

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko

Barbara Bojko

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

lipiec 2001 dyplom magistra diagnostyki laboratoryjnej uzyskany na podstawie pracy „Parametry gospodarki żelazowej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego”, Wydział Farmacji z Oddziałem Diagnostyki Medycznej, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach (obecnie Śląski Uniwersytet Medyczny)

kwiecień 2005 stopień doktora nauk farmaceutycznych w specjalizacji biochemia farmaceutyczna uzyskany na podstawie rozprawy „Kompetycyjne wiązanie leków z albuminami surowicy krwi w terapii przeciwnowotworowej”, Wydział Farmacji z Oddziałem Diagnostyki Medycznej, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach (obecnie Śląski Uniwersytet Medyczny)

3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- wrzesień 2001 – czerwiec 2005: asystent w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (d. Śląska Akademia Medyczna)
- lipiec 2005 – grudzień 2011: adiunkt w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (d. Śląska Akademia Medyczna)
- sierpień 2009 – sierpień 2011: staż podoktorancki (Postdoctoral Fellow) w Department of Chemistry, University of Waterloo, Kanada
- od sierpień 2011: staż podoktorancki (Research Associate) w Department of Chemistry, University of Waterloo, Kanada
- od kwiecień 2013: adiunkt w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

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

Wprowadzenie do mojego udziału w projektach prezentowanych w publikacjach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego

W sierpniu 2009 roku dołączyłam do grupy profesora Janusza Pawliszyna na University of Waterloo w celu odbycia stażu podoktoranckiego. W skład grupy wchodzi głównie chemicy analitycy pracujący nad podstawowymi aspektami technologii wynalezionej przez prof. Pawliszyna – mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Naukowcy będący w tej grupie opracowują nowe fazy ekstrakcyjne, metody kalibracyjne oraz wdrażają aplikacje technologii do różnych dziedzin badawczych: analizy środowiskowej, analizy żywności i, ostatnio, bioanalizy. Wśród moich obowiązków wynikających z przyjętej oferty pracy było rozszerzenie badań nad medycznymi aplikacjami SPME, nawiązanie współpracy z lekarzami i wdrożenie SPME do badań klinicznych w celu weryfikacji przydatności technologii w praktyce. Moje doświadczenie zawodowe zdobyte w Śląskim Uniwersytecie Medycznym, zaczynając od studiów na Oddziale Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego, poprzez przygotowanie pracy magisterskiej w Katedrze i Oddziale Chorób Wewnętrznych Szpitala Specjalistycznego Św. Barbary w Sosnowcu, skończywszy na pracy w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej uwieńczony obroną pracy doktorskiej pozwolił mi przyjąć propozycję pracy w Kanadzie. Z czasem nawiązałam długoterminową i efektywną współpracę z grupami anestezjologów, chirurgów ogólnych i torakochirurgów w Toronto General Hospital oraz stworzyć i nadzorować w obrębie grupy prof. Pawliszyna podgrupę doktorantów i doktorów przebywających na stażu podoktoranckim zajmujących się pracą nad projektami farmaceutycznymi i medycznymi. W przeciągu ostatnich czterech lat część z tych projektów została ukończona, a wyniki opublikowane w czasopiśmie o tematyce analitycznej i medycznej.

Przedstawiony do oceny w postępowaniu habilitacyjnym jest cykl publikacji składający się z **18** prac naukowych opublikowanych w latach 2011-2013, o łącznym wskaźniku Impact Factor równym **61.358** i punktacji MNiSW równej **465** dotyczący "Wykorzystania mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) do analizy farmakologicznej i metabolomicznej w badaniach preklinicznych i klinicznych"

A-1. **Bojko B.**, Vuckovic D., Cudjoe E., Hoque M.E., Mirnaghi F., Wąsowicz M., Jerath A.,

Pawliszyn J. (2011) Determination of tranexamic acid concentration by solid phase microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. First step to *in vivo* on-site analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879:3781-7.

Wskaźnik Impact Factor: 2.888; Punktacja MNiSW: 35

A-2. **Bojko B.**, Cudjoe E., Wąsowicz M., Pawliszyn J. (2011) Solid-phase microextraction. How far are we from clinical practice? *Trends in Analytical Chemistry* 30:1505-1512.

Wskaźnik Impact Factor: 6.273; Punktacja MNiSW: 50

A-3. **Bojko B.**, Mirnaghi F., Pawliszyn J. (2011) Solid-phase microextraction: A multi-purpose microtechnique. *Bioanalysis* 3: 1895-1899.

Wskaźnik Impact Factor: : 3.223; Punktacja MNiSW: 20

A-4. **Bojko B.**, Vuckovic D., Mirnaghi F., Cudjoe E., Wąsowicz M., Jerath A., Pawliszyn J. (2012) Therapeutic monitoring of tranexamic acid concentration by automated thin film microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry in patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *Therapeutic Drug Monitoring* 34:31-37.

Wskaźnik Impact Factor: 2.234; Punktacja MNiSW: 30

A-5. Wąsowicz M., Jerath A., **Bojko B.**, Sharma V., Pawliszyn J., McCluskey S., (2012) Use of a novel technique, solid phase microextraction, to measure tranexamic acid in patients undergoing cardiac surgery. *Canadian Journal of Anaesthesia* 59:14-20.

Wskaźnik Impact Factor: 2.127; Punktacja MNiSW: 25

A-6. Sharma V, Fan J., Jerath A., Pang K.S., **Bojko B.**, Pawliszyn J., Karski J.M., Yau T., McCluskey S., Wasowicz M. (2012) Pharmacokinetics of tranexamic acid in patients undergoing cardiac surgery with use of cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia* 67:1242-1250.

Wskaźnik Impact Factor: 3.486; Punktacja MNiSW: 30

A-7. **Bojko B.**, Vuckovic D., Pawliszyn J. (2012) Comparison of solid phase microextraction versus spectroscopic techniques for binding studies of carbamazepine. *Journal of*

Pharmaceutical and Biomededical Analysis 66:91-9.

Wskaźnik Impact Factor: 2.947; Punktacja MNiSW: 30

A-8. Cudjoe E., **Bojko B.**, Togunde P., Pawliszyn J. (2012) *In vivo* solid-phase microextraction for tissue bioanalysis. *Bioanalysis* 4: 2605-2619.

Wskaźnik Impact Factor: : 3.253; Punktacja MNiSW: 20

A-9. **Bojko B.**, Pawliszyn J. (2012) The benefits of using solid-phase microextraction as a greener sample preparation technique. *Bioanalysis* 4:1263-1265.

Wskaźnik Impact Factor: : 3.253; Punktacja MNiSW: 20

A-10. **Bojko B.**, Cudjoe E., Gómez-Ríos G.A., Gorynski K., Jiang R., Reyes-Garcés N., Risticovic S., Silva É.A., Togunde O., Vuckovic D., Pawliszyn J. (2012) SPME-quo vadis? *Analytica Chimica Acta* 750:132-151.

Wskaźnik Impact Factor: : 4.387; Punktacja MNiSW: 40

A-11. Bessonneau V*, **Bojko B***, Pawliszyn J. (2013) Analysis of human saliva metabolome by Direct Immersion Solid Phase Microextraction, liquid chromatography, and bench top orbitrap mass spectrometer (DI-SPME-LC-MS). *Bioanalysis* 5: 783-792.

*autorzy zadeklarowali jednakowy wkład w opublikowaną pracę

Wskaźnik Impact Factor: 3.253; Punktacja MNiSW: 20

A-12. **Bojko B.**, Wąsowicz M., Pawliszyn J. (2013) Metabolic profiling of plasma from cardiac surgical patients concurrently administered with tranexamic acid. DI-SPME-LC-MS analysis. *Journal of Pharmaceutical Analysis* (w druku, DOI 10.1016/j.jpha.2013.03.002).

Wskaźnik Impact Factor: : -; Punktacja MNiSW: -

A-13. Hossain Z.S.M, **Bojko B.**, Pawliszyn J. (2013) Automated SPME-GC/MS Monitoring of Headspace Metabolomic Responses of E. coli to Biologically Active Components Extracted by the Coating. *Analytica Chimica Acta* 776: 41-49.

Wskaźnik Impact Factor: 4.387; Punktacja MNiSW: 40

A-14. **Bojko B.**, Pawliszyn J. (2013) SPME goes mainstram. *The Analytical Scientist* 0113:1-9

Wskaźnik Impact Factor: -; Punktacja MNiSW: -

A-15. **Bojko B.**, Pawliszyn J. (2013) Solid phase microextraction for *in vivo* pharmacokinetics and other stages of drug development *Advances in Chromatography* 51: 127–192, ed. Eli Grushka and Nelu Grinberg. CRC Press, Print ISBN: 978-1-4665-6965-2, eBook ISBN: 978-1-4665-6966-9, DOI: 10.1201/b15308-4.

Wskaźnik Impact Factor: 1.526 ; Punktacja MNiSW: 20

A-16. **Bojko B** (2013) Modern analytical chemistry in clinics. *Modern chemistry and applications (w druku, DOI: 10.4172/2329-6798.1000e115)*

Wskaźnik Impact Factor: -; Punktacja MNiSW: -

A-17. Cudjoe E., **Bojko B.**, de Lannoy I., Saldivia V., Pawliszyn J. (2013) Solid Phase Microextraction: Complementary *in vivo* sampling tool to microdialysis. *Angewandte Chemie International Edition (w druku, DOI: 10.1002/anie.201304538)*

Wskaźnik Impact Factor: 13.734; Punktacja MNiSW: 45

A-18. **Bojko B.**, Gorynski K., Gomez-Rios G., Knaak M.J., Machuca T., Spetzler V.N. Cudjoe E., Hsin M., Cypel M., Selzner M., Liu M., Keshjavee S., Pawliszyn J. (2013) Solid Phase Microextraction fills the gap in tissue sampling protocols. *Analytica Chimica Acta (w druku, DOI: 10.1016/j.aca.2013.08.031)*

Wskaźnik Impact Factor: 4.387; Punktacja MNiSW: 40

Przedstawione osiągnięcie stanowi cykl badań składający się z dwóch głównych wątków badawczych:

1. Zastosowania SPME w badaniach farmakologicznych ze szczególnym uwzględnieniem:
 - a. badania interakcji białko-lek;
 - b. monitorowania stężenia terapeutycznego leków i farmakokinetyki;
2. Zastosowania SPME w badaniach metabolicznych/profilowaniu metabolicznym
 - a. *in vivo*
 - b. *ex vivo*

Pośród prezentowanych artykułów znajduje się dziesięć prac doświadczalnych (łączny wskaźnik IF 39.443), cztery prace przeglądowe (łączny wskaźnik IF 15.439) oraz cztery prace redakcyjne napisane w odpowiedzi na zaproszenie redakcji (łączny wskaźnik IF 6.476). Trzynastie spośród przedstawionych prac jest mojego pierwszego autorstwa (łączny wskaźnik IF 34.371).

4.1. Wstęp

Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) jest stosunkowo nową metodą analityczną łączącą pobieranie próbek, jej preparatykę, hamowanie metabolizmu i ekstrakcję związków w jednym kroku. SPME jest techniką równowagową, gdzie niewielka objętość sorbentu oddziałuje z wolną frakcją związku, dlatego jedynie niewielka część analitów zostaje usunięta z układu będącego przedmiotem badań.¹ Ilość wyekstrahowanego związku zależy od współczynnika dystrybucji danego związku pomiędzy dwie fazy: ekstrakcyjną i próbkę w przypadku gdy równowaga w układzie została osiągnięta, lub od szybkości przepływu masy jeżeli zastosowano krótki czas ekstrakcji. Wymienione cechy SPME czynią metodę dogodną do tzw. analiz typu „on-site” czyli przeprowadzanych w miejscu poboru materiału. Dostępność wielu rodzajów kalibracji dostosowanych zarówno do ekstrakcji w warunkach równowagowych jak i przed osiągnięciem stanu równowagi umożliwia otrzymanie w pełni ilościowych i powtarzalnych wyników. Po wynalezieniu SPME było głównie wykorzystywane do badań związków lotnych, a najbardziej korzystnymi i powszechnymi były sprzężenia SPME z chromatografami gazowymi (gas chromatography, GC) i spektrometrami masowymi (mass spectrometer, MS) lub detektorami płomieniowo-jonizacyjnym (flame ionization detector, FID). Z czasem zastosowania SPME rozszerzyły się na analizę związków średnio- i nielotnych, a popularność zaczęło zdobywać wykorzystywanie chromatografów ciekłych (liquid chromatography, LC). Obecnie, SPME jest technologia powszechnie stosowaną w badaniach środowiskowych oraz analizie żywności.^{A-2,A-3,A-10} Badania ostatnich lat wskazują, że SPME może być również bardzo obiecującą techniką w bioanalizie.^{A-3} Rozwój biokompatybilnych faz ekstrakcyjnych umożliwia ekstrakcje bezpośrednio ze skomplikowanych macierzy biologicznych. Największą zaletą stosowania włókien SPME jest mała inwazyjność podczas badań *in vivo*. Wykorzystanie *in vivo* SPME w badaniach farmakokinetycznych zostało dotychczas zademonstrowane na modelach zwierzęcych u psów, szczurów i myszy.^{2,3,4,5,A-2,A-15}

¹ J. Pawliszyn, Handbook of Solid Phase Microextraction, Chemical Industry Press, Beijing, 2009

² H. Lord, R. Grant, M. Walles, B. Incedon B. Fahie J. Pawliszyn, Anal. Chem. 75 (2003) 5103

³ F. M. Musteata, M.L. Musteata, J. Pawliszyn, Clin Chem. 52 (2006) 708

⁴ F.M. Musteata, I. de Lannoy, B. Gien, J. Pawliszyn, J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008) 907

Przeprowadzone doświadczenia wykazały że zaproponowana metoda SPME, która nie wymaga poboru krwi do oznaczeń stężenia leków, pozwala na zredukowanie liczby zwierząt potrzebnych do otrzymania wszystkich parametrów farmakokinetycznych dzięki możliwości wielokrotnego wykorzystania tego samego osobnika. Dodatkowo, wykorzystanie tego samego zwierzęcia umożliwia uniknąć różnic osobniczych, a w konsekwencji uzyskać lepszą jakość wyników.^{5,A-15} Zastosowanie *in vivo* SPME zostało rozszerzone na badania tkanek miękkich. U ryb przeprowadzono analizę mięśni w celu monitorowania obecności farmaceutyków jako zanieczyszczeń wody.^{6,7,A-8} U szczurów natomiast przeprowadzono badania poziomu toluenu w mózgu po ekspozycji na ten związek.^{8,9,A-8} Jednakże pomimo wielu zalet SPME nie zostało dotychczas wprowadzone do codziennej praktyki klinicznej. Większość udokumentowanych prac w tej dziedzinie przedstawia oznaczenie stężenia leku zrobione z wykorzystaniem włókien przygotowanych w laboratoriach,^{A-2,A-15} co z jednej strony dowodzi zainteresowania naukowców technologią, z drugiej zaś jasną potrzebę komercyjnie dostępnego produktu. Różnorodność sorbentów, które były już stosowane jako fazy ekstrakcyjne w SPME oraz tych, które w dalszym ciągu są w fazie badań pozwala na prowadzenie analiz zarówno celowanych, skupionych na konkretnym związku, lub niecelowanych (nieselektywnych), w których dąży się do ekstrakcji jak największej liczby związków, jednakże znacząca większość opublikowanych aplikacji dotyczy badań celowanych. Przykłady ilościowych oznaczeń leków zwykle pokazują efektywność danej metody na próbkach przygotowanych przez nastrzyknięcie macierzy biologicznej niezawierającej analizowanego leku, lub – rzadziej – analizę kilku próbek pobranych od pacjentów/ochotników przyjmujących dany środek farmakologiczny (tzw. „real samples”). Główną przyczyną takiego stanu rzeczy jest najprawdopodobniej pracochłonne i niełatwe przygotowanie włókien w laboratorium oraz brak zautomatyzowanych systemów do preparatyki próbek metodą SPME przygotowanych do analizy chromatografem ciekowym. Stosunkowo niedawno, dostępność takiego systemu do preparatyki w tzw. trybie off-line otworzyła nowe możliwości użytkownikom SPME. Różnorodność geometrii urządzeń SPME oraz składu chemicznego faz ekstrakcyjnych dają unikatową szansę użycia tej technologii do wielu odmiennych aplikacji klinicznych i preklinicznych, a także dostosowania protokołu SPME odpowiednio do potrzeb konkretnego

⁵ D. Vuckovic, R. Shirey, Y. Chen, L. Sidisky, C. Aurand, K. Stenerson, J. Pawliszyn, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 175

⁶ X. Zhang, K.D. Oakes, S. Cui, L. Bragg, M.R. Servos, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 3417

⁷ O.P. Togunde, K.D. Oakes, M.R. Servos, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 5302

⁸ D. Nakajima, M. Kakeyam, H. Fujimaki, S. Goto, *Neurotoxicology*. 27 (2006) 615

⁹ T.T. Win-Shwe, D. Mitsushima, D. Nakajima, S. Ahmed, S. Yamamoto, S. Tsukahara, M. Kakeyama, S. Goto, H. Fujimaki, *Toxicol. Lett.* 168 (2007) 75

badania. Podsumowanie dotychczasowego użycia technologii w bioanalizie, wyzwań związanych z użyciem SPME w tego typu badaniach oraz ocena plusów i minusów metody zostały przedstawione w A-2 i A-15.

4.2. Zastosowanie mikroekstrakcji do fazy stałej do analizy leków

4.2.1. Zastosowanie SPME do badania oddziaływań lek-białko^{A-7,A-15}

Prowadzenie badań nad wiązaniem w układzie ligand-białko przy zastosowaniu SPME jest możliwe, gdyż technika ta pozwala na uzyskanie informacji zarówno o stężeniu całkowitym związku jak i frakcji wolnej, co zostało już opisane w literaturze.^{10,11,12} Jednakże rezultaty badań otrzymywanych metodą SPME były zwykle porównywane z wynikami takich technik jak dializa równowagowa lub chromatografia czołowa, gdzie obliczenia oparte są na stężeniu leku, podobnie jak w przypadku SPME. Takie podejście stosowane było w celu walidacji dokładności SPME jako nowej metody proponowanej do badania wiązania leków.

Tematyka projektów badań związanych z pracą doktorską oraz projektami prowadzonymi po uzyskaniu stopnia doktora skupiała się na konkurencji o wiązanie z białkami osocza pomiędzy kilkoma lekami oraz pomiędzy lekami a substancjami endogennymi. Technikami, których używałam podczas moich badań była spektroskopia fluorescencyjna, różnicowa spektroskopia UV oraz magnetyczny rezonans jądrowy (NMR). Zdobyte doświadczenie pozwoliło mi wykorzystać dwie z wymienionych technik spektroskopowych, spektroskopię fluorescencyjną i NMR, do analizy wiązania karbamazepiny z białkami osocza i skonfrontowania danych uzyskanych metodą SPME-LC-UV i SPME-LC-MS/MS z wynikami pomiarów fluorescencyjnych i NMR. Głównym celem przedstawianego projektu było wskazanie słabych i silnych stron wszystkich trzech technik w tym konkretnym rodzaju badań.

Badania prowadzone były z wykorzystaniem albuminy surowicy ludzkiej jako modelowego białka osocza oraz pełnego osocza ludzkiego. W pierwszej części projektu znaleziono jedno miejsce wiązania wysokiego powinowactwa dla karbamazepiny zarówno metoda fluorescencji jak i SPME. Ponadto, wyniki SPME wykazały istnienie jednego miejsca o niższym powinowactwie w zakresie stężeń stosowanych do badań fluorescencyjnych, a także kooperatywność pomiędzy miejscami wiązania leku. Również analizy SPME przeprowadzone równoległe z pomiarami ¹H NMR, które nie dowiodły formowania kompleksu, pozwoliły na

¹⁰ F.M. Musteata, J. Pawliszyn, J. Proteome Res. 4 (2005) 789

¹¹ D. Vuckovic, J. Pawliszyn, J. Pharm. Biomed Anal. 50 (2009) 550

¹² F.M. Musteata, J. Pawliszyn, M.G. Qian, J.T. Wu, G.T. Miwa, J. Pharm. Sci. 95 (2006) 1712

obserwację dwóch miejsc oddziaływania niskiego powinowactwa.

Badania do których użyto osocza pokazały możliwość bezpośredniego określania wiązania leków *in vitro* przy pomocy SPME-LC-MS/MS oraz oceny różnic osobniczych dotyczących stężenia frakcji wolnej karbamazepiny w zakresie stężeń terapeutycznych. Opisane analizy z wykorzystaniem osocza nie były możliwe do przeprowadzenia żadną z dwóch technik spektroskopowych stosowanych w pierwszej części projektu ze względu na niską czułość obu technik.

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że równoczesne wdrożenie technik o fundamentalnie różnych podstawach tj. spektroskopia fluorescencyjna, NMR oraz SPME-LC-UV i SPME-LC-MS/MS pozwalają uzyskać komplementarne informacje o badanym kompleksie oraz dogłębniej scharakteryzować różne aspekty wiązania leku, co może być przydatne na różnych etapach badań nad nowym lekiem.

4.2.2. Zastosowanie SPME do terapeutycznego monitorowania leku i badań farmakokinetycznych

A-1,A-4,A-5,A-6,A-15

Wyniki eksperymentów przeprowadzanych *in vivo* na zwierzętach z wykorzystaniem SPME wskazały potencjał metody w takich aplikacjach jak monitorowanie leku na oddziałach intensywnej terapii lub sali operacyjnej, zwłaszcza w sytuacjach gdzie powtarzanie poboru krwi jest przeciwwskazane. Chociaż badania *in vivo* na ludziach z wykorzystaniem SPME nie są jeszcze dopuszczalne ze względu na restrykcyjne uregulowania etyczno-prawne, jednakże częścią projektu przeprowadzonego wspólnie z anestezjologami z Toronto General Hospital było opracowanie metody SPME do oznaczania kwasu traneksemowego (tranexamic acid, TA) przy użyciu komercyjnie dostępnych włókien C18 w celu zademonstrowania przydatności technologii SPME opartej właśnie na włóknach do terapeutycznego monitorowania leków. Wybór leku był podyktowany wcześniejszymi badaniami klinicznymi nad kwasem traneksemowym przeprowadzanymi przez naszych współpracowników z TGH. W skrócie, TA jest lekiem antyfibrynolitycznym powszechnie stosowanym podczas operacji z użyciem sztucznego płuco-serca (cardiopulmonary bypass, CPB). Pomimo, że stężenie terapeutyczne leku jest znane, jednak sposób dawkowania u w/w grupy pacjentów jest oparty o matematyczne symulacje i nie został potwierdzony eksperymentalnie. Dlatego klinicznym założeniem projektu było zweryfikowanie danych otrzymanych eksperymentalnie z modelem matematycznym. Aby wypełnić postawione cele opracowano dwa analityczne protokoły oparte o ekstrakcję SPME. Pierwszy wykorzystywał

komercyjnie dostępne włókna C18 do ekstrakcji manualnej z założeniem ich potencjalnego wykorzystania w aplikacjach *in vivo* i „on site”. Podczas pracy nad drugim protokołem wzięto pod uwagę jedno z podstawowych wymagań laboratoriów szpitalnych oraz jednostek przeprowadzających badania kliniczne np. farmakokinetyczne lub nad wykrywaniem nowych biomarkerów – wysoką wydajność analiz. Obie metody zostały w pełni poddane walidacji wg wymagań Food and Drug Administration (FDA) dotyczących testów bioanalitycznych. Dodatkowo, wyniki SPME porównano z dwoma standardowymi protokołami przygotowania próbek biologicznych do badań: precypitacją białek osocza oraz ultrafiltracją. W obu przypadkach metody SPME spełniły wymagane kryteria, a wyniki SPME wykazały zgodność z rezultatami tradycyjnych analiz. Zautomatyzowana i wysokowydajna metoda SPME została następnie wykorzystana do analizy około 300 próbek uzyskanych od pacjentów, którzy przeszli operacje serca przy użyciu CPB. Preparatyka próbek w przeliczeniu na jedną próbkę trwała mniej niż 3 minuty, ponieważ badania odbywały się równocześnie na 96-ciu próbkach. Wyniki wykazały, że poziom TA był zmienny, gdy pacjent pozostawał podłączony do krążenia pozaustrojowego oraz po rozpoczęciu CPB i dyskontynuacji infuzji leku. Średnie stężenie TA podczas stosowania CPB wynosiło 134 mg/mL ze średnim odchyleniem standardowym 27%. Obserwowany zakres stężeń TA wynosił 70-188 mg/mL pokazując, że u poszczególnych pacjentów poziom leku może znacząco przewyższyć rekomendowane stężenie zaproponowane na podstawie modelu matematycznego (125 mg/mL).¹³

Otrzymane dane były również wykorzystane do przygotowania profilu farmakologicznego leku dla badanej grupy pacjentów przez naszych współpracowników z University of Toronto. Wyniki przeprowadzonych obliczeń były zgodne z wcześniejszymi ogólnymi obserwacjami i pokazały, że średnie stężenie podczas okresu śródoperacyjnego i w czasie pierwszych sześciu godzin po operacji było niezmiennie wyższe niż sugerowany próg wymagany do osiągnięcia 100% i 80% inhibicji aktywatora plazminogenu tkankowego. Zasugerowano również, że minimum efektywnej, lecz jeszcze bezpieczniejszej dawki kwasu traneksemowego u pacjentów poddanych operacji kardiologicznej wysokiego ryzyka powinno być dopracowane, zwłaszcza biorąc pod uwagę niedawne badania^{14,15} opisujące stosowanie wysokich dawek TA jako możliwą przyczynę drgawek pooperacyjnych.

¹³ N.P. Dowd, J.M. Karski, D.C. Cheng, J.A. Carroll, Y. Lin, R.L. James, J. Butterworth, *Anesthesiology*. 97 (2002) 390

¹⁴ J.M. Murkin, F. Falter, J. Granton, B. Young, C. Burt, M. Chu, *Anesth. Analg.* 110 (2010) 350

¹⁵ B.A. Orser, X. Chen, D. Wang, et al, *Anesthesiology* 2011, October 15-19, 2011, Chicago, IL, American Society of Anesthesiologists Abstract Website, abstract LB14

4.3. Zastosowanie SPME w metabolomice/profilowaniu metabolicznym i wykrywaniu biomarkerów

4.3.1. Badania *ex vivo* wykorzystaniem SPME

4.3.1.1. Analiza metabolomu osocza ludzkiego^{A-12}

Badanie zmian metabolomu osocza pacjentów poddanych operacji kardiologicznej przy użyciu sztucznego płuco-serca oraz równoczesnej podaży kwasu traneksemowego stanowiło ostatnią część opisanego powyżej projektu. W eksperymencie użyliśmy prototypów włókien typu mix-mode (MM) pozwalających na ekstrakcję metabolitów o szerokim spektrum właściwości fizykochemicznych, zwłaszcza polarności. Wpływ zastosowanego leczenia na profil metaboliczny pacjentów oceniony został na podstawie porównania próbek zyskanych przed rozpoczęciem operacji i podażą leków z próbkami zebranymi podczas operacji, gdy pacjenci zostali podłączeni do CPB i po podaniu TA. Statystyczna analiza wieloczynnikowa wykazała kilka związków o znaczącym wpływie na separację próbek pobranych we wspomnianych punktach czasowych na wykresie analizy głównych składowych (principal component analysis, PCA). Zgodnie z przewidywaniami, najbardziej znaczącym był kwas traneksemowy. Spośród zidentyfikowanych związków kilka klas należało do lipidów z których najliczniejszą grupę stanowiły glicerofosfolipidy. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi zmiany dotyczące lizofosfatydylocholin, podklasy glicerofosfolipidów, mogą być rezultatem albo samego stosowania CPB, albo mogą być wynikiem podaży TA; szczegółowe wyjaśnienie zachodzących procesów zostało opisane w A-12. Znacząco statystycznie zwiększony poziom 1-fosforanu sfingozyny (sphingosine 1-phosphate, S1P) i kwasu lizofosfatydylowego (LPL) został zaobserwowany w próbkach pobranych podczas operacji i po zastosowaniu TA. Oba związki są bioaktywnymi mediatorami agregacji płytek,^{16,17} a dodatkowo LPL indukuje aktywność trombogenną u ludzi,¹⁸ a S1P jest uwalniany w miejscu uszkodzenia tkanek¹⁹ i jest również zaangażowany w regulację produkcji eikozanoidów – ważnych mediatorów zapalnych,²⁰ co może tłumaczyć wzrost poziomu S1P w próbkach pacjentów pobranych podczas operacji.

Interesującym było zaobserwowanie obecności statystycznie odstających próbek dwóch

¹⁶ Y. Yatomi, F. Ruan, S. Haomori, Y. Igarashi, Blood 86 (1995) 193

¹⁷ G. Gueguen, B. Gaige, J.M. Grevy, P. Rogalle, J.Bellan, M. Wilson, A. Klaébé, F. Pont, M.F. Simon, H. Chap, Biochemistry 38 (1999) 8440

¹⁸ S.M. Chung, O.N. Bae, K.M. Lim, J-Y. Noh, M-Y. Lee, Y-S. Jung, J-H. Chung, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27 (2007) 414

¹⁹ C.K. Means, C.Y. Xiao, Z. Li, T. Zhang, J.H. Omens, I. Ishii, J. Chun, J.H. Brown, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292 (2007) H2944

²⁰ C.E. Chalfant, S. Spiegel, J. Cell Sci. 118 (2005) 4605

pacjentów, co świadczyło o odmiennym ich zareagowaniu na operację lub/i farmakoterapię w porównaniu do reszty badanych. Identyfikacja związków różnicujących odpowiedź pierwszego pacjenta ujawniła podwyższony poziom metabolitów poprzednio wskazanych jako związki znamienne wpływające na separację pomiędzy grupami: mannitol, lipofosfolipidy, tryptofan i kwas eikozapentaenowy. Jednak tutaj podwyższenie stężenia fosfolipidów było związane dodatkowo z podwyższeniem poziomu metabolitów kwasu linoleowego w osoczu. Jeden z nich, DHOME może pośród wielu innych efektów, wywołać aktywność chemotaktyczną neutrofilii.²¹ Dotychczas nie odnotowano związku pomiędzy DHOME i zwiększoną odpowiedzią ze strony krążących neutrofilii po zastosowaniu CPB,²² jednak wyniki omawianych badań mogą sugerować że DHOME może uczestniczyć w drodze aktywacji neutrofilii u pacjentów operowanych z użyciem CPB i jednoczesną podażą TA. Przeprowadzenie dalszych badań na większej liczbie uczestników są jednak niezbędne w celu weryfikacji tej hipotezy. W przypadku drugiego pacjenta najbardziej znanymi związkami różnicującymi go od grupy chorych były kwasy żółciowe i fosfatydylocholino. Może to sugerować przejściową dysfunkcję wątroby, jednak obserwacje pooperacyjne nie wykazały zmian funkcjonalnych u tego pacjenta.

Uzyskane wyniki zademonstrowały, że SPME w połączeniu z analizą LC-MS może być z powodzeniem stosowane do profilowania metabolicznego. Ponadto, analiza profilu metabolicznego pacjentów zaobserwowanych jako statystycznie odmiennych od reszty grupy badanej przysparza dodatkowych informacji o indywidualnej reakcji na zastosowane leczenie oraz o stanie klinicznym pacjenta, co może być wykorzystane podczas terapii indywidualnej.

4.3.1.2. Analiza metabolomu śliny ludzkiej^{A-11}

Kontynuacją badań metabolicznych z wykorzystaniem SPME było przeprowadzenie analiz na próbkach śliny pobranych od ochotników. Ostatnio ze względu na nieinwazyjny charakter pozyskiwania próbek oraz łatwy dostęp śliny daje się zaobserwować rosnące zainteresowanie tym materiałem biologicznym jako macierzą wykorzystywaną do badań. Głównym celem przedstawianego projektu było zademonstrowanie zastosowania uniwersalnego protokołu SPME do bezpośredniej ekstrakcji ze śliny ludzkiej. Badania te stanowiły dokumentację zasadności konceptu i angażowały jedynie dwoje ochotników pozostających przez tydzień na diecie i pijących jedynie sok pomidorowy. Próbkę były pobierane co drugi dzień o tej samej porze. Do badań użyto dwa typy

²¹ L.A. Mitchell, D.F. Grant, R.B. Melchert, N.M. Petty, R.H. Kennedy, *Cardiovasc. Toxicol.* 2 (2001) 219

²² Y. Totani, Y. Saito, T. Ishizaki, F. Sasaki, S. Ameshima, I. Miyamori, *Eur. Respir. J.* 15 (2000) 75

włókien SPME, C18 oraz typu mix-mode (MM), w celu porównania efektywności ekstrakcji. Użycie włókien C18 i MM oraz analiza ekstraktów na platformie LC-MS przy zastosowaniu jonizacji pozytywnej pozwoliło wykryć odpowiednio 394 i 278 metabolitów. Większość związków wyekstrahowana przez włókna MM została zidentyfikowana jako aminokwasy, glicerofosfolipidy, eikozanoidy, kwasy tłuszczowe i glicerolipidy. Ilość związków wyekstrahowanych przy użyciu włókien MM była znacząco wyższa (1.5 razy) w porównaniu do pokryć C18, w sprzężeniu z analizą LC-MS i przy wykorzystaniu negatywnej jonizacji. Wynik ten może być spowodowany większą wydajnością ekstrakcyjną włókien MM niż C18 w odniesieniu do związków hydrofilowych. Jednocześnie zostało również zaobserwowane, że niektóre z wstępnie zidentyfikowanych związków, w tym: glutarylkarnityna, sześć aminokwasów, benzofenon, trzy kwasy karboksylowe, dwa eikozanoidy, dziewięć glicerofosfolipidów, trzy prenole i dwa steroidy zostały wyekstrahowane jedynie przez włókna C18.

Pomimo małej liczby analizowanych próbek wykres PCA jasno przedstawił separację pomiędzy mężczyznami a kobietami jak również między poszczególnymi dniami eksperymentu dla poszczególnych odczynników. Poziom kwasów tłuszczowych, niektórych aminokwasów i glicerolipidów były podwyższone w ślinie osobnika płci żeńskiej, podczas gdy poziom innych aminokwasów, peptydów i ketokwasów był obniżony. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami przedstawionymi w literaturze dotyczącymi różnic między przedstawicielami różnych płci w kinetyce lipidów podczas głodówki.²³

Rezultaty ujawniły także formowanie klastrów próbek pobranych w kolejnych dniach trwania eksperymentu, co odzwierciedla zmiany metaboliczne zachodzące podczas czasu trwania postu. Wykryto 24 unikatowe metabolity (56 wyników na liście trafień z bazy danych) i 37 (72 wyniki na liście trafień z bazy danych) różnicujące profile metaboliczne uzyskane w pierwszym i ostatnim dniu eksperymentu i otrzymane odpowiednio w oparciu o ekstrakcję włóknami C18 i MM. Po wstępnej identyfikacji i wskazaniu metabolitów, które wykazały wzrost lub spadek poziomu w omawianych warunkach wyniki zostały skonfrontowane z danymi literaturowymi i stwierdzono, że zaobserwowane zmiany są zgodne z niedawno przeprowadzonymi badaniami metabolicznymi podczas długotrwałego postu.²⁴

Wyniki uzyskane podczas prac nad opisanym projektem pozwoliły zademonstrować, że

²³ B. Mittendorfer, J.F. Horowitz, S. Klein, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281 (2001) E1333

²⁴ I. Rubio-Aliaga, B. de Roos, S.J. Duthie, K. Crosley, C-D. Mayer, G.W. Horgan, I. Colquhoun, G. Le Gall, F. Huber, W. Kremer, M. Rychlik, S. Wopereis, B. van Ommen, G. Schmidt, C. Heim, F.G. Bouwman, E.C. Mariman, F. Mulholland, I.T. Johnson, A.C. Polley, R.M. Elliot, H. Daniel, *Metabolomics* 7 (2011) 375

ekstrakcja poprzez bezpośrednie wprowadzenie włókna SPME do macierzy biologicznej (direct immersion SPME, DI-SPME) może być skutecznie stosowane do analizy śliny ludzkiej. Pokrycia typu mix-mode oferują lepszy zakres ekstrahowanych metabolitów, jednak włókna C18 mogą wyekstrahować pewną liczbę unikatowych związków niedostępnych dla MM, co w efekcie pozwala na otrzymanie kompleksowych informacji o badanym osobniku. Pomimo, że przedstawione badania przeprowadzone były na małej liczbie próbek, a otrzymane wyniki nie mogą być ekstrapolowane na ogólne wnioski dotyczące wpływu diety/postu na metabolom ludzki, to zgodność obserwacji z doniesieniami literaturowymi dowodzi, że SPME w połączeniu z platformą LC-MS stanowi miarodajne narzędzie analityczne do oceny biomarkerów w ślinie.

4.3.2. Badania *in vivo* wykorzystaniem SPME

4.3.2.1. Analiza metabolomu bakteryjnego^{A-13}

Prezentowana praca jest pierwszą częścią obecnie kontynuowanego projektu, którego celem jest porównanie wyników analiz metabolicznych przeprowadzonych z użyciem tzw. headspace SPME (HS-SPME), czyli ekstrakcji z otoczenia badanej próbki z wykorzystaniem SPME oraz, opisanego wcześniej DI-SPME. Do analizy instrumentalnej służą odpowiednio dwie platformy: GC-MS i LC-MS. Badania te umożliwią nam zdobycie kompleksowej wiedzy i wnikliwy wgląd nie tylko w metabolom bakteryjny, ale także umożliwią sprecyzowanie silnych stron technologii, wskazanie jej limitów i wyznaczenie przyszłych kierunków i strategii, które należy podjąć w celu poprawy zastosowań SPME w metabolomice.

W omawianym artykule zaproponowaliśmy dwie strategie z użyciem SPME: częściową i całkowitą automatyzację metody opartej na niecelowanej ekstrakcji substancji lotnych z kultur bakteryjnych (analizy metabolitów zewnątrzkomórkowych *in vivo*). W pierwszym etapie badań oceniono model wzrostu *E. coli* BL21 w stosowanej pożywce (super media). Następnie, wyznaczono najmniejsze stężenie hamujące (MIC) aldehydu cynamonowego wynoszące 2 g/L. Po optymalizacji, metoda została użyta do oceny wpływu aldehydu cynamonowego na zmiany metaboliczne *E. coli* poprzez porównanie metabolomu bakterii poddanych działaniu aldehydu jako czynnika stresogennego z próbą kontrolną. Wpływ stresora był oceniany pod względem (i) całkowitego efektu na zewnątrzkomórkowy metabolom bakterii, (ii) związek pomiędzy stosowaniem niskiej i wysokiej dawki aldehydu a profilem metabolicznym w aspekcie zależności czasowych, (iii) zmienności metabolicznych wywołanych początkowym dodaniem aldehydu (związek był dodawany do kultury bakteryjnej w czasie „0”, po czym bakterie były hodowane w

37°C) oraz dodawaniem aldehydu do badanego układu w różnych punktach czasowych inkubacji.

Rezultaty pokazały, że aldehyd cynamonowy znacznie wpływa na przebieg profilu wzrostu *E. coli*. Największa liczba metabolitów występowała w środkowej fazie wzrostu logarytmicznego. Zmienność metabolitów (zarówno pod względem jakościowym jak i stężenia) okazała się zależna od wzrostu komórek (gęstości komórek), jak również dawki aldehydu cynamonowego stosowanego w eksperymencie. Ponadto, automatyzacja metody wykazała potencjał wykorzystania SPME w wysokowydajnej analizie metabolomu bakteryjnego.

4.3.2.2. Celowana i niecelowana metabolomika mózgu nieskrępowanych i pozostających w pełnej świadomości szczurów^{A-17}

Badania *in vivo* mózgu stanowią ważną część diagnostyki zaburzeń neurologicznych. Najbardziej powszechna jest elektroencefalografia, ale ta nie daje informacji o zmianach profilu metabolicznego w mózgu. Metodą z wyboru wykorzystywaną do ekstrakcji związków małocząsteczkowych jest mikrodializa (MD), jednak ma ona pewne ograniczenia tj. niska ekstrakcja lub brak ekstrakcji związków hydrofobowych oraz problemy podczas sprzęgania ze spektrometrem masowym na skutek wysokiej zawartości soli w dializacie, co powoduje supresję sygnału. Chociaż MD zwykle było stosowane wyłącznie do celowanych analiz, ostatnie raporty donoszą o aplikacji MD do badań niecelowanych.^{25,26} Opierając się o dotychczasowe doświadczenia podjęliśmy wyzwanie wykorzystania SPME do badań *in vivo* mózgu nieskrępowanych i pozostających w pełnej świadomości podczas przeprowadzania eksperymentów szczurów. W początkowym etapie projektu oceniano zmiany poziomu neurotransmiterów wywołane podażą fluoksetyny, a otrzymane wyniki badań zostały poddane walidacji względem mikrodializy jako ogólnie akceptowanej metodzie standardowej. Następnie, dokonano niecelowanej analizy wyekstrahowanych metabolitów z wykorzystaniem spektrometru masowego typu orbitrap i porównano dane SPME i MD.

Badania SPME wykonane przez bezpośrednie umieszczenie pojedynczego włókna w każdym punkcie czasowym pokazało, że podaż fluoksetyny wpływa jedynie na profil serotoniny (5-hydroksytryptamina, 5-HT); brak zmian względem poziomu podstawowego odnotowano w przypadku dopaminy (DA), kwasu γ -aminomasłowego (gamma aminobutyric acid, GABA) oraz kwasu glutaminowego (glutamic acid, GA). Analizy z użyciem pojedynczej sondy MD umożliwiły

²⁵ C. Wibom, I. Surowiec, L. Mörén, P. Bergstrom, M. Johansson, H. Antti, A.T. Bergenheim, J. Proteome Res. 9 (2010) 2909

²⁶ O. Hrydziuszko, M.A. Silva, M. Thamara, P.R. Perera, D.A. Richards, N. Murphy, D. Mirza, D., M.R. Viant, OMICS J. Integr. Biol. 14 (2010) 143

jedynie analizę 5-HT i DA ze względu na ograniczoną objętość próbki (wolny przepływ perfuzatu) wymaganą do polepszenia odzysku względnego. Pomimo różnic pomiędzy zastosowanymi metodami detekcji (spektrometr mas i detekcja elektrochemiczna), obie metody odnotowały zmiany stężenia 5-HT w prążkowiu po zastosowaniu fluoksetyny w odniesieniu do wartości wyjściowych. Dodatkowo, wyniki SPME charakteryzowały się większą precyzją i powtarzalnością niż MD.

Po pomyślnej walidacji SPME, jednakowy schemat ekstrakcji został zastosowany w badaniach metabolicznych. Zgodnie z przewidywaniami, dane MD wykazały tendencję do ekstrakcji substancji polarnych/hydrofilowych charakteryzującymi się niższymi wartościami logP (współczynnik podziału oktanol/woda). Odwrotne właściwości wykazała SPME, gdzie w ekstrakcie przeważały związki hydrofobowe/mniej polarne. Otrzymane wyniki SPME pokazały obecność kilku grup lipidów, których nie wykryto w dializacie. Pośród tych metabolitów były karnityny, gangliozydy, kwasy tłuszczowe i lizofosfolipidy włączając kwas lizofosfatydylowy i lizofosfatydyloetanolamine. Niektóre ze związków należące do tych grup mają szczególne znaczenie dla klinicystów ze względu na ich udział w różnych schorzeniach i zaburzeniach neurologicznych.^{27,28,29,30,31,32} Nasze obserwacje są szczególnie wartościowe, ponieważ obecnie nie istnieje efektywna metoda umożliwiająca analizę lipidów *in vivo*. Z drugiej strony, wykorzystanie MD pozwoliło wykryć hydrofilowe dwupeptydy i alifatyczne aminokwasy, których obecności nie stwierdzono w ekstrakcie SPME. Jednak warto wspomnieć, że nowo opracowane pokrycia charakteryzują satysfakcjonujące wyniki ekstrakcji wspomnianych metabolitów, co daje nadzieję na rozszerzenie analiz *in vivo* SPME na silnie hydrofilowe związki w przyszłości, wymagając jednocześnie przeprowadzenia dalszych testów tych sorbentów.

Porównanie możliwości ekstrakcyjnych SPME i MD pozwoliło nam postulować, że *in vivo* SPME może służyć z powodzeniem jako technika komplementarna do MD dostarczając pełnego spektrum ekstrahowanych związków, równocześnie dając bardziej szczegółowe informacje o aktywności neurologicznej mózgu. Ponadto, monitorowanie całego metabolomu w warunkach *in vivo* powinno umożliwić wychwycenie metabolitów o krótkim okresie półtrwania, co może uzupełnić naszą wiedzę na temat mechanizmów odpowiedzialnych za różne funkcje mózgu. To z kolei zwiększyłoby szanse na znalezienie biomarkerów powiązanych z różnymi chorobami i

²⁷ A. Virmani, Z. Binienda, Mol. Aspects. Med. 25 (2004) 533

²⁸ S.I. Rapoport, J. Mol. Neurosci. 16 (2001) 243

²⁹ C. Schulze, C. Smales, L.L. Rubin, J.M. Staddon, J. Neurochem. 68 (1997) 991

³⁰ K.A. Youdim, A. Martin, J.A. Joseph, Int. J. Dev. Neurosci. 18 (2000) 383

³¹ E.F. Neufeld, Annu. Rev. Biochem. 60 (1991) 257

³² R.L. Prola, Nat. Genet. 36 (2004) 1147

zaburzeniami neurologicznymi.

4.3.2.3. Zastosowanie SPME do oceny funkcji organów podczas transplantacji

Jak wspomniano wcześniej, bardzo efektywna współpraca z Toronto General Hospital pozwala nam na używanie SPME w „prawdziwych” aplikacjach klinicznych i przez to weryfikować przydatność technologii do analiz typu „on-site” czyli w miejscu poboru próbki. Kilka lat temu grupa torakochirurgów pod kierunkiem Dr Keshavjee opracowała metodę zwaną *Ex vivo* Lung Perfusion (EVLP) służącą do prezerwacji płuc pobieranych do transplantacji. To innowacyjne rozwiązanie zostało opublikowane w jednym z najwyższej cytowanych czasopism medycznych, *New England Journal of Medicine*,³³ a obecnie metoda jest punktem wyjścia do pracy nad systemami prezerwacji innych organów np. wątroby. W skrócie, standardowy sposób prezerwacji organów polega na ich płukaniu płynem „Perfadex” i przechowywaniu w lodzie (tzw. Cold Ischemia Time, CIT czyli czas zimnej niedokrwistości) do kilku godzin. Metoda EVLP obejmuje także tzw. czas niedokrwistości ciepłej (Warm Ischemia Time, WIT), gdzie organ pozostaje podłączony od systemu pomp w celu płukania specjalnie zoptymalizowanym płynem (perfuzatem). W tym czasie płuco jest wentylowane w celu podtrzymania funkcji życiowych organu przez kilka godzin. Dodatkowo, metoda nie tylko pozwala na wydłużenie czasu przechowywania organów, co umożliwia ich transport, ale także poprawia wydajność marginalnych płuc (tj. takich, które zostały niezakwalifikowane do transplantacji ponieważ nie spełniały wymaganych kryteriów). Wiele z tych organów spełnia wspomniane warunki po zastosowaniu EVLP, i konsekwentnie pula płuc kwalifikujących się do przeszczepu zwiększa się. Opisana metoda jest już wykorzystywana w transplantacjach u ludzi, jednak wciąż prowadzone są badania nad modyfikacją warunków przeprowadzania EVLP oraz próby nad wprowadzeniem farmakoterapii podczas perfuzji w celu poprawy stanu organów i zwiększenia liczby udanych przeszczepów. Równoległe do tych badań grupa chirurgów ogólnych pod kierunkiem Dr Markusa Selzner’a pracuje nad modyfikacją systemu perfuzji do transplantacji wątroby.³⁴ Głównym wyzwaniem tego projektu (normotermiczna perfuzja wątroby *ex vivo*, Normothermic *Ex vivo* Liver Perfusion, NEVLP) jest znalezienie efektywnego sposobu natlenienia wątroby podczas perfuzji, ponieważ nie może ona z oczywistych powodów być wentylowana jak to ma miejsce w przypadku płuc. Moja rola w tych dwóch prowadzonych

³³ M. Cypel, J.C. Yeung, M. Liu, M. Anraku, F. Chen, W. Karolak, M. Sato, J. Laratta, S. Azad, M. Madonik, C.-W. Chow, C. Chaparro, M. Hutcheon, L.G. Singer, A.S. Slutsky, K. Yasufuku, M. de Perrot, A.F. Pierre, T.K. Waddell, S. Keshavjee, *New Engl. J. Med.* 364 (2011) 1431

³⁴ M.U. Boehnert, J.C. Yeung, F. Bazerbachi, J.M. Knaak, N. Selzner, I.D. McGilvray, O.D. Rotstein, O.A. Adeyi, S.M. Kandel, P. Rogalla, P.M. Yip, G.A. Levy, S. Keshavjee, D.R. Grant, M. Selzner, *Am. J. Transplant.* XX (2013) 1

wspólnie projektach polegała na zaprojektowaniu i zoptymalizowaniu metody SPME do badań *in vivo* powtarzanych wielokrotnie na wątrobie i płucach w celu analizy zmian profilu metabolicznego tych organów wywołanych perfuzją oraz, kolejno transplantacją i reperfuzją. Prezentowany tutaj artykuł jest pierwszą pracą opublikowaną w oparciu o wyniki badań otrzymanych podczas trwania projektu i opisuje analityczne aspekty opracowywania metody przykładem profilowania metabolicznego płuc. Kolejne manuskrypty podkreślające kliniczne wyniki pracy zostały albo już wysłane do odpowiednich czasopism albo są w trakcie przygotowywania.

Opracowanie analitycznej metody SPME do badań *in vivo* wątroby i płuc składało się z kilku etapów, m.in.: wyboru włókien, optymalizacji przechowywania i transportu włókien, powtarzalności metody oraz zakresu ekstrakcji związków. Badania efektu długości sorbentu na wydajność ekstrakcji przeprowadzony został podczas eksperymentu NEVLP. Zgodnie z przewidywaniami długość pokrycia miała znaczący wpływ na wydajność ekstrakcji z punktu widzenia zakresu ekstrahowanych substancji i czułości metody; im dłuższe użyte pokrycie tym lepsza wydajność ekstrakcyjna. Jednak, jak dyskutowano w artykule, powtarzalność metody jest w ogromnej mierze zależna od precyzji imersji włókna w tkankę i dlatego w przypadku konkretnych zastosowań wybór włókna o krótszym pokryciu może dawać lepsze wyniki. W takich przypadkach, jeżeli nie ma przeciwwskazań z punktu widzenia klinicznego planu eksperymentu, przedłużenie ekstrakcji powinno zrekompensować stratę spowodowaną użyciem krótszej fazy ekstrakcyjnej. Warunki przechowywania i transportu próbek były przeprowadzone po ekstrakcji w trakcie eksperymentu EVLP. Oprócz uniknięcia konieczności poboru tkanki, *in vivo* SPME daje także różne opcje w zakresie transportu i przechowywania związków, albo przez ich pozostawienie na włóknie do czasu analizy, albo przez transport i przechowywanie ekstraktu. Porównanie tych sposobów z ekstrakcją *ex vivo* z fragmentu płuca zamrożonego w ciekłym azocie bezpośrednio po pobraniu, następnie transportowanego na suchym lodzie, i przechowywanego w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wykazało wpływ stosowanego protokołu na ostateczne wyniki profilu metabolicznego. Obserwacja ta została wyjaśniona poprzez możliwą utratę labilnych związków lub formowanie się produktów degradacji w przypadku stosowania podejścia *ex vivo*. Rzeczywiście, wstępna identyfikacja związków różnicujących ekstrakcje *in vivo* z następującym transportem związków na włóknie oraz ekstrakcję przeprowadzoną *ex vivo* z przechowywanego fragmentu płuca wykazała obecność kilku pośrednich metabolitów. Z kolei dominującymi związkami znajdującymi się w ekstrakcie pochodzącym z badań *ex vivo* były diacyloglicerole, które najprawdopodobniej związane były z resztkową aktywnością enzymatyczną fosfolipazy i degeneracją błony komórkowej. W oparciu o otrzymane

wyniki zaproponowaliśmy przechowywanie wyekstrahowanych związków na włóknie jako najbardziej dogodną spośród testowanych metod, zwłaszcza biorąc pod uwagę „globalną” naturę metabolomiki i fakt, że ocena stabilności nieznanymi związków nie jest możliwa a priori.

Ocena jakościowego zakresu wydajności ekstrakcji wykazała obecność 1041 (płuca) i 1580 (wątroba) cząstek charakteryzujących się określonymi cechami (tzw. molecular features) po detekcji z wykorzystaniem jonizacji pozytywnej. Analogiczne dane przedstawione dla jonizacji negatywnej wynoszą 239 i 311 odpowiednio dla płuc i wątroby. Liczby te reprezentują ostateczne dane uzyskane po usunięciu sygnału związków nie wykazujących retencji na kolumnie chromatograficznej (eluujących w objętości martwej kolumny i podczas powrotu do kolumny do równowagi) a także po manualnym wyborze sygnałów, co pozwala na weryfikację prawdziwych i przypadkowych sygnałów oraz tych z nieakceptowalnym kształtem. W pracy zostało również podkreślone, że dodatkowo do małej inwazyjności metody, jej największy atut w porównaniu ze standardowymi protokołami to prostota i krótki czas całkowity analizy (2-3 godziny versus 15-20 godzin standardowych metod opartych na ekstrakcji z użyciem rozpuszczalników włączając trzygodzinne i całonocne osuszanie ekstraktu wodnego i organicznego³⁵). W ostatnim etapie badań próbki otrzymane podczas eksperymentu przeprowadzonego z użyciem dwóch różnych metod prezerwacji organów (standardową zimną i EVLP) zostały porównane przez zastosowanie analizy głównych składowych (PCA). Dane korespondujące odpowiednio z dwoma protokołami utworzyły dwa osobne klastry. Odnotowano, że pierwsza składowa wskazywała różnice między metodami, podczas gdy druga charakteryzowała zmiany pomiędzy próbkami otrzymanymi podczas eksperymentu uzyskanego daną metodą.

Otrzymane wyniki wskazały, że poprzez dostarczenie dodatkowych informacji niedostępnych do tej pory przy użyciu standardowych technik preparacyjnych *in vivo* SPME może służyć jako uzupełniająca lub alternatywna metoda w badaniach profilowania metabolicznego, zwłaszcza gdy pobór materiału jest ograniczony lub gdy wymagana jest rozdzielczość czasowa lub przestrzenna np. w przypadku oceny dystrybucji lub monitorowania stężenia leków lub biomarkerów w czasie. Chociaż rozdzielczość czasowa związana ze stosunkowo długą ekspozycją włókna do narządu w celu uzyskania optymalnej czułości w badaniach metabolicznych pozostaje główną wadą metody, to może być ona polepszona w przypadku analiz celowanych, gdzie czas ekstrakcji może być zoptymalizowany przed właściwą częścią eksperymentu *in vivo*. Dzięki swojej

³⁵ E.J. Want, P. Masson, F. Michopoulos, I.D. Wilson, G. Theodoridis, R.S. Plumb, J. Shockcor, N. Loftus, E. Holmes, J.K. Nicholson, Nat. Protoc. 8 (2013) 17

prostocie i braku konieczności używania rozpuszczalników do ekstrakcji przedstawiona technologia wydaje się być atrakcyjnym rozwiązaniem dla analiz typu „on-site”.

4.4. Podsumowanie

Szybki i proste narzędzie do preparatyki próbek może pomóc uniknąć wielu niedogodności związanych ze stosowaniem tradycyjnych metod ekstrakcyjnych opartych na wykorzystaniu rozpuszczalników. Cechy tzw. „zielonej technologii” jak zredukowanie zużycia rozpuszczalników organicznych, zwłaszcza tych toksycznych i ekotoksycznych, zmniejszenie ilości kroków analizy pochłaniających wiele pracy i energii, a w końcu krótki czas analizy w przeliczeniu na próbkę są argumentami przemawiającymi za stosowaniem SPME w codziennej praktyce preklinicznej i klinicznej.^{A-9} Mikroekstrakcja do fazy stałej ugruntowała swoją pozycję w wielu dziedzinach badań a obecne wyniki jednoznacznie pokazują, że wdrożenie technologii do środowiska klinicznego i preklinicznego może przynieść nowe możliwości diagnostyce medycznej.

Przedstawione publikacje dotyczące zastosowania SPME w badaniach leków i metabolomicie demonstrują przydatność technologii do badań różnorodnych macierzy biologicznych począwszy od osocza, poprzez ślinę, kultury bakteryjne, perfuzat, skończywszy na tkankach organów miękkich tj. mózg, płuca i wątroba. Opisane badania SPME prowadzone były zarówno *ex vivo* jak i *in vivo*, podkreślając możliwość przeprowadzania analiz na dużej liczbie próbek w pierwszym przypadku, a znikomą inwazyjność i brak konieczności poboru próbki w drugim. Zaprezentowany cykl prac zawiera informacje na temat stosowanych protokołów, ich szczegółową walidację oraz opis efektywności ekstrakcyjnej dostępnych pokryć w aspekcie badań metabolomicznych. Dodatkowo, prace przeglądowe i redakcyjne omawiają dotychczasowe osiągnięcia badań biomedycznych przeprowadzonych z użyciem SPME oraz wskazują przyszłe kierunki technologii zarówno pod względem jej wykorzystania w dziedzinie medycyny i farmacji jak i wymagań, którym SPME będzie musiało sprostać aby zyskać ugruntowaną pozycję wśród rutynowo stosowanych metod bioanalitycznych i diagnostycznych.

Ponieważ żadna z technik nie jest panaceum, SPME również powinno być traktowane jako nowe „narzędzie w skrzynce narzędziowej”, jednak jej unikalne cechy powinny być brane pod uwagę podczas opracowywania nowych zastosowań, zwłaszcza gdy problemem jest ograniczona objętość próbki. Chciałabym w tym miejscu wyrazić swoją opinię, że przyszłość SPME leży w analizie macierzy takich jak tkanki, których pozyskanie do przeprowadzenia analiz według standardowych procedur jest bardzo inwazyjne, a przez to wysoce niewskazane. Kolejny aspekt,

który obecnie jest celem badań w University of Waterloo jest bezpośrednie sprzężenie SPME ze spektrometrami masowymi. To umożliwiłoby stosowanie takiego rozwiązania jako przyrządu do szybkiej diagnostyki na Sali operacyjnej lub/i oddziałach intensywnej terapii do monitorowania biomarkerów i stężenia leków. Obecne trendy w chemii analitycznej pokazują, że spektrometry masowe będą stanowiły nieuniknione wyposażenie jednostek klinicznych w przeciągu następnych kilku lat.^{A-16} W związku z tym przyszłość preparatyki próbek musi być odpowiednio dostosowana do wymogów klinicznych: prostoty protokołu i wiarygodności metody. Wydaje się, że SPME spełnia te oczekiwania i może być brane pod uwagę jako standardowe narzędzie w laboratoriach klinicznych.

Podczas mojej pracy nad zastosowaniami medycznymi SPME zostałam zaproszona do napisania kilku artykułów przeglądowych^{A-2,A-8,A-15} i prac redakcyjnych^{A-3,A-9,A-14,A-16} z tej dziedziny, jak również zorganizowania pracy nad artykułem przeglądowym dotyczącym ostatnich dokonań i przyszłych perspektyw SPME.^{A-10} Wspomniane publikacje są dla mnie ważnym osiągnięciem, a same zaproszenia do stanowią uznanie mojej pracy w danej dziedzinie, dlatego włączam wspomniane prace do listy moich osiągnięć naukowych zgłaszanych do postępowania habilitacyjnego.

5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

Tematyka badań prowadzonych w ramach przygotowania pracy doktorskiej skupiała się na spektroskopowej analizie konkurencyjnego oddziaływania leków stosowanych w skojarzonej terapii przeciwnowotworowej z albumina surowicy krwi. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych problematyka badań dotyczyła wpływu wiązania kwasów tłuszczowych z albumina surowicy krwi na oddziaływanie leków z tym białkiem transportującym. Wykorzystanie w badaniach spektroskopii fluorescencyjnej, różnicowej spektroskopii UV oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) umożliwiło stworzyć platformę analityczną służącą do oceny zmian wiązania ligandów z białkami w miejscach wysokiego i niskiego powinowactwa. Zasadniczo różne podstawy stosowanych technik pozwoliły na obserwacje zmian struktury białka jak również zmiany w dynamice i stechiometrii tworzonych kompleksów ligand-albumina. Na podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem opisanej metody powstał szereg prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach międzynarodowych o tematyce spektroskopowej oraz farmaceutyczno-biomedycznej.

5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

5.1.1. Publikacje

- B-1. Sułkowska A., Równicka J., **Bojko B.**, Sułkowski W. (2003) Interaction of anticancer drugs with human and bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure* 651-653C:133-140.
Wskaźnik Impact Factor: 1.021; Punktacja MNiSW: 20
- B-2. Sułkowska A., **Bojko B.**, Równicka J., Pentak D., Sułkowski W. (2003) The effect of urea on serum albumin complex with antithyroid drugs: fluorescence study. *Journal of Molecular Structure* 651-653C:237-243.
Wskaźnik Impact Factor: 1.021; Punktacja MNiSW: 20
- B-3. Stadnicki A., **Bojko B.**, Myczkowska K, Witalińska-Łabuzek J. (2003) Wybrane wskaźniki zagrożenia zakrzepowego u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. *Wiadomości Lekarskie* 7-8:341-347.
Wskaźnik Impact Factor: -; Punktacja MNiSW: 6
- B-4. Sułkowska A., Równicka J., **Bojko B.**, Pożycka J., Zubik – Skupień I., Sułkowski W. (2004) Effect of guanidine hydrochloride on bovine serum albumin complex with antithyroid drugs: fluorescence study. *Journal of Molecular Structure* 704:291-295. *Wskaźnik Impact Factor: 1.200; Punktacja MNiSW: 20*
- B-5. Sułkowska A., **Bojko B.**, Równicka J., Sułkowski W. (2004) Competition of drugs to serum albumin in combination therapy. *Biopolymers* 74:256-262.
Wskaźnik Impact Factor: 2.863; Punktacja MNiSW: 25
- B-6. Sułkowska A., Równicka J., **Bojko B.**, Pożycka J., Zubik-Skupień I., Sylla T., Sułkowski W.W. (2004) Effect of guanidine hydrochloride on the interaction of serum albumin with mercaptopyrimidine. *Physica Medica XX*, Supl. 1, 20:126-128.
Wskaźnik Impact Factor: 0.341; Punktacja MNiSW: 15
- B-7. Sułkowska A., Drzazga Z., Maciążek M., Równicka J., **Bojko B.**, Sułkowski L. (2004) Porphyrin IX – serum albumin interactions. *Physica Medica XX*, Supl. 1, 20:49-51.
Wskaźnik Impact Factor: 0.341; Punktacja MNiSW: 15

Wskaźnik Impact Factor: 6.787; MNiSW score: 121

5.1.2. Streszczenia publikowane w recenzowanych czasopismach jako postępowanie pokonferencyjne

B-8. Stadnicki A., Pastucha E., Plewka D., Mazurek U., Nowaczyk G., **Bojko B.**, Gil D., Orchel J., Wilczok T. (2002) Immunolocalization and expression of kinin receptor in human inflammatory bowel diseases, 10th United European Gastroenterology Week (UEGW), Geneva, Switzerland, 19-24.10.2002, *Gut* 51 (Suppl III) A299.

Wskaźnik Impact Factor: 6.323; Punktacja MNiSW: 45

B-9. Stadnicki A., **Bojko B.**, Myczkowska K. (2002) Some risk factors of thrombotic complications in patients with ulcerative colitis, 10th United European Gastroenterology Week (UEGW), Geneva, Switzerland, 19-24.10.2002, *Gut* 51 (Suppl III) A97.

Wskaźnik Impact Factor: 6.323; Punktacja MNiSW: 45

B-10. Stadnicki A., **Bojko B.**, Kokocińska D., Bierzyńska G. (2004) Tissue polypeptide specific antigen (TPS) and transforming growth factor β -1 (TGF β -1) systemic evaluation in ulcerative colitis, 12th United European Gastroenterology Week (UEGW), Prague, Czech Republic, 25-29.10.2004 *Gut* 34 (Suppl I) A227.

Wskaźnik Impact Factor: 6.601; Punktacja MNiSW: 45

Wskaźnik Impact Factor: 19.247; MNiSW score: 135

5.1.2. Nagrody i wyróżnienia

- 2004 Zespołowa Nagroda Ministra Zdrowia Rzeczypospolitej Polskiej za szczególne osiągnięcia naukowe

5.1.3. Odbyte kursy i szkolenia

- 01.09.2003–01.09.2004: szkolenie i staż z zakresu Magnetycznego Rezonansu Jądrowego, Wydział Chemii, Uniwersytet Śląski, Katowice
- 08-11.09.2003: Kurs biokrytalografii: „From gene to drug”, CEB - Centre of Excellence in Biocrystallography, University of Trieste, Włochy
- 05.05.2004: “Szkola NMR”, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, Łódź
- 25.09.2004: Kurs Spektrometrii Masowej: “Modern methods of mass spectrometry in chemistry and biology”, Seggau, Austria

5.1.4. Udział w konferencjach i sympozjach

- 30.08-04.09.2003: IX European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Szeged, Węgry (prezentacja plakatu)
- 22-23.09.2003: V Central European NMR Symposium, Łódź (prezentacja plakatu)
- 13-15.11.2003: IV Symposium on Medical Physics, Ustroń (prezentacja plakatu)
- 01-02.12.2003: XXXVI Polish Seminar on NMR and Its Applications, Kraków (prezentacja plakatu)
- 05-10.09.2004: XXVII European Congress on Molecular Spectroscopy, Kraków (prezentacja plakatu)
- 26-29.09.2004: 2nd Central European Conference Chemistry towards Biology, Seggau, Austria (prezentacja plakatu)

5.1.5. Współpraca z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Śląskiego (badania NMR)

Współpraca z Wydziałem Chemii UŚ rozpoczęła się od szkolenia, w którym uczestniczyłam we wrześniu 2003 roku, a następnie była kontynuowana do sierpnia 2009 roku. Dostęp do pracowni NMR UŚ pozwolił mi na rozszerzenie moich badań doktorskich nad kompetycyjnym wiązaniem leków podczas ich wiązania z białkami o doświadczenia z wykorzystaniem ¹H NMR i ¹³C NMR. Następnie, kontynuowałam moje badania z wykorzystaniem NMR do oceny wpływu kwasów tłuszczowych na wiązanie lek-albumina.

5.1.6. Udział w grantach

- 2002 - Sułkowska A., Zawada Z., Bilińska B., Krzyżanowski L., Bojko B., Równicka J., "Naturalne i modelowe membrany biologiczne. Struktura i oddziaływanie z białkami i ligandami" grant na badania statutowe, Śląski Uniwersytet Medyczny, NN-4-055/02.
- 2003 - Sułkowska A., Zawada Z., Bilińska B., Krzyżanowski L., Bojko B., Równicka J., "Naturalne i modelowe membrany biologiczne. Struktura i oddziaływanie z białkami i ligandami" grant na badania statutowe, Śląski Uniwersytet Medyczny, NN-1-029/03.
- 2004 - Sułkowska A., Zawada Z., Bilińska B., Krzyżanowski L., Bojko B., Równicka J., "Naturalne i modelowe membrany biologiczne. Struktura i oddziaływanie z białkami i ligandami" grant na badania statutowe, Śląski Uniwersytet Medyczny, NN-1-014/04.

5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora z wykluczeniem publikacji zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego

5.2.1. Publikacje

- C-1. Sułkowska A., Równicka J., Pożycka J., **Bojko B.**, Sułkowski W.W. (2005) The effect of concentration of guanidine hydrochloride on the sulfasalazine-serum albumin complex. *Journal of Molecular Structure* 744-747:775-779.
Wskaźnik Impact Factor: 1.440; Punktacja MNiSW: 20
- C-2. Sułkowska A., **Bojko B.**, Równicka J., Rezner P., Sułkowski W.W. (2005) The competition of drugs to serum albumin in combination chemotherapy: NMR study. *Journal of Molecular Structure* 744-747:781-787.
Wskaźnik Impact Factor: 1.440; Punktacja MNiSW: 20
- C-3. Równicka J., Sułkowska A., Pożycka J., **Bojko B.**, W.W.Sułkowski (2006) Stability of the complex BSA-6-propyl-2-thiouracil in the presence of Gu.HCl and urea. *Journal of Molecular Structure* 792-793C:243-248.
Wskaźnik Impact Factor: 1.495; Punktacja MNiSW: 20
- C-4. Sułkowska A., **Bojko B.**, Równicka J., Sułkowski W.W. (2006) Competition of cytarabine and aspirin in binding to serum albumin in multidrug therapy. *Biopolymers* 81:464-472.
Wskaźnik Impact Factor: 2.480; Punktacja MNiSW: 25
- C-5. Sułkowski L., Sułkowska A., Równicka J., **Bojko B.**, Sieroń A., Pentak D., Sułkowski W.W. (2006) The effect of serum albumin on binding of protoporphyrin IX to phospholipid membrane. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 448:73-81.
Wskaźnik Impact Factor: 0.478; Punktacja MNiSW: 15
- C-6. Sułkowska A., **Bojko B.**, Równicka J., Sułkowski W.W. (2006) Paracetamol and cytarabine binding competition in high affinity binding sites of transporting protein. *Journal of Molecular Structure* 792-793C:249-256.
Wskaźnik Impact Factor: 1.495; Punktacja MNiSW: 20
- C-7. Sułkowska A., Maciążek M., Równicka J., **Bojko B.**, Pentak D., Sułkowski W.W. (2007) Effect of temperature on the methotrexate – BSA interaction. Spectroscopic study. *Journal of Molecular Structure* 834-836:162-169.
Wskaźnik Impact Factor: 1.486; Punktacja MNiSW: 20
- C-8. Sułkowska A., Maciążek-Jurczyk M., **Bojko B.**, Równicka J., Zubik-Skupień I., Temba E., Pentak D., Sułkowski W.W. (2008) Competition of phenylbutazone and colchicine to serum albumin in multidrug therapy. Spectroscopic study. *Journal of Molecular Structure* 881:97-106.

Wskaźnik Impact Factor: 1.594; Punktacja MNiSW: 20

- C-9. **Bojko B.**, Sułkowska A., Równicka J., Maciążek M., Njau F, Sułkowski W.W. (2008) Changes of serum albumin affinity for aspirin induced by fatty acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 42:314-323.

Wskaźnik Impact Factor: 1.867; Punktacja MNiSW: 25

- C-10. Pentak D., Wolińska A., Maślanka S., **Bojko B.**, Maciążek M., Równicka J., Sułkowska A., Sułkowski W.W. (2008) Application of spin markers for study of liposome prepared by the modified reversephase evaporation method., *Spectroscopy-An International Journal* 22:33-41.

Wskaźnik Impact Factor: 0.820; Punktacja MNiSW: 20

- C-11. Sułkowska A., Maciążek-Jurczyk M., **Bojko B.**, Równicka J., Zubik-Skupień I., Sułkowski W.W. (2008) ¹HNMR study of methotrexate–serum albumin (MTX–SA) binding in rheumatoid arthritis. *Journal of Molecular Structure* 891:278-283.

Wskaźnik Impact Factor: 1.594; Punktacja MNiSW: 20

- C-12. Maciążek-Jurczyk M., Knopik M., **Bojko B.**, Sułkowska A. (2008) Osteosarcoma i sarcoma Ewingi - pierwotne nowotwory złośliwe kości. Osteosarcoma and sarcoma Ewingi - primary malignant bone tumors). *Onkologia Info* T.5,5:199-205.

Wskaźnik Impact Factor: -; Punktacja MNiSW: 4

- C-13. Równicka J., Sułkowska A., **Bojko B.**, Maciążek-Jurczyk M., Pożycka J., Pentak D., Sułkowski W.W. (2009) Binding of 6-propyl-2-thiouracil to human serum albumin destabilized by chemical denaturants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 97:54-59.

Wskaźnik Impact Factor: 1.871; Punktacja MNiSW: 20

- C-14. Maciążek-Jurczyk M., Sułkowska A., **Bojko B.**, Równicka J., Sułkowski W.W. (2009) Interaction of phenylbutazone and colchicine in binding to serum albumin in rheumatod therapy. ¹HNMR study. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 74:1-9. Erratum in: *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2010) 75:1380.

Wskaźnik Impact Factor: 1.556; Punktacja MNiSW: 20

- C-15. Maciążek-Jurczyk M., Sułkowska A., **Bojko B.**, Równicka J., Sułkowski W.W. (2009) Fluorescence analysis of competition of phenylbutazone and methotrexate in binding to

serum albumin in combination treatment in rheumatology. *Journal of Molecular Structure* 924-926:378-384.

Impact Factor: 1.551; Punktacja MNiSW: 20

- C-16. Równicka-Zubik J., Sułkowska A., Pożycka J., Gazdzicka K., **Bojko B.**, Maciążek-Jurczyk M., Sułkowski W.W. (2009) Fluorescence analysis of sulfasalazine bound to defatted serum albumin in the presence of denaturing factors. *Journal of Molecular Structure* 924-926:371-377.

Wskaźnik Impact Factor: 1.551; Punktacja MNiSW: 20

- C-17. **Bojko B.**, Sułkowska A., Maciążek-Jurczyk M., Równicka J., Sułkowski W.W. (2009) Investigations of acetaminophen binding to bovine serum albumin in the presence of fatty acid: Fluorescence and ¹H NMR studies. *Journal of Molecular Structure* 924-926:332-337.

Wskaźnik Impact Factor: 1.551; Punktacja MNiSW: 20

- C-18. Maciążek-Jurczyk M., Knopik M., **Bojko B.**, Sułkowska A. (2009) Zastosowanie probiotyków w chorobach przewodu pokarmowego. *Świat Lekarza* 1:58-60.

Wskaźnik Impact Factor: -; Punktacja MNiSW: -

- C-19. **Bojko B.**, Sułkowska A., Maciążek-Jurczyk M., Równicka J., Pentak D., Sułkowski W.W. (2010) Alterations of furosemide binding to serum albumin induced by the increased level of fatty acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51:273-277.

Wskaźnik Impact Factor: 2.733; Punktacja MNiSW: 30

- C-20. **Bojko B.**, Sułkowska A., Maciążek-Jurczyk M., Równicka J., Sułkowski W.W. (2010) Influence of myristic acid on furosemide binding to bovine serum albumin. Comparison with furosemide-human serum albumin complex. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 76:6-11.

Wskaźnik Impact Factor: 1.770; Punktacja MNiSW: 20

- C-21. **Bojko B.**, Sułkowska A., Maciążek-Jurczyk M., Równicka J., Sułkowski W.W. (2010) The influence of dietary habits and pathological conditions on the binding of theophylline to serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52:384-90.

Wskaźnik Impact Factor: 2.733; Punktacja MNiSW: 30

- C-22. Pentak D., Sułkowska A., Czopek I., **Bojko B.**, Równicka-Zubik J., Sułkowski W.W. (2010) Thermotropic phase behavior of liposome entrapped 5-FU and LCV. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 523:282-88.

Wskaźnik Impact Factor: 0.580; Punktacja MNiSW: 15

C-23. Równicka-Zubik J., Sulkowska A., Dubas M., Poycka J., Maciążek-Jurczyk M., **Bojko B.**, Sulkowski W.W. (2011) Effect of ageing of human serum albumin in vitro on surface hydrophobicity and binding sites of metronidazole *Journal of Molecular Structure* 993:477-484.

Wskaźnik Impact Factor: 1.634; Punktacja MNiSW: 20

C-24. Maciążek-Jurczyk M., Sulkowska A., Równicka-Zubik J., **Bojko B.**, Szkudlarek-Hasnik A., Knopik M., Sulkowski W.W. (2011) Polypharmacotherapy in rheumatology: ¹H NMR analysis of binding of phenylbutazone and methotrexate to serum albumin. *Journal of Molecular Structure* 993: 302-307.

Wskaźnik Impact Factor: 1.634; Punktacja MNiSW: 20

C-25. Maciążek-Jurczyk M., Sulkowska A., **Bojko B.**, Równicka-Zubik J., Sulkowski W.W. (2011) A spectroscopic study of phenylbutazone and aspirin bound to serum albumin in rheumatoid diseases. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 82:181-90.

Wskaźnik Impact Factor: 2.098; Punktacja MNiSW: 20

C-26. Yeung J.C.Y., de Lannoy I., Gien B., Vuckovic D., Yang Y., **Bojko B.**, Pawliszyn J. (2012) Semi-automated *in vivo* solid-phase microextraction sampling and the diffusion-based interface calibration model to determine the pharmacokinetics of methoxyfenoterol and fenoterol in rats. *Analytica Chimica Acta* 742:37-44.

Wskaźnik Impact Factor: 4.387; Punktacja MNiSW: 40

C-27. Maciążek-Jurczyk M., Sulkowska A., **Bojko B.**, Równicka-Zubik J., Szkudlarek-Hasnik A., Zubik-Skupien I., Gora A., Dubas M., Korzonek-Szlacheta I., Wielkoszynski T., Urawinski W., Sosada K. (2012) The influence of fatty acids on theophylline binding to human serum albumin. Comparative fluorescence study. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 89:270-5.

Wskaźnik Impact Factor: 1.977; Punktacja MNiSW: 20

C-28. Goryński K., **Bojko B.**, Nowaczyk A., Buciński A., Pawliszyn J., Kaliszan R. (2013) Quantitative structure-retention relationships models for prediction of High Performance Liquid Chromatography retention time of small molecules: endogenous metabolites and banned compounds. *Analytica Chimica Acta* (w druku, DOI 10.1016/j.aca.2013.08.025)

Wskaźnik Impact Factor: 4.387; Punktacja MNiSW: 40

C-29. Mirnaghi F., Gorynski K., Rodriguez-Lafuente A., Boyaci E., **Bojko B.**, Pawliszyn J. (2013) Microextraction versus exhaustive extraction approaches for simultaneous analysis of compounds in wide range of polarity. *Journal of Chromatography A* (zaakceptowany)

Wskaźnik Impact Factor: 4.612; Punktacja MNiSW: 40

C-30. Jiang R., Cudjoe E., **Bojko B.**, Abaffy T., Pawliszyn J. (2013) A Non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. *Analytica Chimica Acta* (zaakceptowany)

Wskaźnik Impact Factor: 4.387; Punktacja MNiSW: 40

*dla artykułów opublikowanych/przyjętych do druku w roku 2013 podany wskaźnik Impact Factor odnosi się do roku 2012

Wskaźnik Impact Factor: 57.257; Punktacja MNiSW: 664

5.2.2. Rozdziały w książkach

1. Lord H., **Bojko B.** Drug analysis by SPME. Rozdział w: Handbook of Solid Phase Microextraction; red. Pawliszyn J. Elsevier Inc. 2012.
2. **Bojko B.**, Pawliszyn J. (2013) Solid phase microextraction for *in vivo* pharmacokinetics and other stages of drug development (str. 127–192). Rozdział w: *Advances in Chromatography* 51.; red. Eli Grushka i Nelu Grinberg. CRC Press, Print ISBN: 978-1-4665-6965-2, eBook ISBN: 978-1-4665-6966-9, DOI: 10.1201/b15308-4. (zgłoszone do postępowania habilitacyjnego; A-15)

5.2.3. Nagrody i wyróżnienia

- 2005 wyróżnienie pracy doktorskiej.: „Kompetycyjne wiązanie leków z albuminami surowicy krwi w terapii przeciwnowotworowej” przyznane przez Radę Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
- 2008 Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach za osiągnięcia naukowe
- 2009 Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach za osiągnięcia naukowe
- 2010 Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach za osiągnięcia naukowe
- 2011 Zespołowa Nagroda Ministra Zdrowia Rzeczypospolitej Polskiej za szczególne

osiągnięcia naukowe

- 2012 Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach za osiągnięcia naukowe

5.2.4. Udział w kursach i szkoleniach

- 17. 05. 2006: “Szkola NMR”, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, Łódź
- 18. 05. 2007: “Szkola NMR”, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, Łódź
- 04. 12. 2007: Central and East European NMR Users Meeting, Kraków
- 06. 2008: “Szkola NMR”, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, Łódź
- 21.09.2008 – 23.09.2008: 13th Summer Course on Pharmaceutical Analysis, Advanced Analytical Methodologies in Drug Discovery, University of Bologna, Rimini, Włochy
- 07.10.2008 – 08.10.2008: Solid Phase Microextraction Course, Dublin, Irlandia
- 03.12.2009 – 04.12.2009: Solid Phase Microextraction Course, University of Waterloo, Kanada
- 03-04. 05.2012: Informatics and Statistics for Metabolomics, Toronto, Kanada
- 19.05.2012: Metabolomics Short course at ASMS, Vancouver, Kanada

5.2.5. Udział w konferencjach i sympozjach

- 03-08.09.2006: The XXVIIIth European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS XXVIII), Istanbul, Turcja (prezentacja plakatu)
- 29.01-03.02. 2007: The First Asian Spectroscopy Conference (ASC’07) and Asian Biospectroscopy Conference, Bangalore, Indie (prezentacja plakatu)
- 20-22.09.2007: Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, Kijów, Ukraina (prezentacja plakatu)
- 16-19.12.2007: SICCC-5 Singapore International Chemistry Conference 5 and APCE Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, Singapur (prezentacja plakatu)

- 08-12.06.2008: 19th International Symposium of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Gdańsk (prezentacja plakatu)
- 01-04.03.2010: Pittcon 2010, Orlando, USA (dwie prezentacje ustne)
- 20-22.09.2010: 12th International Symposium on Extraction Technologies (ExTech), Poznań (prezentacja ustna)
- 24-25.11.2010: Canada Research Chair Symposium, Toronto, Kanada (prezentacja plakatu)
- 15-20.12.2010: The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), Honolulu, USA (prezentacja plakatu)
- 11-15.03.2011: Pittcon 2011, Atlanta, USA (prezentacja plakatu i ustna)
- 05-09.06.2011: 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, USA (prezentacja plakatu)
- 31.01-03.02.2012: 12th Hyphenated Techniques for Chromatography Symposium (HTC-12) and Hyphenated Techniques for Sample Preparation Symposium (HTSP-2), Bruges, Belgia (prezentacja ustna)
- 11-15.03.2012: Pittcon 2012, Orlando, USA (dwie prezentacje ustne)
- 20-24.05.2012: 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Vancouver, USA (prezentacja plakatu)
- 28-29.07.2012: DICP Symposium on Frontiers in Sample Preparation: Novel Principles and Techniques, Dalian, Chiny (prezentacja ustna)
- 09-13.09.2012: 29th international Symposium on Chromatography (29th ISC), Toruń (prezentacja plakatu)
- 24-26.09.2012: 14th International Symposium on Extraction Technologies (ExTech), Messina, Włochy (prezentacja ustna)
- 17-21.03.2013: Pittcon 2013, Philadelphia, USA (trzy prezentacje ustne)
- 3.06-03.07.2013: 24th International Symposium of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Bologna, Włochy (prezentacja ustna)

5.2.6. Prowadzenie kursów

- wiosna i jesień 2010, 2011, 2012, 2013: instruktor podczas kursu “Solid Phase Microextraction” University of Waterloo, Waterloo, Kanada
- 2010, 2011, 2012: główny instruktor podczas kursu “Solid Phase Microextraction”, na

kolejnych konferencjach z serii Pittcon

- maj 2012: instruktor podczas kursu “Solid Phase Microextraction” dla Sigma-Aldrich, Shanghai, Chiny
- październik 2013: instruktor podczas kursu “Solid Phase Microextraction” Sun Yat-sen University Guangzhou, Chiny

5.2.7. Prowadzenie seminariów i wykładów na zaproszenia instytucji naukowych i firm

- maj 2010: seminarium na zaproszenie Sigma-Aldrich, Toronto, Kanada
- listopad 2011: wykład na zaproszenie Latner Thoracic Surgery Research Laboratories, Toronto, Kanada
- grudzień 2012: wykład na zaproszenie Latner Thoracic Surgery Research Laboratories, Toronto, Kanada

5.2.8. Opieka nad studentami studiów magisterskich

- 2005/2006 – Frida Saronga Njau (praca w języku angielskim; promotor)
- 2006/2007 – Daria Gębska (opiekun)
- 2007/2008 – Patryk Reznar (promotor), Anna Gołębiowska (opiekun)
- 2008/2009 – Paweł Sapinski (promotor), Małgorzata Gasidło (opiekun)

5.2.9. Opieka nad doktorantami

- Krzysztof Goryński; Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; „Application of solid phase microextraction and quantitative structure retention relationships as novel tools for multi-compound bioanalysis”; opiekun naukowy podczas pobytu studenta w University of Waterloo; wrzesień 2011-grudzień 2012
- Afsoon Pajand Birjandi – University of Waterloo; “Microbiology Determinations by SPME”; opiekun naukowy od września 2010
- Nathaly Reyes-Garcés – University of Waterloo; “Clinical and Antidoping Applications of SPME”; opiekun naukowy od stycznia 2013
- German Augusto Gomez-Rios – University of Waterloo; “Medical Applications of SPME”; opiekun naukowy od stycznia 2013
- Fatemeh Mousavi – University of Waterloo; “High Throughput Food Determinations by

SPME/LC/MS”; opiekun naukowy od stycznia 2013

- Zhao Huyiu – China Agricultural University, Beijing, China; “Ligand-protein binding by SPME”; opiekun naukowy podczas pobytu studenta w University of Waterloo; wrzesień 2012-sierpień 2014

5.2.10. Opieka nad studentami zrzeszonymi w Kole Naukowym Wydziału Farmacji i Oddziału Medycyny Laboratoryjnej przy Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej: 2007/2008-2008/2009

W latach akademickich 2007/2008 i 2008/2009 pełniłam opiekę nad grupą studentów zrzeszonych w Kole Naukowym na Wydziale Farmacji i Oddziale Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Studenci zaangażowani byli w kilka projektów związanych z badaniami prowadzonymi w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej tamtego wydziału. Na spotkania odbywające się co dwa tygodnie składały się zajęcia seminaryjne oraz eksperymenty laboratoryjne. Wyniki badań prezentowane były przez kilkoro członków grupy podczas dwóch konferencji Stowarzyszenia Studentów Kół Naukowych.

5.2.11. Organizowanie kursów

- wiosna i jesień 2010, 2011, 2012, 2013: organizator 2-dniowego kursu “Solid Phase Microextraction”, University of Waterloo, Waterloo, Canada
- 2010, 2011, 2012: organizator kursu “Solid Phase Microextraction” na kolejnych konferencjach z serii Pittcon

5.2.12. Organizowanie sympozjum podczas konferencji na zaproszenie Analytical Chemical Society

- Organizowanie sympozjum ACS DAC: “Analytical Advances in Clinical Diagnostics”, które odbędzie się w czasie trwania konferencji Pittcon 2014 w Chicago, 03-06.03.2014

5.2.13. Praca redakcyjna

- od maja 2013: członek zespołu redakcyjnego czasopisma “Modern Chemistry and Applications” wydawanego przez OMICS Publishing Group

5.2.14. Recenzje prac dla czasopism

W przeciągu ostatnich kilku lat recenzowałam 26 prac nadesłanych do wymienionych niżej czasopism:

- Spectrochimica Acta A
- Journal of Luminescence
- International Journal of Biological Macromolecules
- Journal of Molecular Structure
- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
- Analytica Chimica Acta
- Bioanalysis
- Analytical Chemistry
- Metabolomics
- Trends in Analytical Chemistry
- Rapid Communication in Mass Spectrometry

5.2.15. Granty indywidualne

- 2006 Grant przyznany przez Senacką Komisję ds. Nauki ŚAM na badania własne pt. "Wpływ endo- i egzogennych kwasów tłuszczowych na wiązanie leków do albuminy surowicy krwi" NN-2-075/06
- 2007 Grant przyznany przez Senacką Komisję ds. Nauki ŚUM na badania własne pt. "Wpływ endo- i egzogennych kwasów tłuszczowych na wiązanie leków do albuminy surowicy krwi" NN-2-011/07
- 2008 Grant przyznany przez Senacką Komisję ds. Nauki ŚUM na badania własne pt. "Wpływ endo- i egzogennych kwasów tłuszczowych na wiązanie leków do albuminy surowicy krwi" KNW-2-031/08
- 2009 Grant przyznany przez Senacką Komisję ds. Nauki ŚUM na badania własne pt. "Wpływ endo- i egzogennych kwasów tłuszczowych na wiązanie leków do albuminy surowicy krwi" KNW-2-058/09

5.2.16. Udział w grantach

- 2005 Sułkowska A., Zawada Z., Bilińska B., Krzyżanowski L., Bojko B., Równicka J., "Naturalne i modelowe membrany biologiczne. Struktura i oddziaływanie z białkami i ligandami"; grant na badania statutowe, Śląski Uniwersytet Medyczny, NN-1-063/05.

- 2006 Sułkowska A., Zawada Z., Bojko B., Równicka J., "Naturalne i modelowe membrany biologiczne. Struktura i oddziaływanie z białkami i ligandami"; grant na badania statutowe, Śląski Uniwersytet Medyczny, NN-1-037/06.
- 2007 Sułkowska A., Zawada Z., Bojko B., Równicka J., Maciążek-Jurczyk M., Zubik-Skupień I., "Naturalne i modelowe membrany biologiczne. Struktura i oddziaływanie z białkami i ligandami"; grant na badania statutowe, Śląski Uniwersytet Medyczny, NN-1-005/07.

5.2.17. Grant otrzymany od Światowej Agencji Antydopingowej (World Anti-Doping Agency, WADA)

W roku 2011 w imieniu prof. Pawliszyna aplikowałam o grant sponsorowany przez Światową Agencję Antydopingową (WADA). Przygotowany przeze mnie projekt nosił tytuł "Evaluation of Solid Phase Microextraction for Improved Multi-Residue Extraction and Analysis of Prohibited Substances by LC-MS/MS". Projekt został zaakceptowany przez The Health, Medical and Research Committee of WADA i nagrodzony dwuletnim funduszem opiewającym na łączną kwotę 210 tys. dolarów. Na początku 2011 roku zespół składający się z dwóch naukowców będących na stażu podoktoranckim w laboratorium prof. Pawliszyna oraz jednego doktoranta rozpoczął pod moim kierownictwem pracę nad rzeczonym projektem. Komitet naukowy WADA pozytywnie ocenił raport przygotowany na zakończenie trwania pierwszego roku projektu, a wyniki zostały już zaprezentowane na 29th International Symposium on Chromatography. Ponadto, manuskrypt dotyczący analizy moczu z wykorzystaniem opracowanej metody został przygotowany i wysłany do redakcji Analytica Chimica Acta.

5.2.18. Grant otrzymany od firmy Agilent

W roku 2011 zostałam poproszona o przygotowanie propozycji grantu pt.: "Monitoring drugs of abuse in urine by direct immersion solid-phase microextraction (DI SPME) and GC/MS". Projekt został zaakceptowany i otrzymał fundusz w wysokości 44 tys. dolarów. Czas trwania projektu został wyznaczony na jeden rok (wrzesień 2011 – sierpień 2012), a w jego wykonanie zaangażowanego jednego naukowca odbywającego staż podoktorancki w grupie prof. Pawliszyna.

5.2.19. Inne granty sponsorujące projekty, w których realizację jestem zaangażowana

- NSERC IRC we współpracy z Supelco, Gerstel, Unilever "New Analytical Methods and

Technologies for Sample Preparation”

- Canada Foundation for Innovation Infrastructure Operating Grant
- Heart and Stroke Foundation of Canada “Plasma concentration and pharmacokinetics of tranexamic acid in patients with renal impairment undergoing cardiopulmonary bypass surgery”

5.2.20. Współpraca z przemysłem

- NoAb Biodiscoveries

Na początku mojej pracy w University of Waterloo zostałam zaangażowana w projekt dotyczący wykorzystania *in vivo* SPME do badań farmakokinetycznych u gryzoni, który to projekt prowadzony był we współpracy z NoAb Biodiscoveries, firmą specjalizującą się w badaniach preklinicznych leków. Mój udział polegał na walidacji wyników SPME otrzymanych przez kolegów z University of Waterloo względem tradycyjnej metody: precypitacji białek osocza. Wyniki opublikowane zostały w [C-26: Yeung J.C.Y., de Lannoy I., Gien B., Vuckovic D., Yang Y., Bojko B., Pawliszyn J. (2012) Semi-automated *in vivo* solid-phase microextraction sampling and the diffusion-based interface calibration model to determine the pharmacokinetics of methoxyfenoterol and fenoterol in rats. *Analytica Chimica Acta* 742:37-44].

Kolejny projekt przygotowany wspólnie z NoAb Biodiscoveries został sfinalizowany bardzo niedawno, a opublikowane wyniki prezentuję tutaj jako część moich osiągnięć zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego [A-17: Cudjoe E., Bojko B., de Lannoy I., Saldivia V., Pawliszyn J. (2013) Solid Phase Microextraction: Complementary *in vivo* sampling tool to microdialysis. *Angewandte Chemie International Edition*, w druku DOI: 10.1002/anie.201304538]. Szczegółowe informacje o projekcie znajdują się w punkcie 4.3.2.2 autoreferatu (Celowana i niecelowana metabolomika mózgu nieskrępowanych i pozostających w pełnej świadomości szczurów).

- Supelco (Sigma-Aldrich) and PAS Technology

Część moich obowiązków w University of Waterloo obejmuje kontakt z firmami produkującymi urządzenia do SPME: Supelco (oddział Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA) oraz PAS Technologies (Magdala, Germany). Moim zadaniem jest zapewnienie odpowiedniej komunikacji pomiędzy firmami i studentami odpowiedzialnymi za ewaluację prototypów produktów, korekta raportów wysyłanych do tych firm oraz testowanie produktów w projektach klinicznych. W ramach tej współpracy zostałam zaproszona do wygłoszenia wykładu pt. “Recent developments for

biocompatible and *in vivo* SPME” podczas seminarium Innovative Technologies for Chromatography & Sample Prep (Toronto, 26.05.2010) przygotowanego przez Sigma-Aldrich dla klientów firmy. Ponadto, w roku 2012 byłam współinstruktorem podczas kursu organizowanego przez Sigma-Aldrich China (Szanghaj, 31.07.2012).

- Ionics Mass Spectrometry and Ion Sense

Ostatnio jednym z głównych nurtów badawczych nad zastosowaniem SPME w aplikacjach klinicznych jest opracowanie urządzenia do szybkiej diagnostyki na bazie SPME i spektrometru masowego. W ramach swoich obowiązków poszukiwałam partnera przemysłowego z gałęzi zajmującej się spektrometrią masową w celu opracowania „rozwiązania gotowego do użycia” w klinice. Podczas swoich spotkań z potencjalnymi partnerami prezentowałam otrzymane dotychczas wyniki naszej pracy i proponowany plan przyszłej współpracy. Dotychczas udało się nam nawiązać współpracę z Ionics Mass Spectrometry (Bolton, Kanada), producentem najczulszych spektrometrów masowych typu potrójny kwadrupol przygotowanych do pracy w środowisku szpitalnym, oraz Ion Sense (Saugus, USA) – producentem Direct Analysis in Real Time (DART), które jest jedną z nowoczesnych metod jonizacji stosowanych w spektrometrii masowej.

- Firmy medyczne i farmaceutyczne

Obecnie pracuję nad nawiązaniem kontaktu z jedną z firm produkujących urządzenia medyczne w celu zbudowania łatwego w użyciu przyrządu do badań SPME “on-site”.

5.2.21. Współpraca z jednostkami naukowymi

- Śląski Uniwersytet Medyczny: Zakład Toksykologii i Ochrony Zdrowia w Środowisku Pracy w Katowicach, Oddział Chirurgii Ogólnej i Bariatrycznej i Medycyny Ratunkowej w Zabrze oraz Katedra Chemii w Zabrzu

Jednym z dążeń moich badań nad wpływem kwasów tłuszczowych na wiązanie lek-białko prowadzonych w Śląskim Uniwersytecie Medycznym było zastosowanie protokołu opracowanego na modelowym układzie do analizy próbek pobranych od pacjentów z zaburzeniami poziomu kwasów tłuszczowych. W tym celu nawiązałam współpracę z kilkoma jednostkami w obrębie ŚUM: : Zakładem Toksykologii i Ochrony Zdrowia w Środowisku Pracy w Katowicach, Oddziałem Chirurgii Ogólnej i Bariatrycznej i Medycyny Ratunkowej w Zabrzu oraz Katedrą Chemii w Zabrzu. Nasi współpracownicy ze szpitala dostarczyli osocze od pacjentów zakwalifikowanych do

chirurgicznego usunięcia żołądka, a naukowcy z Katedry Chemii wyizolowali i oczyścili albuminę. Jednak, ze względu na podjęcie pracy w University of Waterloo nie mogłam kontynuować pracy nad projektem i badania przejęła koleżanka z Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej, dzięki czemu projekt został zakończony, a wyniki opublikowane w in Spectrochimica Acta Part A [C-27: Maciążek-Jurczyk M., Sulkowska A., Bojko B., Równicka-Zubik J., Szkudlarek-Hasnik A., Zubik-Skupien I., Gora A., Dubas M., Korzonek-Szlacheta I., Wielkoszynski T., Urawinski W., Sosada K. (2012) The influence of fatty acids on theophylline binding to human serum albumin. Comparative fluorescence study. Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy 89:270-5].

- Department of Anesthesia and Pain Management, Toronto General Hospital oraz Department of Pharmacology, University of Toronto

Jak wcześniej wspomniano, podczas mojej pracy w University of Waterloo nawiązałam współpracę z the Department of Anesthesia and Pain Management aby mieć możliwość zastosowania SPME w badaniach klinicznych. Projekty te prowadzone wraz z anestezyjologami z Toronto General Hospital, flagowej instytucji medycznej w Kanadzie, angażowały także farmakokinetyków z Department of Pharmacology, University of Toronto. Wyniki pierwszego projektu dotyczącego oznaczania kwasu traneksemowego z zastosowaniem SPME u pacjentów poddanych operacji kardiologicznej z wykorzystaniem sztucznego płuco-serca, wyznaczania profilu farmakokinetycznego leku oraz badań metabolicznych w tej grupie pacjentów zostały już opublikowane w kilku czasopismach, a wspomniane artykuły są przedstawione jako część moich osiągnięć zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego. Szczegóły dotyczące poszczególnych części projektu przedstawiono w punkcie 4.2.2 autoreferatu (Zastosowanie SPME do terapeutycznego monitorowania leku i badań farmakokinetycznych) i 4.3.1.1 (Analiza metabolomu osocza ludzkiego). Obecnie pracujemy nad przygotowaniem artykułu o użyciu SPME do profilowania metabolicznego i równoległego pomiaru stężenia bromku rokuronium u pacjentów po transplantacji ortotropowej wątroby (orthotopic liver transpantation). Trwają również badania nad farmakokinetyką kwasu traneksemowego u pacjentów z różnym stopniem niewydolności nerek poddanych operacji kardiochirurgicznej z użyciem systemu płuco-serca z uwzględnieniem pacjentów tzw. wysokiego i niskiego ryzyka.

Niedawno rozpoczęliśmy również nowy projekt we współpracy z Malignant Hyperthermia Investigation Unit w Department of Anesthesia and Pain Management nad profilowaniem

metabolicznym mięśni pacjentów z hipertermią złośliwą (Malignant Hyperthermia, MH) i opracowaniem alternatywnego narzędzia/testu diagnostycznego w oparciu o badania *in vivo* SPME. W projekcie poszukujemy nowych, bardziej selektywnych biomarkerów choroby, ale także porównujemy profil biochemiczny pacjentów z wynikami testu skurczu mięśnia (caffeine-halothane contracture test, CHCT) i testu genetycznego. Ponieważ podłoże choroby nie jest w pełni poznane ze względu na ograniczenia obecnie stosowanych testów diagnostycznych, a badania metaboliczne są limitowane na skutek ograniczonego dostępu do próbek mamy nadzieję, że wyniki naszych badań dostarczą nowych informacji o mechanizmach hipertermii złośliwej, a zaproponowany protokół poprawi wskaźnik diagnostyczny choroby i umożliwi zastąpienie bardzo inwazyjnej biopsji mięśni.

- Department of Surgery, Toronto General Hospital (TGH) oraz Latner Thoracic Surgery Research Laboratories, Toronto General Research Institute

Jak wyjaśniono wcześniej, badania *in vivo* z wykorzystaniem SPME są prawdopodobnie jedną z najbardziej obiecujących aplikacji technologii, ze względu na bardzo małą inwazyjność i brak konieczności poboru próbki. Ponieważ śródoperacyjna analiza tkanek jest powszechną praktyką, wykorzystanie *in vivo* SPME podczas operacji chirurgicznych wydawał się być najlepszym sposobem walidacji metody w praktyce. W celu wykonania takich eksperymentów nawiązaliśmy współpracę z dwiema grupami chirurgów w Toronto General Hospital, którzy pracują nad nowatorską metodą prezerwacji płuc i wątroby przed przeszczepem. Pierwsze rezultaty opisujące analityczne aspekty pracy zostały właśnie zaakceptowane do publikacji [A-19: Bojko B., Gorynski K., Gomez-Rios G., Knaak M.J., Machuca T., Spetzler V.N. Cudjoe E., Hsin M., Cypel M., Selzner M., Liu M., Keshjavee S., Pawliszyn J. (2013) Solid Phase Microextraction fills the gap in tissue sampling protocols. *Analytica Chimica Acta*, zaakceptowane, DOI: 10.1016/j.aca.2013.08.031]; szczegóły przedstawiono w punkcie 4.3.2.3 autoreferatu (Zastosowanie SPME do oceny funkcji organów podczas transplantacji). Kolejne manuskrypty odnoszące się do wyników natury medycznej są częściowo w przygotowaniu, a częściowo zostały już wysłane do czasopism.

Kolejny aktualnie realizowany projekt jest związany z użyciem systemu perfuzji do chemioterapii nowotworów płuc *in situ*. W skrócie; torakochirurdzy stosują system opracowany do EVLP do perfuzji płuc podczas operacji u pacjentów z nowotworem płuc. Takie podejście nazwane zostało perfuzją płuc *in vivo* (*In vivo* Lung Perfusion, IVLP), a głównym założeniem projektu jest stosowanie wysokich dawek środka przeciwnowotworowego i ograniczenie jego dystrybucji jedynie

do płuc w celu uniknięcia ogólnoustrojowych efektów ubocznych. Żeby zoptymalizować dawkę i czas trwania perfuzji koniecznym jest wykonanie wielokrotnego pobrania próbki z różnych regionów płuca w różnych punktach czasowych. Jednak stosowanie standardowych metod preparatyki próbek, które wymagają pobrania materiału nie jest tu możliwe ze względu na wysoką inwazyjność powtarzanych biopsji. Dlatego, w celu oceny stężenia i dystrybucji leku oraz analizy zmian metabolicznych wywołanych chemioterapią stosujemy *in vivo* SPME.

- Katedra Chemii Medycznej i Katedra Chemii Organicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku

Obecnie odnotowuje się ogromne zainteresowanie metabolomiką w badaniach klinicznych, a trend ten stał się siłą napędową zastosowań SPME. Dlatego w laboratorium prof. Pawliszyna w University of Waterloo trwają intensywne prace nad opracowaniem najbardziej efektywnej metody opartej na platformie SPME-LC-MS do profilowania metabolicznego (punkt 4.3 autoreferatu) oraz innych analiz wielu związków jednocześnie metabolicznego (punkt 5.2.14 autoreferatu). Pomimo różnorodnych protokołów preparatyki próbek i platform analitycznych wykorzystywanych w metabolomice jednym z problematycznych etapów tych badań jest identyfikacja metabolitów różnicujących i potencjalnych biomarkerów. Dlatego, korzystając z prowadzenia różnorodnych projektów w laboratorium w University of Waterloo i dostępności do licznych standardów stosowanych w badaniach metabolicznych oraz substancji dopingowych, nasze zespoły z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku i University of Waterloo rozpoczęły projekt nad opracowaniem modelu ilościowej zależności pomiędzy strukturą związku i jego retencją (quantitative structure-retention relationships, QSRR) w celu przewidywania czasu retencji związków małowcząstkowych: endogennych metabolitów i tzw. substancji zakazanych na kolumnie chromatograficznej. Wyniki tych badań zostały niedawno opublikowane [C-28: Goryński K, Bojko B, Nowaczyk A., Buciński A, Pawliszyn J, Kaliszan R. (2013) Quantitative structure-retention relationships models for prediction of High Performance Liquid Chromatography retention time of small molecules: endogenous metabolites and banned compounds. *Analytica Chimica Acta* (w druku, DOI 10.1016/j.aca.2013.08.025)].

- Proteomics and Mass Spectrometry Facility, Nanyang Technological University, Singapur
We współpracy z Nanyang Technological University prowadzimy badania nad

profilowaniem metabolicznym melanoma przy użyciu technologii *in vivo* SPME. Razem z naukowcami z Proteomics and Mass Spectrometry Facility przeprowadziliśmy serię eksperymentów na myszach w celu znalezienia zmian wywołanych radioterapią. Obecnie pracujemy nad analizą danych i przygotowaniem manuskryptu.

5.2.22. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

- Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne 2005 - obecnie
- Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych 2005 - obecnie
- American Chemical Society 2010 - obecnie
- American Society for Mass Spectrometry 2010 - obecnie
- Metabolomics Society 2012 - obecnie

5.2.23. Inne funkcje

Pod nieobecność kierownika Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej pełniłam tę funkcję w semestrze zimowym 2006/2007.

5.3. Podsumowanie osiągnięć naukowych na dzień 02 października 2013

Osiągnięcia naukowe nie zgłoszone do postępowania habilitacyjnego:

Przed otrzymaniem stopnia doktora:

7 publikacji i 3 streszczenia opublikowane w recenzowanych czasopismach

Wskaźnik Impact Factor: **6.787**; Punktacja MNiSW: **121 (26.034 i 256 z abstraktami)**

Po otrzymaniu stopnia doktora:

30 publikacji

Wskaźnik Impact Factor: **57.257**; Punktacja MNiSW: **664**

Łączny Wskaźnik Impact Factor: **63.988 (83.291 z abstraktami)**

Łączna Punktacja MNiSW: **785 (920 z abstraktami)**

Osiągnięcia naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego:

Wskaźnik Impact Factor: **56.971**; Punktacja MNiSW: **425**

Łączny Wskaźnik Impact Factor: 120.959 (140.262 z abstraktami)

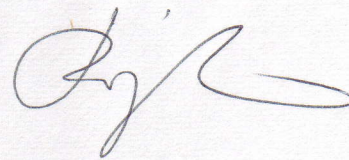
Łączna Punkcja MNiSW: 1210 (1345 z abstraktami)

Suma cytacji:

Według bazy Web of Science: **463 (391 bez autocytacji)**

Indeks Hirsch'a (h-index)

Według bazy Web of Science: **12**

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Bojko', written in a cursive style.