakcji białkowych jadu, zamiast jednej frakcji wykorzystywanej we wcześniej prowadzonych badaniach. Zaproponowana nowatorska metodyka była po raz pierwszy wykorzystana w proteomicznych badaniach jadu pszczelego i pozwoliła na znaczne zmniejszenie zakresu dynamicznego peptydowych i białkowych składników tego produktu. Metoda frakcjonowania jadu pszczelego w oparciu o CPLL pozwoliła zidentyfikować dodatkowo 75 białek w przy użyciu techniki LC-MALDI MS oraz 79 białek w oparciu o technikę LC-ESI-Q-TOF MS, w porównywaniu z analizą surowego jadu. Zestawienie wyników identyfikacji białek zarówno z analizy surowego jadu oraz 4 frakcji CPLL pozwoliło otrzymać 135 unikalnych białek w technice LC-ESI oraz 27 unikalnych białek w technice LC-MALDI. Łącznie zidentyfikowano 269 białek, w tym 49 pszczelich toksyn, alergenów oraz składników biorących udział w intoksykacji organizmu. Związki te zostały zakwalifikowane do klas enzymów takich jak: esterazy, proteazy, peptydazy, hydrolazy, inhibitory proteaz i główne białka mleczka pszczelego. Ponadto zidentyfikowano 34 niescharakteryzowane białka o nieznanym funkcji. Białka te zostały sprawdzone przy pomocy algorytmu BLAST w celu określenia homologii sekwencji białkowych z dostępnymi sekwencjami w bazach danych. Wytypowano 5 białek jadu pszczelego, których sekwencje wykazały wysoką homologię z toksycznymi białkami innych gatunków rzędu *Hymenoptera*. Białko kodowane przez gen LOC100576326 wykazywało silne podobieństwo do różnych form proteazy serynowej ulegającej ekspresji u następujących owadów żądających: *Apis dorasta* (pszczoła olbrzymia), *Apis florea* (pszczoła karłowata), *Bombus terrestris* (trzmieł ziemny), *Megachile rotundata* (miesierka lucernówka) i *Cerapachys biroi* (gatunek mrówki). Dla sekwencji aminokwasowej kodowanej przez gen LOC100577725 stwierdzono homologię z hitynazami takich organizmów jak: *Cerapachys biroi* oraz *Nasonia vitripennis*. Niescharakteryzowane dotąd białko kodowane przez gen LOC100578816 wykazało istotne dopasowanie z neurotoksyną obecną u gatunku mrówki żniwiarki, *Pogonomyrmex barbatus*. Analiza sekwencji aminokwasowej kodowanej przez gen LOC725074 pozwoliła na stwierdzenie podobieństwa z omega-konotoksyną wielu gatunków z rzędu owadów błonkoskrzydłych. Wykazano także, że białko kodowane przez gen LOC100578392 posiada konserwatywną domenę identyczną z nadrodziną alergenów o nazwie: *insect allergen related repeat superfamily*. Powyższe wyniki torują drogę do dalszej szczegółowej analizy korelacji

między strukturą, a funkcją białek z wykorzystaniem danych otrzymanych w wyniku analiz toksyn i alergenów owadów z rzędu *Hymenoptera* w oparciu o spektrometrię mas.

Pomimo długiej listy 269 zidentyfikowanych związków, w ramach niniejszych badań nie udało się zidentyfikować wszystkich białek obserwowanych w badaniach jadu prowadzonych przez innych naukowców [90]. Różnice te mogą wynikać z wykorzystania różnych metod przygotowania próbki [91] do badań oraz zastosowania różnych metod LC-MS. Lepsza rozdzielczość spektrometru FT-ICR-MS wykorzystanego w badaniach prowadzonych przez zespół Van Vaerenbergh'a [90] w porównaniu do ESI-qTOF-MS oraz MALDI-TOF/TOF-MS (odpowiednio 2-3 i 5-10 razy wyższa) zwiększa bowiem możliwości identyfikacyjne peptydów wymywanych z kolumny chromatograficznej w tym samym czasie. Rozbieżności w otrzymywanych wynikach mogą być także spowodowane odmiennymi metodami pozyskiwania próbek jadu [86] oraz zmiennością sezonową tych próbek [92].

Połączenie technik jonizacji MALDI i ESI, zaowocowało identyfikacją licznych białek, co nie było możliwe do osiągnięcia za pomocą jednej techniki analitycznej. Podkreśla to komplementarność wybranych metod. W odniesieniu do danych literaturowych, zastosowana strategia doprowadziła do identyfikacji białek i peptydów obecnych w jadzie pszczelim nie obserwowanych wcześniej przy pomocy technik LC-MS [61, 93, 94]. Nowo odkryte białka mogą pełnić rolę nie tylko związków o właściwościach toksycznych i alergicznych, ale także jako substancje o potencjalnym działaniu farmakologicznym. Mimo, że większość wykrytych białek pozbawionych jest toksycznego działania i obecne są one w jadzie w ilościach śladowych, powinny być one brane pod uwagę w pełnej charakterystyce złożonej odpowiedzi organizmu na użądlenie przez pszczołę miodną.

### **3.5. Zastosowanie strategii analityczno-bioinformatyczno-klinicznej w badaniach odpowiedzi organizmu na jad pszczele na poziomie proteomicznym i metabolomicznym**

#### **3.5.1. Badania wpływu jadu pszczelego na aktywność CYP1A2 w warunkach *in vitro***

Użądlenia przez owady z rzędu *Hymenoptera* stanowią poważny problem w praktyce alergologicznej. Pomimo wielu badań prowadzonych w dziedzinie alergologii i toksykologii, mechanizm odpowiedzi organizmu na użądlenie przez pszczołę miodną wciąż nie jest w pełni wyjaśniony. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa wiadomo, że istnieją wzajemne interakcje pomiędzy użądleniem przez pszczołę a przyjmowanymi lekami. Cytochromy P450 stanowią rodzinę enzymów występującą powszechnie we wszystkich organizmach żywych, zarówno u prokariotów, jak i eukariotów, w tym u człowieka. Białka te są zaangażowane w biotransformację około 90% wszystkich środków farmaceutycznych, zarówno tych stosowanych u ludzi, jak i u zwierząt [95-98]. Najważniejszymi izoenzymami uczestniczącymi w metabolizmie leków są CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A4. Nie tylko substancje lecznicze powodują zmianę aktywności CYP450, ale także niektóre toksyny zawarte m.in. w dymie tytoniowym czy jadzie rozgwiazdy z gatunku *Acanthaster planci* (korona cierniowa), a także składniki pokarmowe [95, 99-101].

Różnice w ciężkości reakcji na użądlenie przez pszczołę mogą zatem wynikać nie tylko z różnic międzypersonalnych i występowania czynników ryzyka takich jak podeszły wiek czy choroby układu sercowo-naczyniowego, ale mogą być ponadto związane ze stosowaną farmakoterapią. Wykorzystanie jadu pszczelego w leczeniu różnych schorzeń oraz immunoterapii stwarza konieczność przebadania tego surowca pod kątem wpływu na enzymy metabolizujące leki, by zapobiec występowaniu groźnych dla zdrowia pacjenta interakcji.

Celem badań było określenie wpływu jadu pszczelego oraz jego głównego składnika – melittyny - na aktywność enzymu CYP1A2 w warunkach *in vitro*. W wyniku wpływu jadu pszczelego na aktywność enzymów metabolizujących leki może dojść do zmniejszenia skuteczności stosowanej farmakoterapii lub nasilenia działań niepożądanych stosowanych leków. Inhibicja lub indukcja CYP1A2 przez jad pszczeli może stanowić wskazanie do zastąpienia leków metabolizowanych przez ten enzym innymi o podobnym działaniu lub może spowodować konieczność monitorowania stężenia danego leku we krwi pacjenta podczas immunoterapii oraz podczas stosowania preparatów zawierających jad pszczeli.

Do badań inhibicji wykorzystano zestaw CYP1A2/CEC High Throughput Inhibitor Screening Kit (BD Biosciences). Do badań wykorzystano 20 próbek jadu pszczelego pochodzących z różnych lat i z różnych źródeł. Metoda oparta była na pomiarze fluorescencji produktu reakcji enzymatycznej (3-cyjano-7-hydroksykumaryna) powstałego w wyniku działania cytochromu CYP1A2 na substrat (3-cyjano-7-etoksykumaryna) w obecności inhibitora w różnych stężeniach (jad pszczeli, melittyna). Jako wzorcowy inhibitor wykorzystano furafylinę. Na podstawie otrzymanych wyników obliczana była wartość IC<sub>50</sub>, równa stężeniu inhibitora powodującego zahamowanie aktywności cytochromu P450 w 50%. Wartości IC<sub>50</sub> dla różnych próbek jadu pszczelego względem CYP1A2 różniły się, przyjmując wartości z zakresu od 0,13 µg/ml do 2,38 µg/ml (średnia=0,74 µg/ml). Rząd wielkości wartość IC<sub>50</sub> dla próbek jadu pszczelego był porównywalny do otrzymanej wartości IC<sub>50</sub> dla furafyliny, która wynosiła 1,53 µg/ml. Dowodzi to silnych właściwości inhibitorowych jadu pszczelego względem CYP1A2. W przypadku melittyny wykazano, że wartość IC<sub>50</sub> wynosi 41,04 µg/ml. Otrzymane wyniki wskazują na to, że melittyna stosunkowo słabo w porównaniu do jadu pszczelego hamuje aktywność CYP1A2. Można zatem przypuszczać, że za inhibicję cytochromu CYP1A2 w przypadku jadu pszczelego odpowiadają inne jego składniki. W związku z tym, że wartości IC<sub>50</sub> dla różnych próbek jadu pszczelego wykazują stosunkowo dużą zmienność należy podejrzewać, że jest ona spowodowana różnicami w składzie badanych próbek jadu pszczelego. Dostępna literatura oraz badania własne dowodzą, że skład jadu pszczelego może się zmieniać w zależności od wieku pszczoły, linii pszczoł, miesiąca oraz roku pozyskiwania próbek [21].

Podczas użądlenia przez pszczołę miodną do organizmu ofiary zostaje wprowadzone od 50-150 µg jadu [102, 103]. Z kolei w trakcie immunoterapii mającej na celu odczulenie pacjenta z alergią na jad pszczeli podawane są różne dawki początkowe (0,001-0,1 µg jadu) oraz podtrzymujące (100-200 µg jadu) w zależności od rodzaju terapii [104-108]. Uwzględniając, że wartości IC<sub>50</sub> badanych próbek jadu mieszczą się w granicach od 0,13 µg/ml do 2,38 µg/ml należy wnioskować, iż ilości jadu wprowadzone do organizmu wynoszące od kilkudziesięciu do kilkuset µg mogą hamować CYP1A2.

Otrzymane wyniki powinny zwrócić uwagę na problem możliwych interakcji pomiędzy składnikami jadu pszczelego a prowadzoną terapią. W przypadku inhibicji

enzymów CYP450 szczególną uwagę należy zwrócić na leki o wąskim indeksie terapeutycznym, takie jak teofilina [109]. W związku z zahamowaniem CYP1A2 przez jad pszczele, może dojść do nasilenia działań niepożądanych w trakcie terapii teofiliną lub innymi lekami metabolizowanymi przez ten izoenzym. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa wiadomo, że u pacjentów poddawanych immunoterapii zaleca się odstawienie leków z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny oraz  $\beta$ -blokerów, ponieważ przyjmowanie tych leków zwiększa ryzyko ciężkiej reakcji anafilaktycznej po użądleniu przez pszczołę [110-112]. Jednakże lista substancji mogących potencjalnie interferować z jadem pszczelim może obejmować także leki z innych grup. Uzyskane dane powinny stanowić podstawę do dalszych badań mających na celu pełne wyjaśnienie mechanizmu hamowania CYP1A2 przez jad pszczele. Ponadto należy zbadać wpływ tego surowca na inne izoenzymy z rodziny CYP450, co zwiększy bezpieczeństwo i skuteczność stosowanej farmakoterapii.

### **3.5.2. Badania wpływu użądlenia przez pszczołę miodną (*Apis mellifera*) na profil wolnych aminokwasów w surowicy ludzkiej**

Wyniki prowadzonych badań metabolomicznych przyczyniają się do poszerzania wiedzy na temat złożonej reakcji organizmu na patofizjologiczne bodźce, co z kolei może przyczynić się do opracowania nowych strategii diagnostycznych [113, 114]. Dotychczas przeprowadzone badania sugerują, że aminokwasy (AA) mogą hamować reakcję pomiędzy przeciwciałami IgE, a alergenami [115]. Zatem oznaczanie profili aminokwasów w płynach ustrojowych stanowi potencjalne mało inwazyjne narzędzie diagnostyczne chorób alergicznych [116].

Aminokwasy są głównymi składnikami peptydów, białek i fosfolipidów. Mogą również pełnić funkcję prekursorów (amin biogennych, glukozy, hemu), neuroprzekaźników oraz donorów grupy aminowej. Wiadomo także, że zmiany w dostępności AA mają poważny wpływ na procesy komórkowe takie jak: sygnalizacja komórkowa, ekspresja genów oraz transport aminokwasów [117]. Profile wolnych AA zależne są od zmian metabolicznych, które odzwierciedlają fizjologiczny bądź patofizjologiczny stan organizmu [118]. Wykazano, że na ich stężenie w surowicy mogą mieć wpływ różne stany chorobowe, m. in. niewydolność wątroby [119, 120], choroby nowotworowe [121-125], cukrzyca [126] oraz choroby układu pokarmowego [127]. Zmiany w profilach wolnych AA mogą odnosić się nie tylko do zwiększenia lub zmniejszenia stężenia pojedynczych związków w płynach ustrojowych, ale również mogą dotyczyć ich całych grup (AA rozgałęzione lub aromatyczne).

Profilowanie metabolitów obecnych w surowicy krwi za pomocą metod spektrometrii mas stało się w ostatnich latach obiecującym narzędziem umożliwiającym badanie złożonych zmian na poziomie metabolomicznym [128]. Może przyczynić się to do zrozumienia reakcji organizmu na użądlenie przez pszczołę i pozwolić na uzyskanie dodatkowych informacji w diagnostyce alergii na jady owadów błonkoskrzydłych (*Hymenoptera*). Dlatego celem kolejnego etapu badań była ocena wpływu użądlenia na profil wolnych aminokwasów w ludzkiej surowicy. Próbkę surowicy przeznaczone do badań pobrano od 27 ochotników pszczelarzy w ciągu 3 godzin od użądlenia przez pszczołę (grupa badana). Grupę kontrolną stanowiło 27 próbek surowicy pobranych od pszczelarzy, po upływie co najmniej 6 tygodni



od ostatniego użądlenia. Oznaczanie stężenia wolnych aminokwasów w badanych próbkach surowicy przeprowadzono z użyciem metodologii aTRAQ® (AB Sciex) [128] przy wykorzystaniu spektrometru mas typu potrójny kwadropol - 4000 QTRAP (AB Sciex) sprzężony z wysokosprawnym chromatografem cieczowym 1260 Infinity (Agilent Technologies). Dzięki wykorzystaniu trybu MRM (ang. multiple reaction monitoring, monitorowanie reakcji wielokrotnych), który zapewnia wysoką czułość i specyficzność detekcji, możliwa była ilościowa analiza 42 aminokwasów (zarówno proteinogennych, jak i nieproteinogennych) bez konieczności pełnego rozdziału chromatograficznego wszystkich oznaczanych związków. Do zalet metody należy wysoka specyficzność, krótki czas analizy w porównaniu do innych technik analizy aminokwasów, mała objętość próbki biologicznej wymagana do wykonania oznaczeń, duża ilość analitów oznaczana w jednym cyklu analitycznym oraz niska granica wykrywalności. W celu uwiarygodnienia otrzymanych danych zoptymalizowana metoda LC-ESI-QqQ MS została poddana walidacji. Wszystkie parametry walidacyjne (granica wykrywalności, granica oznaczalności, liniowość i zakres metody, precyzja, dokładność) potwierdziły, że zastosowana metodyka odpowiada wymogom dla wyników badań próbek biologicznych z wykorzystaniem technik LC-MS.

Do przeprowadzenia wstępnych analiz statystycznych wykorzystano pakiet statystyczny Statistica. Zaawansowane analizy chemometryczne przeprowadzono w oparciu o program MetaboAnalyst 2,0 ([www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca)) [129] oraz program ROCCT ([www.roccet.ca](http://www.roccet.ca)) [130]. Analizę jednoczynnikową (testy t-studenta) wykorzystano do sprawdzenia statystycznie istotnych różnic pomiędzy stężeniami badanych AA w surowicy krwi osób użądlnych i grupy kontrolnej. Do wyznaczenia czynników różnicujących jak i klasyfikacji badanych grup pszczelarzy wykorzystano analizę SAM (ang. significance analysis of microarray, analiza istotności mikromacierzy) oraz analizę PLS-DA (ang. partial-least squares discriminant analysis, analiza dyskryminacyjna z metodą cząstkową najmniejszych kwadratów). W celu zmniejszenia systematycznych różnic pomiędzy danymi oraz zwiększenia wydajności analiz statystycznych ocena bioinformatyczna wyników została poprzedzona normalizacją oraz transformacją surowych danych. Testy t-studenta wykazały statystycznie istotne różnice pomiędzy analizowanymi grupami użądlnych i nie użądlnych dla kwasu glutaminowego ( $p < 0,001$ ), glutaminy ( $p < 0,001$ ), 3-metylohistydyny ( $p = 0,022$ ) i metioniny ( $p = 0,024$ ). Analizy SAM oraz PLS-DA również potwierdziły wyraźny podział pomiędzy grupą pszczelarzy bezpośrednio po użądleniu, a grupą kontrolną. Ponadto wykazano, że na rozdział powyższych grup największy wpływ mają kwas glutaminowy, glutamina, 3-metylohistydyna oraz metionina, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi za pomocą analizy jednoczynnikowej. W celu określenia wartości granicznych dla najbardziej różnicujących aminokwasów zbudowano krzywe ROC (Receiver Operating Characteristic) na podstawie których stwierdzono, że stężenie glutaminy na poziomie  $396,0 \mu\text{M/l}$  pozwala odróżnić dwie analizowane grupy ze specyficznością i czułością 90%, pole powierzchni pod krzywą,  $\text{AUC} = 0,912$ .

Kwas glutaminowy jest neuroprzekaźnikiem o działaniu pobudzającym [131, 132]. Pełni on również bardzo ważną rolę w procesach energetycznych wchodząc w cykl Krebsa oraz biosyntezę kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (neurotransmitera hamującego w mózgu). Wysokie stężenia kwasu glutaminowego stwierdzane są w bólach głowy i innych chorobach neurologicznych [133, 134]. Podwyższony poziom tego kwasu w surowicy pszczelarzy

bezpośrednio po użądleniu przez pszczołę jest prawdopodobnie związany z reakcją stresową organizmu oraz stymulacją układu nerwowego. Z drugiej strony obniżony poziom glutaminy bezpośrednio po użądleniu można wyjaśnić tym, iż kwas glutaminowy może być syntetyzowany za pośrednictwem glutaminazy z glutaminy przy jednoczesnym wytwarzaniu amoniaku. Ponadto spadek stężenia glutaminy można tłumaczyć upośledzeniem zdolności buforowania organizmu spowodowanym toksycznym działaniem jadu pszczelego. Wiadomo bowiem, że glutamina jest aminokwasem posiadającym właściwości buforujące oraz bierze ona udział w transporcie azotu [135]. W rezultacie prowadzi to do procesu detoksykacji, ponieważ azot pochodzący z metabolizowanych aminokwasów jest włączany do cyklu mocznikowego w komórkach wątroby. W związku z powyższym spadek stężenia glutaminy w surowicy krwi bezpośrednio po użądleniu przez pszczołę sugeruje jej możliwy udział w usuwaniu skutków toksycznego działania jadu wprowadzonego do krwioobiegu.

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie złożonej strategii analityczno-bioinformatyczno-klinicznej opartej na najnowszych metodach spektrometrii mas umożliwia poszerzenie wiedzy na temat odpowiedzi organizmu na użądlenie przez pszczołę na poziomie metabolomicznym. Przedstawione podejście pozwalające na oznaczanie 42 aminokwasów w surowicy krwi oraz chemometryczną ocenę otrzymanych danych rzuca nowe światło na podstawy metaboliczne reakcji na użądlenia przez owady błonkoskrzydłe.

### **3.5.3. Badania wpływu użądlenia przez pszczołę miodną (*Apis mellifera*) na profil peptydomiczny w surowicy ludzkiej**

Opracowanie precyzyjnego i dokładnego algorytmu postępowania w diagnostyce alergii na jady owadów z rzędu *Hymenoptera* stanowi poważny problem w praktyce alergologicznej [136]. Oznaczanie stężenia przeciwciał IgE oraz testy skórne są obecnie rutynowo stosowanymi badaniami wykorzystywanymi w ocenie odpowiedzi organizmu na użądlenie [137-140]. Jednakże testy te nie pozwalają na postawienie jednoznacznej diagnozy z uwagi na ich niską specyficzność. W związku z tym wciąż trwają prace mające na celu pełne wyjaśnienie mechanizmów reakcji na toksyczne i alergenne składniki jadu. Do tej pory nie było prowadzonych proteomicznych lub peptydomicznych badań w tym zakresie.

Wykorzystanie osiągnięć proteomiki stanowi jedno z najbardziej obiecujących podejść w analizie potencjalnych biomarkerów. Poszukiwanie charakterystycznych wskaźników zarówno fizjologicznego jak i patofizjologicznego stanu organizmu związanego z chorobami alergicznymi takimi jak astma oraz przewlekła obturacyjna choroba płuc może doprowadzić do wprowadzenia dokładnych i specyficznych metod diagnostycznych, a także umożliwić mało inwazyjne monitorowanie przebiegu choroby [141, 142]. Proteomika kliniczna wyróżnia dwa podejścia w poszukiwaniu biomarkerów. W strategii klasycznej w pierwszym etapie badań dokonuje się rozdziału białek z wykorzystaniem dwukierunkowej elektroforezy żelowej. Następnie za pomocą tandemowej spektrometrii mas identyfikowane są pojedyncze białka różnicujące, mogące pełnić rolę potencjalnych biomarkerów [143]. Drugie podejście proteomiki klinicznej, opiera się na uzyskiwaniu z próbek biologicznych widm całościowych, czyli profili peptydowych lub białkowych z wykorzystaniem metody MALDI (ang. matrix assisted laser desorption ionization, jonizacja przez desorpcję laserową wspomaganą matrycą)

lub SELDI (ang. surface enhanced laser desorption ionization, jonizacja przez powierzchniowo wzmocnioną desorpcję laserową). Taka analiza nie skupia się na identyfikacji pojedynczego, konkretnego związku, ale na całościowej analizie próbki i charakteryzuje się wyższą specyficnością [144]. Jednakże złożoność materiału biologicznego, w tym również próbek surowicy, jest dużym wyzwaniem w badaniach proteomicznych. Albuminy, immunoglobuliny, apolipoproteiny oraz kilkanaście innych rodzajów białek stanowią razem około 95% wszystkich związków białkowych surowicy. Związki te nie mają znaczenia diagnostycznego i stanowią balast w badaniach mających na celu poszukiwanie biomarkerów [145]. Problem ten może być częściowo rozwiązany poprzez zastosowanie różnych metod deplecji, które umożliwiają usunięcie z analizowanej matrycy związków obecnych w dużych stężeniach przy jednoczesnym zagęszczeniu związków znajdujących się w ilościach śladowych [80, 146].

Celem badań było określenie profili peptydowych próbek surowicy pochodzących od osób bezpośrednio po uządleniu i nieuządlonych. Grupa 27 próbek od uządlonych ochotników była zbierana w ciągu trzech godzin od uządlenia przez pszczołę. Grupę kontrolną stanowiły próbki od tych samych osób zbierane po minimum 6 tygodniach od ostatniego uządlenia. Profile peptydowe badane były z użyciem spektrometru mas MALDI-TOF/TOF-MS, UltrafleXtreme (Bruker Daltonics) w zakresie mas od 1 do 10 kDa. Deplecję przeprowadzono za pomocą kulek magnetycznych wykorzystujących mechanizm wymiany jonowej oraz końcówek do mikropipet ZipTip i OMIX opartych o ekstrakcję do fazy stałej z wykorzystaniem złoża C18. Do klasyfikacji próbek oraz do wyznaczenia optymalnego modelu dyskryminacyjnego wykorzystano program chemometryczny ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonics). Użyto 3 algorytmów: szybkiego klasyfikatora (ang. quick classifier, QC), algorytmu genetycznego (ang. genetic algorithm, GA), nadzorowanych sieci neuronowych (ang. supervised neural network, SNN) oraz krzywą ROC (ang. receiver operating characteristic). Dla powyższych algorytmów wyznaczono walidację krzyżową oraz zdolność rozpoznawania, natomiast dla krzywej ROC pole powierzchni pod krzywą AUC (ang. area under the curve). Zastosowanie szybkiego klasyfikatora będącego jednoczynnikowym algorytmem klasyfikacyjnym pozwoliło na otrzymanie wysokich wartości walidacji krzyżowej oraz zdolności rozpoznawania dla wszystkich trzech strategii wzbogacania próbek. W przypadku oczyszczania próbek za pomocą technologii OMIX było to odpowiednio 94,81% oraz 94,64%. Również wieloczynnikowe analizy (GA i SNN) umożliwiły rozróżnienie dwóch badanych grup próbek z wysoką trafnością prognostyczną (walidacja krzyżowa > 97%, zdolność rozpoznawania = 100% dla próbek oczyszczanych z użyciem strategii OMIX). Wcześniej przeprowadzone badania wykazały, że widma MS otrzymane po oczyszczaniu próbek za pomocą strategii ZipTip charakteryzują się wyższym stosunkiem sygnału do szumu w porównaniu do widm otrzymanych po wzbogacaniu próbek za pomocą kulek magnetycznych [147]. Wykazano także, że jakość widm MS otrzymanych po oczyszczaniu próbek z wykorzystaniem końcówek do mikropipet ZipTip i OMIX opartych o ekstrakcję do fazy stałej jest porównywalna, co potwierdza niniejsze wyniki. Zastosowanie krzywych ROC do klasyfikacji próbek oraz wyznaczania czynników różnicujących umożliwiło wytypowanie 10 peptydów dających AUC = 1, co umożliwiło najlepszą możliwą predykcję z czułością i specyficnością na poziomie 100% (wartości m/z =

1277,60 Da; 1436,01 Da; 5656,11 Da; 6432,84 Da; 6472,15 Da; 6528,35 Da; 6631,08 Da; 6432,89 Da; 6631,19 Da i 6632,70 Da). Dla próbek przygotowanych z użyciem kulek magnetycznych klasyfikatorem o najlepszej wartości dyskryminacyjnej był peptyd o masie 2120,29 Da (AUC = 0,97), a użycie technologii ZipTip pozwoliło na uzyskanie AUC = 0,9 dla peptydu o masie = 1277,49 Da.

Od pierwszego doniesienia w 2002 dotyczącego wykorzystania SELDI w diagnostyce raka [148], ukazało się wiele publikacji potwierdzających możliwość potencjalnego wykorzystania metod MALDI i SELDI w badaniach różnych chorób [149-152]. Jednocześnie krytykowano powyższe metody za niską odtwarzalność wyników pomiędzy laboratoriami. Natomiast niniejsze analizy wykazały, że metoda MALDI-TOF-MS jest odpowiednim narzędziem służącym do badania odpowiedzi organizmu na jad pszczele. Wszystkie użyte modele statystyczne pozwoliły na rozróżnienie dwóch analizowanych grup z wysokim poziomem istotności, co potwierdza wpływ użądlenia przez pszczołę na profil peptydomiczny ludzkiej surowicy. Dlatego badania profili peptydowych w oparciu o spektrometrię mas poprzedzone odpowiednim przygotowaniem próbek do badań oraz wsparte zaawansowaną analizą chemometryczną umożliwiają zrozumienie reakcji organizmu na fizjologiczne lub patofizjologiczne bodźce na poziomie proteomicznym lub peptydomicznym.

### 3.6. Podsumowanie

Nadrzędnym celem przeprowadzonych badań było opracowanie nowatorskiego modelu analizy jadu pszczelego z wykorzystaniem technik łączonych wspartych zaawansowaną analizą chemometryczną. Przedstawiona złożona strategia analityczno-bioinformatyczno-kliniczna oparta na najnowszych osiągnięciach w dziedzinie spektrometrii mas oraz nowoczesnych metodach rozdzielczych może dać podstawy do wdrożenia unikalnych badań umożliwiających pełną charakterystykę proteomiczno-metabolomiczną złożonych matryc pochodzenia naturalnego. Dowiedziono, że nowo opracowane metody rozdziału i analizy głównych składników jadu pszczelego z użyciem wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej bardzo dobrze nadają się do standaryzacji surowca [A2] oraz badania jego właściwości biologicznych, w tym aktywności hialuronidazy [A3]. Zaproponowana w niniejszych badaniach wielopłaszczyznowa strategia objęła optymalizację i opracowanie nowatorskich metod proteomicznej charakterystyki jadu pszczelego w oparciu o techniki spektrometrii mas z jonizacją MALDI i ESI [A1, A5, A8]. Przeprowadzone badania wykazały, że nowo opracowane i zoptymalizowane metody oparte na najnowszych technikach LC-MALDI-TOF/TOF-MS oraz LC-ESI-QTOF-MS pozwalają na uzyskanie komplementarnych danych proteomicznych [A8]. Dowiedziono, że analiza z zastosowaniem innowacyjnych metod LC-MS poprzedzona odpowiednim oczyszczaniem i zagęszczaniem próbek pozwala na stwierdzenie obecności maskowanych wcześniej peptydów i białek oraz identyfikację nowych niescharakteryzowanych związków jadu pszczelego o potencjalnych właściwościach biologicznych (w tym nowych związków o działaniu toksycznym i alergennym). Dokładne poznanie składu jadów owadów z rzędu *Hymenoptera* może przyczynić się do poprawy diagnostyki i leczenia alergii na drodze immunoterapii. Immunoterapia prowadzona jest z wykorzystaniem jadu owada, którego użądlenie wywołało reakcję anafilaktyczną. Jednakże w niektórych przypadkach trudne jest stwierdzenie owada –

sprawcy uządlenia, gdyż pacjenci nie są w stanie w sposób jednoznaczny określić jego gatunek. Obecnie stosowane metody diagnostyczne wykorzystujące oznaczanie swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko całemu jadowi nie pozwalają na różnicowanie reakcji krzyżowych i podwójnego uczulenia [136]. Z kolei diagnostyka oparta na komponentach alergenowych daje możliwości trafnego rozpoznania alergii na konkretny jad owada [153]. Zatem warunkiem rozwoju takich narzędzi diagnostycznych jest pełne poznanie proteomu jadu pszczelego oraz pełna charakterystyka wszystkich jego alergenów.

Zaprezentowany model badawczy zakładał również analizę reakcji organizmu na jad pszczeli zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Wykazano, że jad pszczeli oraz jego główny składnik – melittyna, hamują izoenzym cytochromu P450, CYP1A2 [A6]. Uzyskane wyniki zwracają uwagę na możliwość wystąpienia interakcji pomiędzy jadem pszczelim oraz jego składnikami, a stosowanymi lekami metabolizowanymi przez powyższy enzym. Z kolei rezultaty pionierskich analiz chemometrycznych danych proteomicznych [A7] i metabolomicznych [A4] otrzymanych w wyniku badań próbek surowicy krwi (pobranej od uządlnych przez pszczoły pacjentów i od pacjentów z grupy kontrolnej), przyczyniają się do poszerzenia wiedzy odnośnie patomechanizmów towarzyszących odpowiedzi organizmu na uządlenie. Wiedza ta uzupełniona o dane kliniczne pozwoli na przyspieszenie rozwoju prac mających na celu poszukiwanie biomarkerów alergii na jad owadów błonkoskrzydłych, co w konsekwencji może doprowadzić do postępów w dziedzinie diagnostyki medycznej. Zaprezentowane badania wpisują się w nowoczesny nurt wenomiki, która jest dziedziną biologii molekularnej wykorzystującą narzędzia proteomiczne do określania składu i właściwości jadów. Paradoksalnie pomimo tego, że ukąszenie przez pszczołę może wywołać natychmiastową reakcję toksyczną lub alergiczną, jad może być również źródłem związków o potencjalnych korzystnych właściwościach biologicznych. W związku z tym przedstawione wielopłaszczyznowe badania tego surowca dają dalsze możliwości w opracowywaniu nie tylko szczepionek przeciwalergicznych ale także preparatów o właściwościach terapeutycznych.

## Piśmiennictwo

- [1] Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*. 2000;405:827-36.
- [2] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
- [3] Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-51.
- [4] Bączek T, Kaliszan R. Proteomika a techniki separacyjne. *Farm Pol*. 2001;57:923=5.
- [5] Figeys D. Proteomics approaches in drug discovery. *Analytical chemistry*. 2002;74:412A-9A.
- [6] Klupczyńska A, Dereziński P, Kokot ZJ. Metabolomics in medical sciences - trends, challenges and perspectives. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2015;72:629-41.
- [7] Long FH. Multivariate Analysis for Metabolomics and Proteomics Data. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*. 2013:299-311.
- [8] Matysiak J, Matysiak J, Kokot ZJ. Jad pszczeli - cenne źródło związków biologicznie czynnych. *Farm Pol*. 2012;68:164-70.

- [9] de Graaf DC, Aerts M, Danneels E, Devreese B. Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J Proteomics*. 2009;72:145-54.
- [10] Mikami T, Aoki M, Kimura T. The application of mass spectrometry to proteomics and metabolomics in biomarker discovery and drug development. *Current molecular pharmacology*. 2012;5:301-16.
- [11] Zhao YY, Lin RC. UPLC-MS(E) application in disease biomarker discovery: the discoveries in proteomics to metabolomics. *Chemico-biological interactions*. 2014;215:7-16.
- [12] Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, Kim KH, Song HS, et al. Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum*. 2004;50:3504-15.
- [13] Kwon YB, Ham TW, Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Han HJ, et al. Water soluble fraction (<10 kDa) from bee venom reduces visceral pain behavior through spinal alpha 2-adrenergic activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;80:181-7.
- [14] Kim HW, Kwon YB, Ham TW, Roh DH, Yoon SY, Lee HJ, et al. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J Vet Med Sci*. 2003;65:349-55.
- [15] Russell PJ, Hewish D, Carter T, Sterling-Levis K, Ow K, Hattarki M, et al. Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: in vitro and in vivo studies. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53:411-21.
- [16] Matysiak J, Matysiak J, Kokot ZJ. Właściwości farmakologiczne jadu pszczelego. *Nowiny Lekarskie*. 2008;77:453-8.
- [17] Kokot ZJ, Matysiak J, Kłós J, Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Application of Principal Component Analysis for evaluation of chemical and antimicrobial properties of honey bee (*Apis mellifera*) venom. *J Apicult Res*. 2009;48:168-75.
- [18] Leluk J, Schmidt J, Jones D. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. *Toxicon*. 1989;27:105-14.
- [19] Schumacher MJ, Schmidt JO, Egen NB, Dillon KA. Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90:59-65.
- [20] Palma MS, Brochetto-Braga MR. Biochemical variability between venoms from different honey-bee (*Apis mellifera*) races. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1993;106:423-7.
- [21] Zhou JH, Zhao J, Zhang SX, Shen JZ, Qi YT, Xue XF, et al. Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2010;404:171-8.
- [22] Szokan G, Harvath J, Almas M, Saftics G, Palocz A. Liquid chromatographic analysis and separation of polypeptide components from honey bee venoms. *J Liq Chromatogr*. 1994;17 (16):3333-49.
- [23] Kokot ZJ, Matysiak J. Simultaneous Determination of Major Constituents of Honeybee Venom by LC-DAD. *Chromatographia*. 2009;69:1401-5.
- [24] Pacakova V, Stulik K, Hau P, Jelinek J, Vins I, Sykora D. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for determination of some bee venom components. *J Chromatogr A*. 1995;700:187-93.
- [25] Pacakova V, Stulik K. Validation of a method for determination of phospholipase A2 and melittin in bee venom preparations by capillary electrophoresis. *J AOAC Int*. 2000;83:549-54.
- [26] Pattanaargson S, Roboz J. Determination of hyaluronidase activity in venoms using capillary electrophoresis. *Toxicon*. 1996;34:1107-17.
- [27] Stern R, Jedrzejak MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical reviews*. 2006;106:818-39.

- [28] Matysiak J, Klupczyńska A, Kokot ZJ. Znaczenie hialuronidaz we współczesnej medycynie. *Nowiny Lekarskie*. 2013;82:156-62.
- [29] Magalhaes MR, da Silva NJ, Ulhoa CJ. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization. *Toxicon*. 2008;51:1060-7.
- [30] Morey SS, Kiran KM, Gadag JR. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon*. 2006;47:188-95.
- [31] Pukrittayakamee S, Warrell DA, Desakorn V, McMichael AJ, White NJ, Bunnag D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon*. 1988;26:629-37.
- [32] Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FC, Furtado Mde F, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*. 2008;52:842-51.
- [33] Vercruyssen KP, Lauwers AR, Demeester JM. Absolute and empirical determination of the enzymatic activity and kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using viscosimetry. *The Biochemical journal*. 1995;306 ( Pt 1):153-60.
- [34] Muckenschnabel I, Bernhardt G, Spruss T, Dietl B, Buschauer A. Quantitation of hyaluronidases by the Morgan-Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer letters*. 1998;131:13-20.
- [35] Krupa JC, Marie Butler A, Mort JS. Quantitative bead assay for hyaluronidase and heparinase I. *Analytical biochemistry*. 2003;319:280-6.
- [36] Nakamura T, Majima M, Kubo K, Takagaki K, Tamura S, Endo M. Hyaluronidase Assay Using Fluorogenic Hyaluronate as a Substrate. *Analytical biochemistry*. 1990;191:21-4.
- [37] Zhang LS, Mummert ME. Development of a fluorescent substrate to measure hyaluronidase activity. *Analytical biochemistry*. 2008;379:80-5.
- [38] Delpech B, Bertrand P, Chauzy C. An Indirect Enzymoimmunological Assay for Hyaluronidase. *J Immunol Methods*. 1987;104:223-9.
- [39] Stern M, Stern R. An Elisa-Like Assay for Hyaluronidase and Hyaluronidase Inhibitors. *Matrix*. 1992;12:397-403.
- [40] Steiner B, Cruce D. A Zymographic Assay for Detection of Hyaluronidase Activity on Polyacrylamide Gels and Its Application to Enzymatic-Activity Found in Bacteria. *Analytical biochemistry*. 1992;200:405-10.
- [41] Ikegami-Kawai M, Takahashi T. Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity. *Analytical biochemistry*. 2002;311:157-65.
- [42] Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci*. 2007;80:1921-43.
- [43] Hofinger ESA, Bernhardt G, Buschauer A. Kinetics of Hyal-1 and PH-20 hyaluronidases: Comparison of minimal substrates and analysis of the transglycosylation reaction. *Glycobiology*. 2007;17:963-71.
- [44] Koketsu M, Linhardt RJ. Electrophoresis for the analysis of acidic oligosaccharides. *Analytical biochemistry*. 2000;283:136-45.
- [45] Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*. 2003;13:105r-15r.
- [46] Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*. 2005;100:114-7.
- [47] Xing L, Liping X, Rongqing Z, Dawei C, Lan S. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating the concentration of bee venom in rat plasma. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55:1359-63.
- [48] Pereira Santos MC, Pedro E, Spinola Santos A, Branco Ferreira M, Palma Carlos ML, Palma Carlos AG. Immunoblot studies in allergic patients to hymenoptera venom before and during immunotherapy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2005;37:273-8.

- [49] Wiese MD, Milne RW, Davies NW, Chataway TK, Brown SG, Heddle RJ. *Myrmecia pilosula* (Jack Jumper) ant venom: validation of a procedure to standardise an allergy vaccine. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46:58-65.
- [50] Follenius-Wund A, Mely Y, Gerard D. Spectroscopic evidence of two melittin molecules bound to Ca<sup>2+</sup>-calmodulin. *Biochem Int.* 1987;15:823-33.
- [51] Flach CR, Prendergast FG, Mendelsohn R. Infrared reflection-absorption of melittin interaction with phospholipid monolayers at the air/water interface. *Biophys J.* 1996;70:539-46.
- [52] Kaszycki P, Wasylewski Z. Fluorescence-quenching-resolved spectra of melittin in lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1040:337-45.
- [53] Steinmetz WE, Bianco TI, Zollinger M, Pesiri D. Characterization of the multiple forms of mast cell degranulating peptide by NMR spectroscopy. *Pept Res.* 1994;7:77-82.
- [54] Xu X, Nelson JW. Solution structure of tertiapin determined using nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Proteins.* 1993;17:124-37.
- [55] Bradrick TD, Freire E, Georghiou S. A high-sensitivity differential scanning calorimetric study of the interaction of melittin with dipalmitoylphosphatidylcholine fused unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1989;982:94-102.
- [56] Kokot ZJ, Matysiak J. Inductively coupled plasma mass spectrometry determination of metals in honeybee venom. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48:955-9.
- [57] Alomirah HF, Alli I, Konishi Y. Applications of mass spectrometry to food proteins and peptides. *J Chromatogr A.* 2000;893:1-21.
- [58] Baggerman G, Verleyen P, Clynen E, Huybrechts J, De Loof A, Schoofs L. Peptidomics. *J Chromatogr B.* 2004;803:3-16.
- [59] John H, Walden M, Schafer S, Genz S, Forssmann WG. Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2004;378:883-97.
- [60] Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:437-73.
- [61] Peiren N, de Graaf DC, Vanrobaeys F, Danneels EL, Devreese B, Van Beeumen J, et al. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon.* 2008;52:72-83.
- [62] Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf DC, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1752:1-5.
- [63] Schmelzer CE, Schops R, Ulbrich-Hofmann R, Neubert RH, Raith K. Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine beta-casein. *J Chromatogr A.* 2004;1055:87-92.
- [64] Tang K, Allman SL, Jones RB, Chen CH. Quantitative analysis of biopolymers by matrix-assisted laser desorption. *Anal Chem.* 1993;65:2164-66.
- [65] Ling YC, Lin L, Chen YT. Quantitative analysis of antibiotics by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1998;12:317-27.
- [66] Freour T, Com E, Barriere P, Bouchot O, Jean M, Masson D, et al. Comparative proteomic analysis coupled with conventional protein assay as a strategy to identify predictors of successful testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia. *Andrology-U.S.* 2013;1:414-20.
- [67] Moore KE, Carlson SM, Camp ND, Cheung P, James RG, Chua KF, et al. A General Molecular Affinity Strategy for Global Detection and Proteomic Analysis of Lysine Methylation. *Mol Cell.* 2013;50:444-56.



- [68] Rees MA, Smith AI, Coppel RL. A Proteomic Strategy to Compare Surface Expressed Proteins in Pathogenic and Benign Bacteria. *Respirology*. 2013;18:34-.
- [69] Wang XQ, Han F, Yang MF, Yang PF, Shen SH. Exploring the response of rice (*Oryza sativa*) leaf to gibberellins: a proteomic strategy. *Rice*. 2013;6.
- [70] Yu YY, Pan XW, Ding Y, Liu XH, Tang HL, Shen CP, et al. An iTRAQ based quantitative proteomic strategy to explore novel secreted proteins in metastatic hepatocellular carcinoma cell lines. *Analyst*. 2013;138:4505-11.
- [71] Wilkins MR, Appel RD, Williams KL, Hochstrasser DF. *Proteome Research. Concepts, Technology and Application*. 2 ed. Heidelberg: Springer; 2007.
- [72] Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2003;2:1096-103.
- [73] Zheng X, Baker H, Hancock WS. Analysis of the low molecular weight serum peptidome using ultrafiltration and a hybrid ion trap-Fourier transform mass spectrometer. *Journal of chromatography A*. 2006;1120:173-84.
- [74] Marshall J, Jankowski A, Furesz S, Kireeva I, Barker L, Dombrovsky M, et al. Human serum proteins pre-separated by electrophoresis or chromatography followed by tandem mass spectrometry. *Journal of proteome research*. 2004;3:364-82.
- [75] Baumann S, Ceglarek U, Fiedler GM, Lembcke J, Leichtle A, Thierry J. Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical chemistry*. 2005;51:973-80.
- [76] Hu L, Boos KS, Ye M, Wu R, Zou H. Selective on-line serum peptide extraction and multidimensional separation by coupling a restricted-access material-based capillary trap column with nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2009;1216:5377-84.
- [77] Koomen JM, Li D, Xiao LC, Liu TC, Coombes KR, Abbruzzese J, et al. Direct tandem mass spectrometry reveals limitations in protein profiling experiments for plasma biomarker discovery. *Journal of proteome research*. 2005;4:972-81.
- [78] Boschetti E, Righetti PG. The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species. *J Proteomics*. 2008;71:255-64.
- [79] Gobom J, Nordhoff E, Mirgorodskaya E, Ekman R, Roepstorff P. Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 1999;34:105-16.
- [80] Palmblad M, Vogel JS. Quantitation of binding, recovery and desalting efficiency of peptides and proteins in solid phase extraction micropipette tips. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2005;814:309-13.
- [81] Du J, Yang S, Lin X, Bu L, Nan Y, Huo S, et al. Use of anchorchip-time-of-flight spectrometry technology to screen tumor biomarker proteins in serum for small cell lung cancer. *Diagnostic pathology*. 2010;5:60.
- [82] Leung SM, Pitts RL. A novel approach using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and prestructured sample supports (AnchorChip Technology) for proteomic profiling and protein identification. *Methods in molecular biology*. 2008;441:57-70.
- [83] Zhang X, Rogowska-Wrzesinska A, Roepstorff P. On-target sample preparation of 4-sulfophenyl isothiocyanate-derivatized peptides using AnchorChip Targets. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2008;43:346-59.
- [84] Zhang X, Shi L, Shu S, Wang Y, Zhao K, Xu N, et al. An improved method of sample preparation on AnchorChip targets for MALDI-MS and MS/MS and its application in the liver proteome project. *Proteomics*. 2007;7:2340-9.

- [85] Zenobi R, Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 1998;17:337-66.
- [86] Li R, Zhang L, Fang Y, Han B, Lu X, Zhou T, et al. Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (*Apis mellifera*) venom collected from electrical stimulation and manual extraction of the venom gland. *BMC genomics.* 2013;14:766.
- [87] Peiren N, de Graaf DC, Brunain M, Bridts CH, Ebo DG, Stevens WJ, et al. Molecular cloning and expression of icarapin, a novel IgE-binding bee venom protein. *FEBS Lett.* 2006;580:4895-9.
- [88] Van Vaerenbergh M, Cardoen D, Formesyn EM, Brunain M, Van Driessche G, Blank S, et al. Extending the honey bee venom with the antimicrobial peptide apidaecin and a protein resembling wasp antigen 5. *Insect Mol Biol.* 2013;22:199-210.
- [89] Fang X, Zhang WW. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *J Proteomics.* 2008;71:284-303.
- [90] Van Vaerenbergh M, Debyser G, Devreese B, de Graaf DC. Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. *Journal of Proteomics.* 2014;99:169-78.
- [91] Van Vaerenbergh M, Debyser G, Smagghe G, Devreese B, de Graaf DC. Unraveling the venom proteome of the bumblebee (*Bombus terrestris*) by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FT-ICR MS. *Toxicon.* 2015;102:81-8.
- [92] Danneels EL, Van Vaerenbergh M, Debyser G, Devreese B, de Graaf DC. Honeybee Venom Proteome Profile of Queens and Winter Bees as Determined by a Mass Spectrometric Approach. *Toxins.* 2015;7:4468-83.
- [93] Francese S, Lambardi D, Mastrobuoni G, la Marca G, Moneti G, Turillazzi S. Detection of honeybee venom in envenomed tissues by direct MALDI MSI. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2009;20:112-23.
- [94] Baracchi D, Turillazzi S. Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS. *J Insect Physiol.* 2010;56:366-75.
- [95] Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current drug metabolism.* 2002;3:561-97.
- [96] Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A, Paxton JW. Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug metabolism reviews.* 2003;35:35-98.
- [97] Guengerich FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2008;21:70-83.
- [98] Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician.* 2007;76:391-6.
- [99] Guo LQ, Yamazoe Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25:129-36.
- [100] Faber MS, Jetter A, Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic & clinical pharmacology & toxicology.* 2005;97:125-34.
- [101] Aniya Y, Terukina R, Minamitake Y, Shiohira S. Effect of the spine venom from the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*, on drug-metabolizing enzyme in rat liver. *The Journal of toxicological sciences.* 1998;23:419-23.
- [102] Fitzgerald KT, Flood AA. Hymenoptera stings. *Clinical techniques in small animal practice.* 2006;21:194-204.
- [103] Cichočka-Jarosz E. BA. Uczulenie na jad pszczoły. *Pediatrics po dyplomie.* 2007;11:116-32.
- [104] Roll A, Hofbauer G, Ballmer-Weber BK, Schmid-Grendelmeier P. Safety of specific immunotherapy using a four-hour ultra-rush induction scheme in bee and wasp allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2006;16:79-85.

- [105] Gorska L, Chelminska M, Kuziemski K, Skrzypski M, Niedozytko M, Damps-Konstanska I, et al. Analysis of safety, risk factors and pretreatment methods during rush hymenoptera venom immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;147:241-5.
- [106] Rueff F, Wolf H, Schnitker J, Ring J, Przybilla B. Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy.* 2004;59:589-95.
- [107] Muller U, Helbling A, Berchtold E. Immunotherapy with Honeybee Venom and Yellow Jacket Venom Is Different Regarding Efficacy and Safety. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;89:529-35.
- [108] Bonifazi F, Jutel M, Bilo BM, Birnbaum J, Muller U, Hy EIGIV. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy.* 2005;60:1459-70.
- [109] Barnes PJ. Theophylline. *Am J Resp Crit Care.* 2013;188:901-6.
- [110] Muller UR, Haerberli G. Use of beta-blockers during immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:606-10.
- [111] Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of side effects during the buildup phase of venom immunotherapy for Hymenoptera venom allergy: The importance of baseline serum tryptase. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:105-11.
- [112] Stumpf JL, Shehab N, Patel AC. Safety of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with insect venom allergies. *Ann Pharmacother.* 2006;40:699-703.
- [113] Dang NA, Kuijper S, Walters E, Claassens M, van Soolingen D, Vivo-Truyols G, et al. Validation of biomarkers for distinguishing Mycobacterium tuberculosis from non-tuberculous mycobacteria using gas chromatography-mass spectrometry and chemometrics. *PLoS One.* 2013;8:e76263.
- [114] Austdal M, Skrastad RB, Gundersen AS, Austgulen R, Iversen AC, Bathen TF. Metabolomic biomarkers in serum and urine in women with preeclampsia. *PLoS One.* 2014;9:e91923.
- [115] Chung SY, Reed S. Effect of D-Amino Acids On IgE Binding to Peanut Allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:Ab20-Ab.
- [116] Saude EJ, Skappak CD, Regush S, Cook K, Ben-Zvi A, Becker A, et al. Metabolomic profiling of asthma: Diagnostic utility of urine nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:757-U408.
- [117] Massey KA, Blakeslee CH, Pitkow HS. A review of physiological and metabolic effects of essential amino acids. *Amino acids.* 1998;14:271-300.
- [118] Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, et al. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PLoS One.* 2011;6:e24143.
- [119] Dejong CH, van de Poll MC, Soeters PB, Jalan R, Olde Damink SW. Aromatic amino acid metabolism during liver failure. *The Journal of nutrition.* 2007;137:1579S-85S; discussion 97S-98S.
- [120] Campollo O, Sprengers D, McIntyre N. The BCAA/AAA ratio of plasma amino acids in three different groups of cirrhotics. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion.* 1992;44:513-8.
- [121] Lai HS, Lee JC, Lee PH, Wang ST, Chen WJ. Plasma free amino acid profile in cancer patients. *Semin Cancer Biol.* 2005;15:267-76.
- [122] Maeda J, Higashiyama M, Imaizumi A, Nakayama T, Yamamoto H, Daimon T, et al. Possibility of multivariate function composed of plasma amino acid profiles as a novel screening index for non-small cell lung cancer: a case control study. *BMC cancer.* 2010;10:690.

- [123] Cascino A, Muscaritoli M, Cangiano C, Conversano L, Laviano A, Ariemma S, et al. Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer. *Anticancer research*. 1995;15:507-10.
- [124] Leichtle AB, Nuoffer JM, Ceglarek U, Kase J, Conrad T, Witzigmann H, et al. Serum amino acid profiles and their alterations in colorectal cancer. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*. 2012;8:643-53.
- [125] Stabler S, Koyama T, Zhao Z, Martinez-Ferrer M, Allen RH, Luka Z, et al. Serum methionine metabolites are risk factors for metastatic prostate cancer progression. *PLoS One*. 2011;6:e22486.
- [126] Walford GA, Davis J, Warner AS, Ackerman RJ, Billings LK, Chamarthi B, et al. Branched chain and aromatic amino acids change acutely following two medical therapies for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental*. 2013.
- [127] Deng K, Lin S, Zhou L, Geng Q, Li Y, Xu M, et al. Three aromatic amino acids in gastric juice as potential biomarkers for gastric malignancies. *Analytica chimica acta*. 2011;694:100-7.
- [128] Held PK, White L, Pasquali M. Quantitative urine amino acid analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry and aTRAQ (R) reagents. *J Chromatogr B*. 2011;879:2695-703.
- [129] Xia J, Mandal R, Sinelnikov IV, Broadhurst D, Wishart DS. MetaboAnalyst 2.0--a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic acids research*. 2012;40:W127-33.
- [130] Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*. 2013;9:280-99.
- [131] Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3:748-55.
- [132] Weinberg RJ. Glutamate: an excitatory neurotransmitter in the mammalian CNS. *Brain research bulletin*. 1999;50:353-4.
- [133] D'Andrea G, Cananzi AR, Joseph R, Morra M, Zamberlan F, Ferro Milone F, et al. Platelet glycine, glutamate and aspartate in primary headache. *Cephalalgia : an international journal of headache*. 1991;11:197-200.
- [134] Gallai V, Alberti A, Gallai B, Coppola F, Floridi A, Sarchielli P. Glutamate and nitric oxide pathway in chronic daily headache: evidence from cerebrospinal fluid. *Cephalalgia : an international journal of headache*. 2003;23:166-74.
- [135] Lee WJ, Hawkins RA, Vina JR, Peterson DR. Glutamine transport by the blood-brain barrier: a possible mechanism for nitrogen removal. *Am J Physiol-Cell Ph*. 1998;274:C1101-C7.
- [136] Matysiak J, Matysiak J, Breborowicz A, Kokot ZJ. Diagnosis of hymenoptera venom allergy - with special emphasis on honeybee (*Apis mellifera*) venom allergy. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*. 2013;20:875-9.
- [137] Rueff F, Jappe U, Przybilla B. Standards and pitfalls of in-vitro diagnostics of Hymenoptera venom allergy. *Hautarzt*. 2010;61:938-45.
- [138] Rieger-Ziegler V, Rieger E, Kranke B, Aberer W. Hymenoptera venom allergy: time course of specific IgE concentrations during the first weeks after a sting. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;120:166-8.
- [139] Muller UR. New developments in the diagnosis and treatment of hymenoptera venom allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124:447-53.
- [140] Simons FE, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Golden DB, Finkelman FD, et al. Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:S2-24.

- [141] Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, et al. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:S9-23.
- [142] Taylor DR. Using biomarkers in the assessment of airways disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:927-34.
- [143] Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood.* 2004;103:3624-34.
- [144] Li LH, Tang H, Wu ZB, Gong JL, Gruidl M, Zou J, et al. Data mining techniques for cancer detection using serum proteomic profiling. *Artif Intell Med.* 2004;32:71-83.
- [145] Salplachta J, Rehulka P, Chmelik J. Identification of proteins by combination of size-exclusion chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and comparison of some desalting procedures for both intact proteins and their tryptic digests. *J Mass Spectrom.* 2004;39:1395-401.
- [146] Velstra B, van der Burgt YEM, Mertens BJ, Mesker WE, Deelder AM, Tollenaar RAEM. Improved classification of breast cancer peptide and protein profiles by combining two serum workup procedures. *J Cancer Res Clin.* 2012;138:1983-92.
- [147] Tiss A, Smith C, Camuzeaux S, Kabir M, Gayther S, Menon U, et al. Serum peptide profiling using MALDI mass spectrometry: avoiding the pitfalls of coated magnetic beads using well-established ZipTip technology. *Proteomics.* 2007;7 Suppl 1:77-89.
- [148] Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet.* 2002;359:572-7.
- [149] Xu WH, Hu Y, He XX, Li J, Pan T, Liu H, et al. Serum profiling by mass spectrometry combined with bioinformatics for the biomarkers discovery in diffuse large B-cell lymphoma. *Tumor Biol.* 2015;36:2193-9.
- [150] Wu SP, Lin YW, Lai HC, Chu TY, Kuo YL, Liu HS. SELDI-TOF MS profiling of plasma proteins in ovarian cancer. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology.* 2006;45:26-32.
- [151] Bruegel M, Planert M, Baumann S, Focke A, Bergh FT, Leichtle A, et al. Standardized peptidome profiling of human cerebrospinal fluid by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Proteomics.* 2009;72:608-15.
- [152] Cheng AJ, Chen LC, Chien KY, Chen YJ, Chang JT, Wang HM, et al. Oral cancer plasma tumor marker identified with bead-based affinity-fractionated proteomic technology. *Clinical chemistry.* 2005;51:2236-44.
- [153] Ebo DG, Van Vaerenbergh M, de Graaf DC, Bridts CH, De Clerck LS, Sabato V. In vitro diagnosis of Hymenoptera venom allergy and further development of component resolved diagnostics. *Expert review of clinical immunology.* 2014;10:375-84.

#### **4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

##### **4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora**

W 2000 roku rozpocząłem studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Już od drugiego roku studiów, rozpocząłem pracę w Studenckim Kole Naukowym przy Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej pod kierunkiem prof. dr hab. Zenona J. Kokota. W czerwcu 2006 roku uzyskałem tytuł magistra farmacji na podstawie pracy pt. "Spektroskopowe i chromatograficzne badania składu jadu pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w zależności

od warunków atmosferycznych. Wskazania do standaryzacji preparatu”, promotor: prof. dr hab. Zenon J. Kokot, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej. W kwietniu 2010 roku obroniłem pracę doktorską pt. „Bioanalityczne badania jadu pszczelego”. Badania finansowane były ze środków na naukę w latach 2008/2009 jako projekt badawczy nr 1807/B/P01/2008/35. W międzyczasie odbyłem 2 zagraniczne staże naukowe. Pierwszy z nich miał miejsce w Johnson&Johnson Pharmaceutical Research and Development, Department for Analytical Development, Beerse w Belgii. Drugi staż odbyłem w Martin-Luther-Universität, Institut für Pharmazie, Halle-Wittenberg w Niemczech.

#### **4.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora (niezwiązana z habilitacją)**

W ramach współpracy naukowej z Katedrą i Zakładem Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu biorę udział w badaniach określających chronofarmakokinetkę ksenobiotyków. Przykładowym lekiem jest propofol dla którego zoptymalizowałem metodę oznaczania w surowicy ludzi i zwierząt opartą na HPLC-FLD. Wyniki prowadzonych badań zostały opublikowane w postaci 4 prac oryginalnych, których jestem współautorem. Kolejna praca dotycząca tej tematyki jest po pozytywnych recenzjach.

Kolejnym nurtem badań związanych z monitorowaniem stężeń leków i ich metabolitów we krwi jest mój udział w analizie takrolimusu przy wykorzystaniu metody LC-MS. Badania prowadzone są w ramach realizowanego grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki: „Znaczenie czynników farmakogenetycznych w indywidualizacji terapii przy zastosowaniu leków immunosupresyjnych w przeszczepach nerek”, nr projektu: 2011/03/B/NZ7/06550, kierownik projektu: dr n. farm. Anna Bogacz, projekt realizowany w latach 2012-2015. Ponadto jestem wykonawcą grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki: „Proces dojrzewania organizmu, farmakogenetyka oraz metabolomika jako czynniki determinujące profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny alfa-agonistów w populacji pacjentów oddziału intensywnej terapii dziecięcej”, nr projektu: 2015/17/B/NZ7/03032, kierownik projektu: dr hab. n. farm. Paweł Wiczling, projekt realizowany od 24.07.2015 do 23.07.2018. W ramach niniejszego projektu jestem zaangażowany w badania stężenia deksmedetomidyny we krwi w oparciu o metodę LC-MS.

Biorę udział w proteomicznych i metabolomicznych badaniach płynów ustrojowych człowieka w oparciu o metody spektrometrii mas (surowica, osocze, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn łzowy) prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Badania mają na celu poszukiwanie biomarkerów wybranych chorób takich jak: rak prostaty, rak jajnika, rak płuca, cukrzyca kobiet ciężarnych. Pracuję także nad optymalizacją i wdrażaniem nowych metod oczyszczania i zagęszczania próbek biologicznych. Ponadto biorę udział w opracowywaniu innowacyjnych metod rozdzielania i analizy białek z wykorzystaniem technik łączonych w oparciu o spektrometrię mas. Jestem wykonawcą grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki: „Proteomiczno-metabolomiczna strategia poszukiwania biomarkerów chorób nowotworowych układu płciowego z wykorzystaniem metod

spektrometrii mas”, nr projektu: 2014/15/B/NZ7/00964, kierownik projektu: prof. dr hab. n. farm. Zenon J. Kokot, projekt realizowany w latach 2015-2018.

#### **4.3. Udział w projektach naukowych**

1. 2015/17/B/NZ7/03032 – „Proces dojrzewania organizmu, farmakogenetyka oraz metabolomika jako czynniki determinujące profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny alfa-agonistów w populacji pacjentów oddziału intensywnej terapii dziecięcej”. Grant NCN „OPUS” realizowany od 24.07.2015 do 23.07.2018. Kierownik: dr hab. n. farm. Paweł Wiczling
2. 2014/15/B/NZ7/00964 – „Proteomiczno-metabolomiczna strategia poszukiwania biomarkerów chorób nowotworowych układu płciowego z wykorzystaniem metod spektrometrii mas”. Grant NCN „OPUS” realizowany od 24.07.2015 do 23.07.2018. Kierownik: prof. dr hab. n. farm. Zenon J. Kokot, wykonawca: dr n. farm. Jan Matysiak
3. ID: 304242 – „Opracowanie testów diagnostycznych, prognostycznych i predykcyjnych płaskonabłonkowych raków krtani w oparciu o analizę epigenetyczną, proteomiczną i metabolomiczną”. Grant NCBiR „STRATEGMED” złożony dnia 17.09.2015. Lider projektu: Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. W trakcie recenzji.
4. 502-14-03307415-08973 - „Zastosowanie metod deplecji w proteomicznej analizie jadu pszczelego”, uczelniany projekt realizowany w latach 2013-2015. Kierownik: dr n. farm. Jan Matysiak
5. 2012/05/B/NZ7/02535 – „Proteomiczna analiza markerów wystąpienia alergii na jad owadów błonkoskrzydłych (Hymenoptera)”. Grant NCN realizowany od 15.02.2013 do 14.02.2016. Kierownik: prof. dr hab. Zenon J. Kokot, główny wykonawca: dr n. farm. Jan Matysiak
6. 2011/03/B/NZ7/06550 – „Znaczenie czynników farmakogenetycznych w indywidualizacji terapii przy zastosowaniu leków immunosupresyjnych w przeszczepach nerek”. Grant NCN realizowany w latach 2012-2015. Kierownik: dr n. farm. Anna Bogacz
7. 502-14-03307415-08973 - „Oznaczanie aktywności enzymatycznej jadu pszczelego”, uczelniany projekt realizowany w latach 2011-2012. Kierownik: dr n. farm. Jan Matysiak
8. NN405 674640 – „Fizykochemiczne, proteomiczne i biochemiczne badania jadu pszczelego”. Grant własny MNiSW realizowany od 17.05.2011 do 16.05.2014. Kierownik: prof. dr hab. Zenon J. Kokot, główny wykonawca: dr n. farm. Jan Matysiak
9. NN405180735 - „Bioanalityczne badania jadu pszczelego”, grant promotorski MNiSW realizowany od 16.10.2008 do 26.04.2010. Kierownik: prof. dr hab. Zenon J. Kokot, główny wykonawca: dr n. farm. Jan Matysiak
10. 501-01-03307415-08973 - „Spektroskopowe, chromatograficzne i mikrobiologiczne badania jadu pszczelego”, uczelniany projekt realizowany w

latach 2008-2009. Kierownik: prof. dr hab. Zenon J. Kokot, główny wykonawca: mgr Jan Matysiak

#### 4.4. Odbyte staże i szkolenia

- Bruker Daltonics, Brema Niemcy. Szkolenie: MALDI Basic Operator Training Course „Proteomics”- using UltrafleXtreme (11.11.2013 – 14.11.2013)
- Bruker Daltonics, Brema Niemcy. Szkolenie: MALDI Supplementary Operator Training Course ClinProTools (03.12.2013)
- Bruker Daltonics, Brema Niemcy. Szkolenie: MALDI-TOF Advanced Operator Training Course „LC-MALDI” (04.12.2013 – 06.12.2013)
- StatSoft Polska, Kraków. Kurs z zakresu statystyki „Analizy wielowymiarowe” (28.10.2010 – 29.10.2010)
- StatSoft Polska, Kraków. Kurs z zakresu statystyki „Analiza wariancji” (25.10.2010 – 26.10.2010)
- StatSoft Polska, Kraków. Kurs z zakresu statystyki „STATISTICA kurs podstawowy” (27.09.2010 – 28.09.2010)
- Martin-Luther-Universität, Institut für Pharmazie, Halle-Wittenberg, Niemcy. Staż: zastosowanie spektrometrii mas MALDI-TOF oraz ESI-Q-TOF w bioanalizie (03.11.2008 – 21.11.2008)
- Johnson&Johnson Pharmaceutical Research and Development, Department for Analytical Development, Beerse, Belgia. Staż: opracowywanie metod badań wielkości cząstek proszków i zawiesin innowacyjnych leków metodą dyfrakcji laserowej (01.07.2004 – 30.09.2004)

#### 5. Działalność dydaktyczna

- I rok kierunku farmacja – autorski fakultet przygotowany wraz z prof. dr. hab. Zenonem J. Kokotem: „Chemia w życiu codziennym (80 godzin)
- II rok kierunku farmacja – autorski fakultet opracowany i prowadzony przeze mnie: „Produkty pszczele – działanie i zastosowanie w leczeniu” (90 godzin)
- IV rok kierunku farmacja – autorski fakultet przygotowany wraz z prof. dr. hab. Zenonem J. Kokotem i współpracownikami z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej: „Proteomika i metabolomika” (20 godzin)
- I rok kierunku farmacja – program anglojęzyczny (Pharm D). General & Inorganic Chemistry. SeminaRIA – 5 godzin, ćwiczenia – 36 godzin.
- Kierownik/opiekun 9 prac magisterskich na kierunku farmacja oraz 1 na kierunku Pharm D (program anglojęzyczny)
- Od roku akademickiego 2014/2015 – opiekun Studenckiego Koła Naukowego Proteomiki i Metabolomiki



## 6. Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda zespołowa J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za cykl publikacji naukowych w roku akademickim 2011/2012.
- Nagroda zespołowa J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za cykl publikacji naukowych dotyczących bioanalitycznych badań jadu pszczelego (2010).
- Tytuł honorowy: *AMICUS STUDENTIUM*, przyznany przez Radę Uczelnianą Samorządu Studenckiego w imieniu studentów Wydziału Farmaceutycznego UMiKM w Poznaniu za wyjątkowe zaangażowanie w proces dydaktyczny i przychylny stosunek do młodzieży akademickiej (2010).
- Medal J.M. Rektora Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za zasługi w rozwój studenckiego ruchu naukowego, aktywną pracę społeczną i organizacyjną oraz bardzo dobre wyniki w nauce (2006).
- Wyróżnienie Zarządu Studenckiego Towarzystwa Naukowego, Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (2006).
- Wyróżnienie w XLI Konkursie Prac Magisterskich Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (2006).

## 7. Recenzje prac naukowych

Do chwili obecnej sporządziłem 14 recenzji na rzecz następujących czasopism naukowych: Journal of Proteome Research (1), Metabolomics (1), Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis (8), Toxins (1), Arabian Journal of Chemistry (1), Chromatographia (1), Medical News (1).

## 8. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego

Jestem promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej mgr Agaty Światły pt. "Wybrane strategie proteomiczne w poszukiwaniu wskaźników chorób nowotworowych układu płciowego.". Promotor: prof. dr hab. Zenon J. Kokot. Przewód doktorski wszczęto decyzją Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu nr 89 z dnia 09.03.2016 r.

