



Lucyna Konieczna

Omówienie cyklu publikacji pt.

**Analiza endogennych związków steroidowych
jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych wspomagana
nowoczesnymi narzędziami chemometrycznymi**

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2015

1. Imię i nazwisko: Lucyna Konieczna**2. Informacje wstępne o uzyskanych dyplomach i stopniach naukowych**

W latach 1985-1990 studiowałam na Wydziale Matematyki-Fizyki-Chemii Uniwersytetu Gdańskiego na kierunku Chemia. W roku 1990 obroniłam pracę magisterską pt. *„Badanie równowag dysocjacji kwasowej, homo- i heterokoniugacji kationowej w układach N-tlenków pochodnych pirydyny w N,N-dimetyloformamidzie i dimetylosulfotlenku”* pod kierunkiem dr hab. Zygmunta Warnke, uzyskując tytuł magistra chemii. Rozprawę doktorską zatytułowaną *„Wpływ płci na farmakokinetykę wybranych leków”* obroniłam 30 marca 2004 roku, uzyskując stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych. Pracę doktorską wykonałam w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (ówczesnej Akademii Medycznej), jej promotorem był kierownik katedry, prof. dr hab. Henryk Lamparczyk.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

W okresie od 02.09.1997 do 29.06.2004 roku byłam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego ówczesnej Akademii Medycznej (obecnie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego). Od 1 lipca 2004 roku do chwili obecnej pracuję na stanowisku adiunkta w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (wcześniejszej Akademii Medycznej w Gdańsku).

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

- a) **Tytuł osiągnięcia naukowego:** „Analiza endogennych związków steroidowych jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych wspomagana nowoczesnymi narzędziami chemometrycznymi.”

- b) **Wykaz monotematycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako osiągnięcie postępowania habilitacyjnego.** Informacje o udziale własnym, kopie prac, oświadczenia współautorów o ich udziale w publikacjach wieloautorskich umieszczone są w odpowiednich załącznikach.

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi cykl 8 publikacji dotyczących badań bioanalitycznych, których tematem przewodnim była zoptymalizowana analiza endogennych związków małowcząsteczkowych, jakimi są hormony steroidowe i rozważania ich jako potencjalnych biomarkerów chorób cywilizacyjnych, opracowania metodologii analitycznych dla rozdzieleń chromatograficznych i elektroforetycznych tych związków, z włączeniem przygotowania rzeczywistych próbek biologicznych w oparciu o nowe strategie analityczne z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi chemometrycznych. Wyniki badań (8 publikacji) zostały opisane w postaci monotematycznego cyklu, o łącznym współczynniku oddziaływania IF = **20,044** i wartości punktacji MNiSW = **225**. Przed doktoratem dorobek stanowiły 2 prace o wartości IF = **2,121** i **17** punktów KBN/MNiSW. Dorobek po doktoracie, poza cyklem objętym osiągnięciem habilitacyjnym, stanowi 26 prac oryginalnych o wartości IF = **39,059** i punktacji MNiSW = **478**, 2 rozdziały w podręcznikach z dziedziny biostatystyki, 2 prace popularnonaukowe i 1 redakcja pracy wieloautorskiej. Całkowity dorobek włącznie z pracami opublikowanymi przed doktoratem wynosi IF = **61,224** i **739,25** punktów MNiSW.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- H1. L. Konieczna***, T. Bączek, Plasma steroid level measured using modern separation techniques as biomarkers in biological diagnostics, *Curr. Pharm. Anal.*, 6 (2010) 164-181. (IF: 1,710; MNiSW: 13,0)

*Pełniłam funkcję autora korespondencyjnego

- H2. L. Konieczna**, A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Simultaneous determination of cortisol, cortisone and corticosterone in human plasma of parachutists in view of pharmacokinetic studies, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 33 (2010) 1613-1629. (IF: 0,953; MNiSW: 20,0)

H3. L. Konieczna*, A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Optimization of LC method for the determination of testosterone and epitestosterone in urine samples in view of biomedical studies and anti-doping research studies, *Talanta*, 83 (2011) 804-814. (IF: 3,794; MNiSW: 40,0)

*Pełniłam funkcję autora korespondencyjnego

H4. A. Plenis, **L. Konieczna**, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Simultaneous determination of urinary cortisol, cortisone and corticosterone in parachutists, depressed patients and healthy controls in view of biomedical and pharmacokinetic studies, *Mol. Biosyst.*, 7 (2011) 1487-1500. (IF: 3,534; MNiSW: 30,0)

H5. L. Konieczna, T. Bączek, M. Belka, A. Fel, M. Markuszewski, W. Struck, M. Markuszewski, R. Kaliszan, Steroid profiles as potential biomarkers in patients with urogenital tract cancer for diagnostic investigations analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 73 (2013) 108-115. (IF: 2,829; MNiSW: 30,0)

H6. L. Konieczna, M. Belka, T. Bączek, M. Ruszkowski, W. Struck, M. Markuszewski, R. Kaliszan, M. Markuszewski, Advanced assessment of the endogenous hormone level as a potential biomarker of the urogenital tract cancer. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 16 (2013) 463-472. (IF: 1,925; MNiSW: 25,0)

H7. I. Olędzka, A. Plenis, **L. Konieczna**, T. Bączek, Micellar electrokinetic chromatography for the determination of cortisol in urine samples in view of biomedical studies, *Electrophoresis*, 31 (2010) 2356-2364. (IF: 3,569; MNiSW: 32,0)

- H8.** T. Bączek, I. Olędzka, **L. Konieczna**, P. Kowalski, A. Plenis, Biomedical evaluation of cortisol, cortisone and corticosterone along with testosterone and epitestosterone applying micellar electrokinetic chromatography, *Sci. World J.*, 268120 (2012) 8s. (IF: 1,730; MNiSW: 35,0)

WPROWADZENIE

I. *Hormony steroidowe*

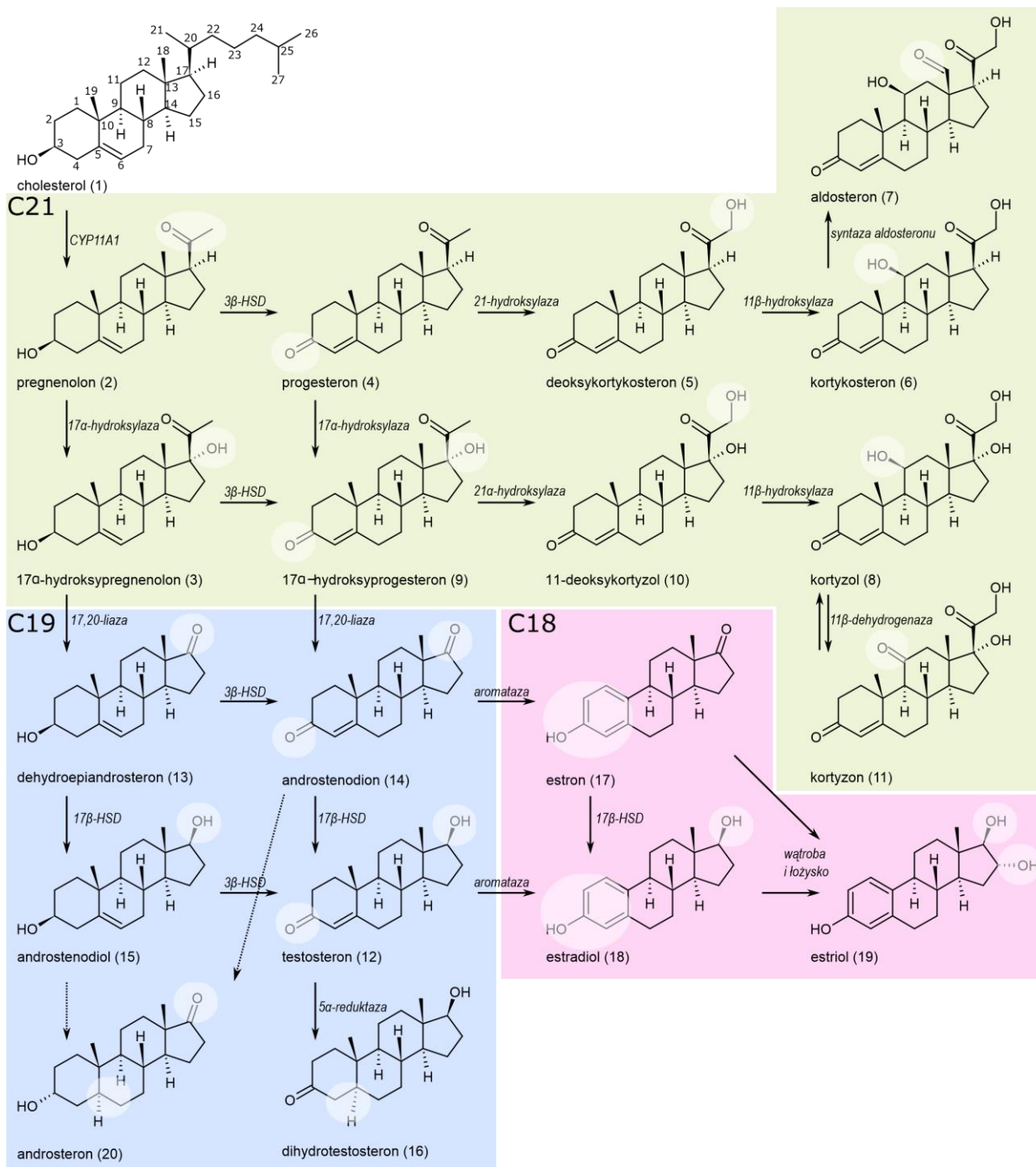
1. *Struktura i metabolizm*

Hormony steroidowe (steroidy), pochodne cholesterolu, są grupą aktywnych biologicznie związków, występującą u kręgowców. Do hormonów steroidowych zaliczamy hormony kory nadnerczy (glikokortykosteroidy i mineralokortykosteroidy) oraz hormony płciowe żeńskie (estrogeny i gestageny) i męskie (androgeny). Ich wspólną cechą jest czteropierscieniowy szkielet węglowy stanowiący pochodną cyklopentano-1,2-perhydrofenantrenu (**Ryc.1**). Prekursorem syntezy związków steroidowych jest **cholesterol (1)**, który w mitochondriach ulega przekształceniu do **pregnenolonu (2)**. Enzym CYP11A1, odłączający boczny łańcuch cholesterolu, katalizuje przemianę cholesterolu (związku o 27 atomach węgla w cząsteczce) do pierwszego steroidu o 21 atomach węgla, **pregnenolonu (2)**. **17 α -hydroksypregnenolon (3)** powstaje w wyniku hydroksylacji pregnenolonu w pozycji 17 α z udziałem enzymu 17 α -hydroksylazy. Równolegle **pregnenolon (2)** jest przekształcany do gestagenu – **progesteronu (4)** w reakcji z udziałem dwufunkcyjnego kompleksu enzymatycznego. Pregnenolon i progesteron są związkami wyjściowymi dla trzech grup steroidów: o **21 atomach węgla** – glikokortykosteroidów i mineralokortykosteroidów, o **19 atomach węgla** – androgenów oraz o **18 atomach węgla** – estrogenów (**Ryc. 2**). **Progesteron (4)**, poprzez hydroksylację przy C21, jest przekształcany do **deoksykortykosteronu (5)**, a następnie poprzez hydroksylację przy C11 ostatecznie do **kortykosteronu (6)**. Z kolei kortykosteron (**6**) w wyniku reakcji hydroksylacji i reakcji utleniania-redukcji przy C18, jest przekształcany do mineralokortykosteroidu, **aldosteronu (7)**. **Kortyzol (8)**, główny glikokortykosteroid, powstaje z **17 α -hydroksyprogesteronu (9)**, związkiem pośrednim w tym przypadku jest **11-deoksykortyzol (10)**. W tkankach obwodowych przemianę kortyzolu do **kortyzonu (11)** katalizuje dehydrogenaza 11 β -steroidowa. **Testosteron (12)** powstaje z pregnenolonu dwoma szlakami, $\Delta 5$ i $\Delta 4$, z udziałem związków pośrednich dla danego szlaku, odpowiednio

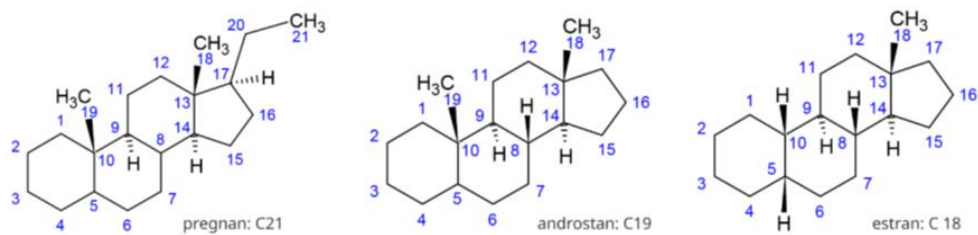
dehydroepiandrosteronu (13) i **androstendionu (14)**. Enzym CYP17A1 odpowiada za aktywność 17,20-liazy w szlaku $\Delta 5$ oraz za aktywność 17 α -hydroksylazy w szlaku $\Delta 4$. Epitestosteron, 17 α -izomer testosteronu jest wytwarzany z **pregnenolonu (2)** szlakiem $\Delta 5$ oraz szlakiem $\Delta 4$ z **5-androsteno-3 β ,17 α -diolu (15)** jako związku pośredniego. **Dihydrotestosteron (16)**, powstaje w wyniku obwodowego działania enzymu 5 α -reduktazy steroidowej. Żeńskie hormony płciowe, **estron (17)** i **estradiol (18)**, powstają z **testosteronu (12)** i **4-androsteno-3,17-dionu (14)** poprzez oksydacyjne usunięcie grupy metylowej przy C19 i dalszą aromatyzację pierścienia. Z kolei **dehydroepiandrosteron (13)** po przekształceniu do siarczanu, a następnie do 16-hydroksypochodnej, ulega ostatecznej przemianie do **estriolu (19)**. **Androsteron (20)**, jego $\beta 3$ -izomer, **epiandrosteron**, oraz $\beta 5$ izomer, **etiocholanolan** są produkowane z $\alpha 5$ zredukowanych metabolitów, a mianowicie **dehydroepiandrosteronu (13)**, **androstendiolu (15)** i **androstendionu (14)** [1].

2. Działanie i rola w patogenezie chorób

Działanie hormonów steroidowych oparte jest na ujemnym sprzężeniu zwrotnym osi podwzgórze – przysadka – nadnercza. Wszystkie hormony steroidowe wywierają hamujący wpływ na wydzielanie hormonu uwalniającego hormon adrenokortykotropowy (ang. *corticotropin-releasing hormone*, CRH) z podwzgórza oraz hormonu adrenokortykotropowego (ang. *adrenocorticotropin*, ACTH) z przysadki. W tym trójkątnym układzie dokonuje się dynamiczna wymiana informacji. Uważa się, że oś podwzgórze – przysadka – nadnercza jest jednym z głównych systemów zaangażowanych w rozwój płodowy oraz regulację zachorowań związanych ze stresem [2]. Hormony steroidowe wywierają wpływ na gospodarkę węglowodanową, białkową, lipidową i wodno-elektrolitową organizmu. Poza działaniem na metabolizm, wpływają także na czynność wielu narządów, np. zwiększają filtrację kłębuszkową i wzmagają diurezę, zwiększają skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych, potęgując w ten sposób działanie adrenaliny i noradrenaliny na naczynia krwionośne. Jednak nadmierne i długotrwałe uwalnianie hormonów steroidowych może spowodować trwałe uszkodzenie komórek hipokampa. Kliniką manifestacją zaburzeń funkcjonowania osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej, np. na skutek stresu, są zmiany funkcji biochemicznych organizmu, a także zaburzenia w wydzielaniu amin katecholowych (noradrenaliny, adrenaliny), co może skutkować wystąpieniem różnych chorób [3].



Ryc. 1. Szlak biosyntezy i struktury chemiczne głównych hormonów steroidowych.



Ryc. 2. Wyjściowe struktury hormonów steroidowych.

Prawidłowe oznaczenie poziomu steroidów ma kluczowe znaczenie dla zdiagnozowania wrodzonego przerostu nadnerczy, pozornego nadmiaru mineralokortykosteroidów, rodzinnego hiperaldosteronizmu typu I, pierwotnego hiperaldosteronizmu, zespołu Cushinga oraz niewydolności nadnerczy [4]. Diagnostyka w oparciu o analizę poziomu steroidów odgrywa również istotną rolę w zaburzeniach różnicowania płciowego oraz funkcji gonad. Metabolizm steroidów jest brany pod uwagę w diagnozowaniu przedwczesnego dojrzewania gruczołów piersiowych u dziewcząt (*telarche*) oraz zespołu policystycznych jajników (ang. *polycystic ovary syndrome*, PCOS) [5].

Zaburzenia układu hormonalnego powiązane są z chorobami układu sercowo-naczyniowego. Jednym z hormonów, którego podwyższone, jak również obniżone stężenie we krwi stanowi cenny wskaźnik trwającego procesu chorobowego jest aldosteron [6,7]. Dobowe wydzielanie aldosteronu u osób z zastoinową niewydolnością serca wynosi nawet 400–500 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ w przeciwieństwie do osób zdrowych, u których ten poziom mieści się w zakresie od 100 do 175 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ [6]. Nadmierne wydzielanie tego mineralokortykosteroidu przez korę nadnerczy prowadzi do hiperaldosteronizmu pierwotnego określanego też mianem zespołu Conna (stężenie aldosteronu powyżej 680 $\mu\text{g}/\text{dobę}$). Nadprodukcja aldosteronu najczęściej spowodowana jest gruczolakiem nadnerczy lub idiopatycznym, obustronnym przerostem kory nadnerczy. Jego podwyższone stężenie prowadzi do zatrzymania sodu i wody w organizmie oraz wzmożonej utraty potasu z moczem, co w rezultacie skutkuje wzrostem ciśnienia tętniczego. Ponadto obserwuje się osłabienie mięśniowe, polidypsję, wielomocz, a nawet tężyczkę. Z kolei przeciwna sytuacja ma miejsce w przypadku niedostatecznego wydzielania aldosteronu, którego główną przyczyną może być pierwotna niedoczynność nadnerczy lub defekty enzymatyczne np. niedobór syntetazy aldosteronowej [8]. Pierwotna niewydolność nadnerczy jest jednostką chorobową, w której oznaczanie poziomu hormonów we krwi stanowi niezbędny element diagnostyczny.

W chorobie Addisona obserwuje się zmniejszone stężenie kortyzolu i wysoki poziom adrenokortykotropiny (ang. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) [4]. Jest to schorzenie autoimmunologiczne przebiegające z hiperkaliemią i hiponatremią, objawiające się osłabieniem organizmu, brakiem apetytu, spadkiem masy ciała, hipotonią ortostatyczną, bólem mięśni i stawów, a także ciemnieniem skóry w okolicach wystawianych na działanie promieni słonecznych. Choroba Addisona związana jest z bezpośrednim uszkodzeniem nadnerczy, natomiast w przypadku kiedy niewydolność nadnerczy spowodowana

jest nieprawidłową funkcją przysadki mamy do czynienia z wtórną postacią choroby. Wtórna niedoczynność kory nadnerczy wynika z niedoboru kortyzolu, którego przyczyną jest zmniejszone stężenie ACTH – hormonu przysadki odpowiedzialnego za stymulację kory nadnerczy do produkcji kortyzolu. Najczęściej niedostateczne wydzielanie ACTH jest następstwem długotrwałej terapii glikokortykosteroidowej. Objawy wtórnej niewydolności nadnerczy zbliżone są do symptomów towarzyszących chorobie Addisona, jednak ich narastanie jest zdecydowanie wolniejsze i zamiast ciemnienia skóry obserwuje się jej odbarwienie [4,9].

Kolejnym przykładem świadczącym o istotnej roli hormonów steroidowych jako elementu diagnostycznego w patogenezie chorób jest zespół Cushinga. Jest to zespół objawów związanych z nadmiernym wydzielaniem kortyzolu przez korę nadnerczy (hiperkortyzolemia). Wyróżnia się dwie postaci zespołu Cushinga: niezależną i zależną od ACTH. Postać niezależna określana jest też jako pierwotna nadczynność kory nadnerczy i jej główną przyczyną jest obecność guza nadnerczy. Natomiast postać zależna od ACTH, czyli wtórna nadczynność kory nadnerczy (choroba Cushinga) spowodowana jest nadprodukcją hormonu adrenokortykotropowego przez gruczoł przysadki [10]. Dodatkowo hiperkortyzolemia może być wynikiem przewlekłego przyjmowania leków glikokortykosteroidowych. Do najbardziej typowych objawów tej choroby zalicza się: otyłość i związane z nią nadmierne gromadzenie się tkanki tłuszczowej w okolicy nadbrzojowej tzw. „bawoli kark” oraz twarzy („twarz księżycowata”), czerwone lub czerwonosine rozstępy na skórze brzucha, bioder, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, osteoporoza, hirsutyzm, osłabienie mięśniowe, a także zaburzenia emocjonalne [9,11].

Warto również wspomnieć jak ważną funkcję pełni oznaczanie poziomu hormonów steroidowych przy rozpoznawaniu zaburzeń czynności gonad. W przypadku nieprawidłowego funkcjonowania gonad żeńskich, któremu towarzyszy brak miesiączki oraz niski poziom estrogenów z jednoczesnym zwiększonym stężeniem hormonów gonadotropowych mówimy o pierwotnej niewydolności jajników. Natomiast jeżeli wraz z hipoestrogenizmem obserwuje się obniżone poziomy hormonu luteinizującego (LH) i hormonu folikulotropowego (FSH), wówczas jest to wtórna niewydolność jajników spowodowana najczęściej chorobami układu podwzgórzowo–przysadkowego. Z kolei niski poziom estrogenów, progesteronu i FSH oraz towarzyszące mu podwyższone stężenie androgenów i hormonu luteinizującego świadczą o występowaniu zespołu PCOS [5]. Choroba ta charakteryzuje się przede wszystkim zaburzeniem miesiączkowania, nadmiernym owłosieniem ciała, trądzikiem, otyłością oraz niepłodnością. W przypadku

chorób jąder, zmniejszone wydzielanie androgenów przy nadmiernym stężeniu gonadotropin przysadkowych wskazuje na występowanie hipogonadyzmu hipergonadotropowego. Natomiast hipogonadyzm przebiegający z niedostatecznym wydzielaniem gonadotropin określany jest mianem hipogonadyzmu hipogonadotropowego [5]. Wystąpienie tego zaburzenia przed okresem pokwitania związane jest z brakiem cech dojrzewania płciowego, obniżeniem nastroju, niepłodnością, ginekomastią oraz eunuchoidalną budową ciała – wysoki wzrost, nadmiernie długie kończyny, małe prącie, moszna i jądra, a także brak owłosienia płciowego i zarostu na twarzy. Z kolei niedobór androgenów pojawiający się po okresie dojrzewania płciowego objawia się zanikiem mięśni, wypadaniem owłosienia łonowego i otyłością gynoidalną. Podsumowując, w diagnostyce chorób jajników i jąder niezbędnym badaniem laboratoryjnym jest określenie zawartości w surowicy krwi: estradiolu, testosteronu, androstendionu, siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEA-S) jak również gonadotropin przysadkowych – lutropiny (LH) i folikulotropiny (FSH). Ponadto u kobiet oznacza się dodatkowo poziom 17 α -hydroksyprogesteronu, a u mężczyzn 5-dihydrotestosteronu [11].

Literatura dotycząca wpływu endogennych hormonów steroidowych na występowanie nowotworów jest niespójna [12-13]. Wysłunięto hipotezę o powiązaniu hormonów steroidowych z procesem kancerogenezy [13-14] w odniesieniu do takich nowotworów jak: rak piersi [15], prostaty [16], endometrium, jajnika, szyjki macicy [17], jądra [18], tarczycy [19] i kostniakomięsaka [20]. Jednakże etiologia nowotworów pęcherza moczowego i nerek jest nadal przedmiotem dyskusji [21]. Z jednej strony odnotowano, że hormony steroidowe są związane z rakiem pęcherza [22], z drugiej zasugerowano, że hormony płciowe mogą wpłynąć na zaawansowane stadium raka pęcherza moczowego, przy czym sugeruje się znacznie większy wpływ androgenów niż estrogenów [23].

3. *Bioanaliza hormonów steroidowych*

Początkowo, hormony steroidowe oznaczano za pomocą testów immunologicznych, które oferowały prostotę wykonania i możliwość szybkiego uzyskania wyników. Testy te posiadały szereg wad, gdyż cechowała je niska specyficzność, a bardzo zbliżona struktura endogennych hormonów steroidowych powodowała uzyskiwanie wyników fałszywie zawyżonych. Silnie zaznaczony był również wpływ matrycy. Dodatkowo, aby uzyskać kompletny profil steroidowy, konieczne było wykonanie wielu testów, ponieważ pojedynczy test pozwalał na oznaczenie wyłącznie jednego hormonu. Wiązało się to z koniecznością

pozyskania znacznej objętości próbki do analizy oraz wysokim kosztem procedury [24] Monitorowanie pacjenta w czasie długoterminowej terapii było przez to bardzo trudne.

W celu określenia profili steroidowych w różnych płynach biologicznych stosuje się obecnie szereg różnych technik separacyjnych, takich jak chromatografia gazowa (ang. *gas chromatography*, GC), chromatografia cieczowa (ang. *liquid chromatography*, LC) oraz elektroforeza kapilarna (ang. *capillary electrophoresis*, CE) [25-27]. Często stosuje się metody sprzężone ze spektrometrią mas bądź tandemową spektrometrią mas (ang. *hyphenated methods coupled to mass spectrometry*, MS lub *hyphenated methods coupled to tandem mass spectrometry*, MS/MS) takie jak: GC-MS, LC-MS, CE-MS bądź GC-MS/MS, LC-MS/MS i CE-MS/MS. Techniki łączone są obecnie rekomendowane zwłaszcza do analiz związków endogennych, umożliwiając nie tylko analizę ilościową, ale dodatkowo analizę tożsamościową ze względu na widmo mas [2,28-30]. Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas jest coraz bardziej rozpowszechnionym narzędziem w laboratoriach klinicznych i posiada potencjał, aby przewyciężyć ograniczenia testów immunologicznych. LC-MS oferuje specyficzność, dokładność, czułość oraz niską granicę wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD) i oznaczalności (ang. *limit of quantitation*, LOQ), jako niezbędne do niezawodnego pomiaru poziomu steroidów występujących w niskich stężeniach w płynach ustrojowych, rozszerzając zdolności diagnostyczne. Oprócz wysokiej wydajności, metoda ta wymaga minimalnej objętości próbki oraz stosunkowo prostej techniki jej przygotowania. Wszystkie te elementy czynią tę metodę atrakcyjną w zastosowaniach klinicznych. Co więcej, LC-MS umożliwia identyfikację oraz jednoczesne oznaczenie całego spektrum hormonów steroidowych, co jest szczególną zaletą w nowatorskim podejściu do analizy pełnych profili metabolicznych.

II. Biomarkery

1. Definicja i podział

Pojęcie „biomarker” pojawiło się po raz pierwszy w słowniku pojęć medycznych (ang. *Medical Subject Headings*, MeSH) w 1989 r [31]. W 2001 r. w Stanach Zjednoczonych Narodowy Instytut Zdrowia (ang. *National Institute of Health*, NIH) zdefiniował go jako „cechę, która jest obiektywnie mierzalna i może być zastosowana jako wskaźnik do oceny procesów biologicznych, patologicznych lub odpowiedzi organizmu na działania terapeutyczne” [32-35]. Na podstawie tej definicji można wnioskować, że markery są to substancje biologicznie aktywne, które odzwierciedlają zmiany zachodzące

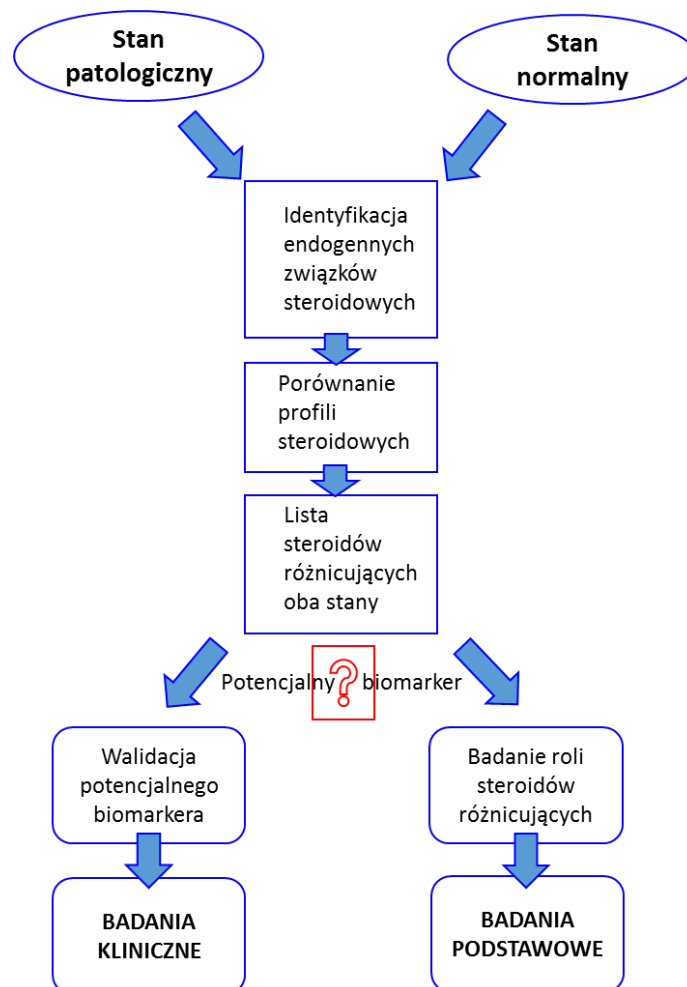
w organizmach żywych i dzięki temu mogą mieć wiele różnych zastosowań klinicznych, np. w diagnostyce medycznej w celu jak najwcześniejszego rozpoznania procesu chorobowego oraz w doborze skutecznej terapii farmakologicznej, pozwalającej na uniknięcie skutków ubocznych wynikających z niewłaściwego leczenia.

Idealny biomarker powinien charakteryzować się takimi cechami jak: (1) ekspresja, czyli modyfikacja potranslacyjna substancji stanowiącej biomarker, który powinien być specyficznym związany z określonym stanem patologicznym, czyli stanowić podstawę do zdiagnozowania danej choroby; (2) użyteczność w ocenie rokowań; biomarker powinien być związany z przebiegiem choroby i ulegać zmianom w trakcie jej trwania; (3) wykrywalność w łatwo dostępnym materiale biologicznym (krew, mocz, ślina, ewentualnie płyn mózgowo-rdzeniowy oraz tkanka); (4) możliwość jego oznaczenia w jak najmniejszej ilości próbki niezbędnej do analizy; (5) detekcja, która powinna być szybka, łatwa, dokładna, odpowiednio czuła; (6) powtarzalność obserwowanych zmian mierzonych w różnych warunkach laboratoryjnych wraz z wpływem czasu [33].

Związki endogenne spełniające powyższe kryteria mogą być stosowane jako biomarkery w badaniach przesiewowych dając możliwość wczesnego wykrycia choroby, kiedy brak jeszcze objawów klinicznych schorzenia, bądź też w celu wykrycia zagrożenia wystąpienia choroby [34].

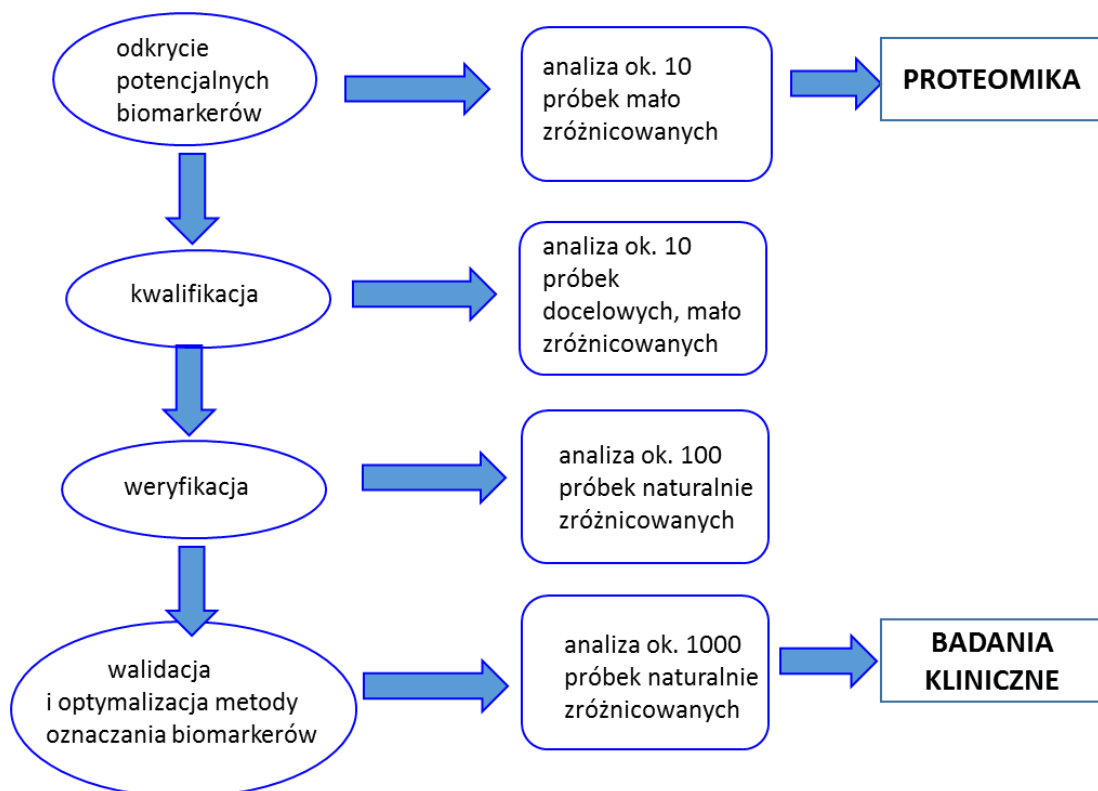
Istnieją różne klasyfikacje biomarkerów, według jednej z nich biomarkery można podzielić na cztery kategorie. Pierwszą grupę stanowią biomarkery **przesiewowe, diagnostyczne** (ang. *screening, diagnostic biomarkers*), które pozwalają na odróżnienie osoby zdrowej od chorej w pierwszym stadium choroby, gdy brak wyraźnych jej objawów. Tego typu biomarkery mają szczególne znaczenie, zwłaszcza w diagnostyce chorób nowotworowych, a badania przeprowadzone z ich wykorzystaniem obejmują całe populacje. Druga grupa obejmuje biomarkery **prognostyczne** (ang. *prognostic biomarkers*), celem zastosowania ich do monitorowania przebiegu choroby już wcześniej zdiagnozowanej, umożliwiając np. odróżnienie nowotworu łagodnego od złośliwego, czego konsekwencją jest wybór skutecznej terapii. Trzecią grupę stanowią biomarkery **predykcyjne** (ang. *stratification, predictive biomarkers*), określające reakcję pacjenta na podany lek celem uzyskania odpowiedzi na pytanie czy przed jego aplikacją lek będzie skuteczny dla danej osoby czy nie. Ten etap badań przeprowadza się na poziomie analizy DNA i specyficznych mutacji w obrębie określonych genów, np. w przypadku raka sutka. Kolejną grupę stanowią biomarkery **skuteczności**, (ang. *efficacy biomarkers*) pozwalające na kontrolowanie efektywności stosowanej terapii [32-33].

W celu odkrycia potencjalnego biomarkera bardzo ważnym etapem jest odpowiednie zaprojektowanie eksperymentu, mającego wskazać ewentualne jego wykorzystanie w praktyce klinicznej. W przypadku, gdy rola danej substancji endogennej jako biomarkera diagnostycznego zostanie potwierdzona poprzez wykazanie, że różnicuje stan normalny i patologiczny, to po zaplanowaniu i wykonaniu odpowiednich analiz np. chromatograficznych czy elektroforetycznych, może być zastosowana do diagnozowania danej choroby. Na tym etapie niezbędna jest właściwa walidacja proponowanej metody analitycznej, jak również oszacowanie przydatności potencjalnego biomarkera w praktyce klinicznej w oparciu o odpowiednią pod względem doboru i liczebności grupę pacjentów i grupę kontrolną. Schemat obrazujący złożony proces odkrywania biomarkerów przedstawiłam na **Ryc. 3**.



Ryc. 3. Proces odkrywania biomarkerów.

Implementacja biomarkera do praktyki klinicznej obejmuje cztery etapy. Pierwszym z nich jest odkrycie odpowiedniego kandydata, natomiast drugi etap obejmuje jego kwalifikację, czyli eliminację wyników fałszywie dodatnich. Kolejnym, trzecim etapem jest weryfikacja, a czwartym etapem jest walidacja biomarkera. Podczas tego procesu opracowana zostaje metoda oznaczania potencjalnych biomarkerów, które mogą zostać wykorzystane w praktyce klinicznej. Proces walidacji potencjalnego biomarkera przedstawiłam na **Ryc. 4**. Miarą wartości testu opartego na „steroidowym” biomarkerze, jest jego **czułość** (ang. *sensitivity*) i **swoistość** (ang. *specificity*). Przez czułość rozumiemy zdolność do wykrycia osób chorych wśród przypadkowej grupy pacjentów (ang. *true positive*) wyrażoną jako procent wykrytych przypadków do całkowitej liczby chorych. Swoistość oznacza zdolność potwierdzenia stanu prawidłowego, czyli możliwość poprawnego wykrycia osób nie cierpiących na daną chorobę (ang. *true negative*) wyrażoną jako procent pacjentów, u których nie stwierdzono choroby, do liczby zdrowych pacjentów.



Ryc. 4. Schemat walidacji potencjalnego biomarkera.

2. *Biomarkery w chorobach nowotworowych*

Badania nad biomarkerami związanymi z rozwojem lub obecnością nowotworu mają ogromne znaczenie dla pacjenta i lekarza, gdyż dają możliwość przewidywania wystąpienia choroby. Dotyczy to szczególnie chorób o podłożu genetycznym, w których analiza genomu pozwala na stwierdzenie czy u danego pacjenta występuje mutacja w genie i czy w związku z tym istnieje ryzyko wystąpienia choroby. Takie badania wpisują się w nowoczesny nurt genomiki – nauki z dziedziny biologii i biochemii. Przykładem zastosowania biomarkerów nowotworowych w genomice jest określenie mutacji w genie BRCA1 (gen odpowiedzialny za mechanizmy związane z naprawą DNA). Uzyskane wyniki bezpośrednio nie odpowiadają na pytanie, czy pacjentka na pewno nie zachoruje na raka sutka, ale określają wystąpienie predyspozycji do pojawienia się danej jednostki chorobowej i umożliwią lekarzowi przedsięwzięcie stosownych kroków w celu prewencji rozwoju choroby. Jak wynika z przeprowadzonych badań, pozytywny wynik obecności genu BRCA1 nie jest równoznaczny z ”wyrokiem” dla pacjenta w 20% [15,33-34].

Współczesna nauka niesie nadzieję na stworzenie „szytej na miarę” przeciwnowotworowej terapii indywidualnej, spersonalizowanej (ang. *personalized therapy, individual therapy*), tak aby najlepiej dobrać leki, które będą skuteczne dla pacjenta i nie będą obciążać jego organizmu nieskuteczną terapią. W tym celu duże znaczenie ma poszukiwanie nowych biologicznych markerów ściśle związanych z danym nowotworem. Badania **proteomiczne** i **metabolomiczne** budzą ogromne nadzieje, zarówno w aspekcie badań podstawowych jak i w wykorzystaniu biomarkerów w diagnostyce medycznej. Dla wielu nowotworów określono szereg potencjalnych biomarkerów, jakkolwiek częstym problemem jest potwierdzenie wykazanych zależności w badaniach klinicznych [33-34].

2.1. *Biomarkery w nowotworach układu moczowo-płciowego*

Do najczęściej występujących nowotworów **układu moczowo-płciowego** należą **nowotwór pęcherza moczowego, nerki, gruczołu krokowego** oraz **jądra**. Inne nowotwory układu moczowo-płciowego, takie jak nowotwór **nadnerczy, prącia, moczowodów** oraz **cewki moczowej** występują z mniejszą częstotliwością. W krajach rozwijających się

najczęściej rozpoznawanym nowotworem u mężczyzn jest rak gruczołu krokowego. Nowotwór pęcherza moczowego oraz nerki, to odpowiednio drugi i trzeci nowotwór układu moczowo-płciowego pod względem częstości występowania w Europie i Ameryce Północnej. Rak jądra pomimo iż występuje sporadycznie, pozostaje jednak najczęstszym nowotworem u mężczyzn poniżej 35 roku życia [35].

Techniki diagnostyczne nowotworu **prostaty** oraz **jądra** można określić jako względnie rozwinięte, a obecnie akceptowanym biomarkerem jest antygen gruczołu krokowego (ang. *prostate-specific antigen*, PSA). Jednak nie ma w pełni specyficznego biomarkera. W przeciwieństwie do powyżej opisanych nowotworów, obecnie brak jest klinicznie istotnych biomarkerów umożliwiających diagnozę **nowotworu nerki** lub **pęcherza moczowego**. W momencie rozpoznania choroby, u jednej czwartej pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego lub nerki stwierdza się miejscowo zaawansowany nowotwór lub nowotwór z przerzutami ze słabym rokowaniem (wskaźnik pięcioletniego przeżycia < 10%). Cytologia moczu pozwala na wykrycie z dużą dokładnością zaawansowanych zmian patologicznych, jednakże nie pozwala na skuteczne wykrycie nowotworu pęcherza moczowego we wczesnym stadium [36]. W ocenie statystycznej, badanie cytologiczne moczu może osiągnąć czułość tylko na poziomie 35%. Dla nowotworu nerki stosuje się diagnostyczne techniki obrazowania takie jak tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny oraz pozytronowa tomografia emisyjna. Jednak wykrycie guzów na wczesnym etapie jest trudne z powodu ich małego rozmiaru, nawet pomimo połączonego zastosowania wymienionych powyżej technik. Ponadto metody obrazowania charakteryzują się brakiem specyficzności. Około 10% zmian patologicznych zdiagnozowanych jako rak nerki okazuje się być zmianami łagodnymi [37]. Podsumowując powyższe rozważania, istnieje potrzeba opracowania nowych technik wykrywania nowotworów pęcherza moczowego oraz nerki, charakteryzujących się wysoką czułością i specyficznością.

2.1.1. Rak gruczołu krokowego

Wyzwaniem dla współczesnej medycyny jest jak najwcześniejsze wykrycie nowotworu gruczołu krokowego. Jednak obecnie stosowane metody diagnostyczne nie są w pełni wystarczające. Antygen gruczołu krokowego (ang. *prostate-specific antigen*, PSA) jest wytwarzany w gruczole krokowym, zaburzenia w obrębie tego organu często wiążą się z podwyższeniem jego stężenia. Jednakże PSA nie jest w pełni specyficzny wobec nowotworu gruczołu krokowego, stąd wielu pacjentów poddawanych jest niepotrzebnym biopsjom lub leczeniu łagodnych lub utajonych guzów. Z tego powodu konieczne jest

opracowanie bardziej specyficznej metody wykrywania nowotworu gruczołu krokowego, która byłaby uzupełnieniem w badaniach przesiewowych dla PSA. W ostatnim czasie uwaga badaczy skupia się na opracowywaniu szybkich i skutecznych metod analizy obecnych we krwi białkowych biomarkerów. Jednak z powodu heterogenności nowotworu gruczołu krokowego, jest oczywiste, że starania te stanowią ogromne wyzwanie. Każdy marker wymaga właściwej walidacji w celu zapewnienia jego użyteczności klinicznej. Należy zauważyć postęp w modyfikacji badania PSA (np. prędkość narastania, współczynnik gęstości, zawartość wolnego PSA wobec związanego, priizoformy), jakkolwiek ich użyteczność jest ograniczona [38]. Istnieje kilka potencjalnych markerów związanych z różnymi stopniami zaawansowania raka gruczołu krokowego, które wydają się w pewnym stopniu obiecujące. Wśród nich wyróżnia się: ludzką peptydazę 2 związaną z kalikreina (ang. *kallikrein-related peptidase 2*, KLK2), antygen nowotworu gruczołu krokowego (ang. *prostate cancer antigen*, PCA3), antygen wczesnego nowotworu gruczołu krokowego (ang. *early prostate cancer antigen*, EPCA), α -metylo-CoA racemazę (AMACR), antygen komórek macierzystych prostaty (ang. *prostate stem cell antigen*, PSCA) i pepsynę. Jednak konieczne są dodatkowe badania walidacyjne [39] oraz badania potwierdzające użyteczność kliniczną potencjalnych kandydatów na biomarkera [40], gdyż niekiedy podważa się ich obecny status [41].

2.1.2. Rak nerkowokomórkowy

Większość nowotworów nerki (około 90%) rozwija się w mięszu nerki, ta grupa nowotworów jest nazywana **rakami nerkowokomórkowymi** (ang. *renal cell carcinoma*, RCC). Częstość występowania RCC stale zwiększała się w ostatnim dwudziestoleciu w wielu krajach. Rak nerki jest ósmym spośród najczęściej występujących nowotworów w Wielkiej Brytanii. Każdego roku odnotowuje się 270 000 nowych przypadków, z tego 9000 w Wielkiej Brytanii. Rak nerki jest przyczyną śmierci ponad 100 000 osób rocznie na całym świecie [42].

U większości pacjentów (60 do 70%) stwierdza się miejscowe zmiany, a jako standardowe leczenie stosuje się częściową lub radykalną nefrektomię (chirurgiczne usunięcie nerki). Jednak nadal poszukuje się nowych biomarkerów RCC, które pozwolą na określenie subpopulacji pacjentów predestynowanych do osiągnięcia maksymalnych korzyści z danej terapii [42-43]. Istotne jest opracowanie klarownej i ustandaryzowanej metodologii, aby możliwe było zweryfikowanie właściwości prognostycznych i diagnostycznych potencjalnych kandydatów na biomarkery takich jak: **czynnik**

indukowany hipoksją (HIF- α), czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) [44], anhidraza węglanowa IX (ang. *carbonic anhydrase IX*, CAIX) [45-46], białko rybosomalne S6 (ang. *ribosomal protein S6*, pS6) [47] oraz kinaza białkowa B [48]. Należy zanczyć, że bardziej wnikliwe badania, jak w przypadku **szlaku selektywnego inhibitora kinazy ssaków mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*), podobnie jak dla **homologu fosfatazy i tensyny PTEN** (ang. *phosphatase and tensin homolog*) [47], poddały w wątpliwość ich wartość prognostyczną jako biomarkerów [48].**

2.1.3. Rak pęcherza moczowego

W roku 1999 zdiagnozowano ponad 50 000 nowych przypadków nowotworu pęcherza moczowego, choroba ta spowodowała śmierć około 12 500 pacjentów w Stanach Zjednoczonych. Częstość występowania nowotworu pęcherza moczowego wzrosła o 36% pomiędzy 1984 i 1993 r. Zmiany zapoczątkowane w komórkach przejściowych są przyczyną 90% zdiagnozowanych przypadków nowotworów pęcherza moczowego. W momencie diagnozy, u około 75% pacjentów występuje nowotwór powierzchniowy (T_a, T₁), u 20% inwazyjny nowotwór (o stopniu wyższym niż T₁), natomiast u 5% pacjentów obecne są przerzuty. Współczynnik nawrotu w przypadku nowotworu powierzchniowego wynosi ponad 60%, w ciągu 10 lat progresja guza na wyższe stadium lub wyższy stopień występuje u 42% pacjentów [49].

Ocena stadium i stopnia stanowią obecnie najbardziej wiarygodne zmienne dla oceny możliwości nawrotu i progresji choroby. U pacjentów z nowotworem stopnia T_a ryzyko progresji wynosi 4% (ryzyko nawrotu jest oceniane na 52%), natomiast w przypadku pacjentów z nowotworem stopnia T₁, ryzyko progresji wynosi 30%, a nawrotu 77% [50]. Testy wykrywające mikrohematurię, cytoscopia oraz cytologia moczu są powszechnie stosowanymi metodami wykrywania i monitorowania nowotworu pęcherza moczowego. Jednak postawienie diagnozy może być problematyczne, z powodu niespecyficznego charakteru większości objawów, takich jak ból w czasie mikcji oraz bezbolesny krwimocz. Pacjentów z tymi objawami można poddać rozległym badaniom urologicznym, które pozwalają jednak na wykrycie tylko niewielkiej ilości nowotworów. Powszechnie przyjętą metodą wykrywania guzów pęcherza moczowego jest cytoscopia, jednak wadą jest jej inwazyjność i wysoki koszt. Niedoskonałościami cytologii moczu są różnice osobnicze pomiędzy zmianami patologicznymi i ograniczony szybki dostęp do wyników. Główną wadą jest niewielka czułość metody, wynosząca od 20 do 40% w przypadku najczęściej występujących zmian niskiego stopnia, niezależnie od sposobu

pozyskania próbki. Cytologia moczu daje fałszywie pozytywne wyniki w 1-12% przypadków z powodu obecności stanów zapalnych, nietypowego urotelium oraz co najważniejsze, zmian spowodowanych przez chemio- lub radioterapię. Badanie to prowadzi również do uzyskania fałszywie negatywnych wyników w ok. 20% przypadków, nawet z guzami wysokiego stopnia. Konieczne jest więc określenie usprawnionych metod przewidywania, rozwoju i rokowania nowotworów powierzchniowych.

Do tej pory określono kilka markerów dla nowotworu pęcherza moczowego, jak białka macierzy jądrowej (ang. *nuclear matrix protein*, NMP22), fibryny/fibrynogenu (ang. *fibrin/fibrinogen degradation product*, FDP) oraz antygenu guza pęcherza (ang. *bladder tumor antigen*, BTA). Mimo, iż NMP22 zostało zatwierdzone jako badanie przesiewowe pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego, jednak z różną czułością w zakresie od 68% do 99%. Szereg badań wykazało specyficzność na poziomie 61% [51] oraz 85% [52] dla pacjentów z historią nowotworu pęcherza moczowego. Zgłaszano częste występowanie wyników fałszywie dodatnich w przypadku kamicy moczowej, łagodnego przerostu gruczołu krokowego oraz innych łagodnych zmian chorobowych w obrębie układu moczowego [53-55].

2.1.4. Rak jądra

Nowotwór zarodkowy jądra stanowi około 1% nowotworów występujących u mężczyzn oraz około 5% wszystkich nowotworów układu moczowo – płciowego. Częstotliwość występowania nowotworu jądra niemal podwoiła się w Europie w ciągu ostatnich 40 lat. Nowotwór jądra najczęściej występuje w postaci bezbolesnej masy wewnątrz moszny. Obowiązkowymi badaniami u pacjentów z podejrzeniem nowotworu jądra są: oznaczenie **α -fetoproteiny** (α FP), **gonadotropiny kosmówkowej** (ang. *human chorionic gonadotropin*, hCG) oraz **dehydrogenazy mleczanowej** (ang. *lactate dehydrogenase*, LDH) [56,57]. Jakkolwiek normalne poziomy tych markerów nie wykluczają obecności nowotworu jądra, podwyższony poziom markerów stwierdza się tylko u około 60% osób z nowotworem jądra, dlatego też każdy pacjent ze stwierdzoną masą wewnątrz moszny musi poddać się badaniu przez pachwinę. Poziom markerów nowotworowych jest również badany pomiędzy kolejnymi wizytami kontrolnymi, jednak czułość badań jest ograniczona. U około 40% pacjentów z nawrotem nowotworu jądra nie stwierdza się odstępstw w poziomie markerów [57]. Należy podkreślić, że podwyższony poziom hCG, a dokładnie podjednostki β (**β -hCG**) stwierdza się w obecności innych

nowotworów, takich jak: nowotwory neuroendokryne, pęcherza, nerki, płuc, głowy i karku, przewodu pokarmowego, szyjki macicy, macicy oraz sromu, w chłoniakach i białaczkach. Natomiast podwyższony poziom **dehydrogenazy mleczanowej (LDH)** stwierdza się u 40 – 60% pacjentów cierpiących na nowotwór zarodkowy, inaczej germinalny, (ang. *germ cell tumor*, GCT) jądra. LDH jest mniej czułym oraz mniej specyficznym markerem niż β -hCG, jednakże jest jedynym markerem, którego stężenie jest podwyższone w przypadku niektórych nasieniaków [57].

Powyższe potencjalne markery są głównie białkami, proces ich identyfikacji i oznaczenia ilościowego jest często skomplikowany i pracochłonny, stąd coraz częściej proponuje się podejście wielopłaszczyznowe i poszukiwanie wielu związków biomarkerowych jednocześnie na podstawie całych profili metabolicznych. Takimi potencjalnymi biomarkerami mogą być związki małowcząsteczkowe, np. hormony steroidowe, które można szybko i łatwo zidentyfikować za pomocą dostępnych technik bioanalitycznych.

III. Techniki stosowane w bioanalityce

Wybór strategii analitycznej zależy od klasy analizowanych związków i ich metabolitów, np. oznaczanie nukleozydów zaliczanych do biomarkerów chorób nowotworowych wykonuje się za pomocą technik elektromigracyjnych, w tym kapilarnej elektroforezy żelowej (ang. *capillary gel electrophoresis*, CGE), micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (ang. *micellar-electrokinetic chromatography* MEKC). Mimo wielu zalet, takich jak: krótki czas analizy, wysoka rozdzielczość, niewielkie zużycie rozpuszczalników organicznych, techniki elektromigracyjne [58] charakteryzują się niższą czułością w porównaniu z wysokosprawną chromatografią cieczową (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) [59], zwłaszcza w przypadku zastosowania detekcji spektrofotometrycznej. Dodatkowym kryterium wyboru techniki analitycznej jest szeroki zakres stężeń oznaczanych analitów (od niskich do wysokich), często też istnieje potrzeba dodatkowej ich identyfikacji. Wymagania te spełnia spektrometria mas, zwłaszcza wysokorozdzielcza spektrometria mas [60].

Technika micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC)

Technika micelarnej elektrokinetycznej chromatografii MEKC umożliwia rozdzielanie składników mieszanin w wyniku podziału tych składników pomiędzy micelle i bufor, zatem mechanizm rozdzielania w MEKC jest podobny jak w wysokosprawnej chromatografii ciekowej z odwróconym układem faz (ang. *reversed-phase* RP-HPLC). Kolejność migracji analitów obojętnych metodą MEKC powiązana jest z ich hydrofobowością, bardziej hydrofobowe silniej oddziałują z micelą co skutkuje ich wolniejszą migracją (dłuższym czasem migracji) w porównaniu do analitów hydrofilowych.

Chromatografia ciekowa połączona ze spektrometrią mas (LC-MS)

Spektrometry mas są urządzeniami coraz częściej stosowanymi w laboratoriach analitycznych w połączeniu z technikami separacyjnymi, w tym chromatograficznymi i elektromigracyjnymi. Typowa analiza MS jest skutecznym narzędziem identyfikacji związków chemicznych, pod warunkiem, że analizowana próbka nie jest zbyt złożona, w takim przypadku otrzymywane widma mas mogłyby być zbyt skomplikowane do interpretacji. Chromatografia ciekowa jest techniką wykorzystywaną w praktyce laboratoryjnej od ponad 100 lat. System LC-MS jest znacznie bardziej wydajnym narzędziem analitycznym niż każdy z nich wykorzystywany osobno. Podstawowymi zaletami technik łączonych są: jednoznaczna identyfikacja wielu składników próbki na podstawie widma mas, bardzo wysoka czułość układu analitycznego, wysoka powtarzalność pomiarów, możliwość analizy ilościowej (generowanie rzeczywistych pików chromatograficznych przez system LC, możliwość rozróżnienia substancji o identycznych masach cząsteczkowych, lecz innych czasach retencji (izomery, np. α - i β -estradiol) oraz możliwość uzyskania dodatkowych informacji o każdym ze składników próbki poprzez ich fragmentację i analizę widm fragmentacyjnych.

IV. Metody chemometryczne

Nowoczesne techniki analityczne pozwalają na gromadzenie licznych danych o dużej wymiarowości i złożoności. Z tego względu informacja na temat istnienia pewnych zależności pomiędzy danymi nie jest dla nas bezpośrednio dostępna, a jej skuteczna ekstrakcja wymaga użycia zaawansowanych technik przetwarzania i analiz wielowymiarowych. Chemometria jest dziedziną nauki zajmującą się wydobywaniem użytecznej informacji z wielowymiarowych danych pomiarowych, wykorzystującą metody

statystyki i matematyki [61]. Chemometria jest młodą dyscypliną nauki zdobywającą coraz szerszą popularność oferując pomoc na każdym etapie badań, pozwalającą na wyodrębnienie istotnych informacji poprzez chemiczną optymalizację procesu analitycznego, przetwarzanie danych, kalibrację, kontrolę jakości oraz organizację procesu analitycznego [62]. Przeprowadzone przeze mnie badania koncentrowały się na różnych aspektach eksploracji danych z wykorzystaniem narzędzi chemometrycznych przeznaczonych do tego celu. Doświadczalnie uzyskane przeze mnie dane chromatograficzne zostały poddane jednowymiarowej analizie statystycznej z wykorzystaniem testu t Studenta, jednoczynnikowej analizie statystycznej ANOVA lub testu U Manna-Whitney'a w zależności od rozkładu zmiennych [63]. W dalszym etapie do oceny danych zastosowałam analizę chemometryczną z użyciem wielowymiarowych technik statystycznych, takich jak **analiza składowych głównych** (ang. *principal component analysis*, PCA) [64-65], **analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów** (ang. *partial last squares*-, PLS) [66] i **analiza dyskryminacyjna (DA) z PLS** (ang. *partial last squares-discriminant analysis*, PLS-DA) [67], co pozwoliło na wybór związków reprezentujących najwyższą korelację ze stanem patologicznym. Jednym z fundamentalnych zadań chemometrii jest analiza gromadzonych danych i ekstrakcja użytecznej informacji w celu ustalenia wzajemnych zależności pomiędzy zmiennymi, a podstawowym narzędziem jest **regresja**. Najbardziej rozpowszechnioną metodą jest cząstkowa analiza dyskryminacyjna najmniejszych kwadratów **PLS**, która należy do grupy metod nadzorowanych („z nauczycielem”).

Metody eksploracji wielowymiarowych danych

Po wstępnym etapie przygotowania danych do analizy opartej np. na skalowaniu, kolejnym etapem jest poznanie ich struktury, zwłaszcza, gdy przedmiotem naszych badań jest analiza różnic pomiędzy próbkami. Zazwyczaj eksplorację danych wykonuje się metodą głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA) [65].

Analiza składowych głównych (PCA)

Analiza głównych składowych (PCA) należy do metod projekcyjnych [64,65], która umożliwia wizualizację danych dzięki ich kompresji do kilku tak zwanych czynników głównych, które maksymalizują opis wariancji danych. Wyodrębnione czynniki główne są ortogonalne i skonstruowane jako liniowe kombinacje zmiennych wyjściowych. Kilka pierwszych czynników głównych opisuje przeważającą część wariancji danych, wyjaśniając w ten sposób określony procent zmienności, co w dalszym etapie może posłużyć

do ich wizualizacji. Na podstawie uzyskanych projekcji obiektów na wybrane pary czynników głównych możemy ocenić strukturę danych. Dokonanie projekcji parametrów na płaszczyznę (w postaci wykresu) wybranych par czynników głównych dostarcza informacji na temat podobieństw między analizowanymi obiektami czy zmiennymi. Należy zaznaczyć, że PCA ze względu na modelowanie wariancji danych ujawnia ich strukturę, jednak nie zawsze można ją zinterpretować wykorzystując zmienne eksperymentalne.

Metody modelowania danych (kalibracja i klasyfikacja)

Metody kalibracji i klasyfikacji pozwalają na przewidywanie zmiennej zależnej na podstawie danych eksperymentalnych. Natomiast rodzaj zmiennej zależnej determinuje wybór metody używanej do modelowania danych. W zależności od charakteru zmiennej, konstruuje się model kalibracyjny bądź dyskryminacyjny. W przypadku zmiennej zależnej o charakterze ciągłym (np. opisuje stężenie składnika w próbkach), mówimy o modelu kalibracyjnym. Jeśli zmienna zależna ma charakter dyskretny, to znaczy przyjmuje jedynie pewne wartości (np. określa przynależność próbek do grup) mówimy o modelu dyskryminacyjnym.

Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS)

Metodę cząstkowych najmniejszych kwadratów można zastosować do procesów kalibracyjnych i dyskryminacyjnych [66]. W przypadku moich badań głównym zadaniem było poznanie różnic między badanymi grupami osób zdrowych i chorych opisanymi przez eksperymentalnie wyznaczone wartości zmiennych, np. poziomy stężeń endogennych hormonów steroidowych, prowadząc do konstrukcji modeli dyskryminacyjnych. W odróżnieniu od konstruowania modeli klasycznych możliwych w przypadku, gdy dane nie zawierają skorelowanych zmiennych, w metodzie PLS konstruuje się modele oparte na kilku tzw. ukrytych zmiennych wzajemnie ortogonalnych, które maksymalizują kowariancję między x a y . Podsumowując, metoda PLS umożliwia redukcję wielowymiarowych danych, a przez to również ich eksplorację. W moich badaniach analizy profili steroidowych do dyskryminacji grup próbek użyłam dyskryminacyjny wariant PLS, jakim jest analiza dyskryminacyjna cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS-DA) [67]. Metoda PLS-DA może być uznana za rozwinięcie idei analizy dyskryminacyjnej Fishera, w której zamiast oryginalnych zmiennych użyto zmienne ukryte. Inaczej mówiąc, PLS-DA umożliwiło skonstruowanie

takiej hiperpłaszczyzny w przestrzeni ukrytych zmiennych, która pozwoliłaby na odróżnienie badanych grup.

Zastosowane metody chemometryczne umożliwiły analizę wielowymiarowych danych dotyczących obiektów i mierzalnych cech w postaci wyników analiz chromatograficznych oraz pozwoliły na eksplorację i modelowanie danych, a tym samym na ekstrakcję użytecznych informacji w nich zawartych.

CEL BADAŃ

Dotychczasowe rutynowo oznaczane biomarkery, szczególnie toczonego się w organizmie procesu nowotworowego, są często niewystarczające do szybkiej, trafnej i precyzyjnej diagnozy.

Celem nadrzędnym przeprowadzonych przeze mnie badań było poszukiwanie nowych biomarkerów diagnostycznych stanów patologicznych organizmu, zwłaszcza chorób nowotworowych, w tym raka układu moczowo-płciowego i zaproponowanie małowzrostkowych związków endogennych, jakimi są hormony steroidowe, jako potencjalnych biomarkerów tych schorzeń. W ramach moich badań została opracowana nowatorska strategia analityczno-bioinformatyczna oparta na zoptymalizowanych metodach chromatograficznych i elektromigracyjnych, w tym wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) i chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS) z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi chemometrycznych. Rezultaty przeprowadzonych badań zostały opisane w ośmiu publikacjach [**H1-H8**] stanowiących spójny cykl przedstawionego osiągnięcia naukowego. W konsekwencji otrzymane wyniki mogą w przyszłości przyczynić się do szybszej diagnozy i monitorowania przebiegu leczenia, a w dalszym etapie pozwolą na zastosowanie terapii spersonalizowanej i lepszego zrozumienia procesu kancerogenezy. Osiągnięcie zamierzonego celu wymagało właściwego zaplanowania i realizacji celów cząstkowych:

- I. Opracowanie metody oznaczania hormonów steroidowych w **osoczu** krwi ludzkiej techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (**HPLC**) wraz z optymalizacją procedury ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej
 1. Dokonanie przeglądu dostępnej literatury naukowej pod kątem metodyk zastosowanych do oznaczania hormonów steroidowych w próbkach krwi;

2. Optymalizacja warunków oznaczania techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej;
 3. Optymalizacja procedury przygotowania próbki do analizy chromatograficznej;
 4. Ocena statystyczna uzyskanych wyników z wykorzystaniem analizy jednowymiarowej (testy statystyczne)
- II. Opracowanie metody oznaczania hormonów steroidowych w **moczu** ludzkim techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (**HPLC**) wraz z optymalizacją procedury ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej
1. Optymalizacja warunków oznaczania techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej;
 2. Optymalizacja procedury przygotowania próbki do analizy chromatograficznej;
 3. Ocena chemometryczna uzyskanych wyników z wykorzystaniem analizy jednowymiarowej (testy statystyczne) i narzędzi wielowariancyjnych, jak analiza głównych składowych (PCA).
- III. Opracowanie metody oznaczania hormonów steroidowych w **moczu** pacjentów ze zdiagnozowanym **nowotworem układu moczowo-płciowego** w oparciu o technikę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (**LC-MS**) obejmujące następujące etapy:
1. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego oraz warunków pracy detektora mas;
 2. Optymalizacja procedury przygotowania próbki do analizy chromatograficznej;
 3. Ocena chemometryczna uzyskanych wyników z wykorzystaniem analizy jednowymiarowej (testy statystyczne) i narzędzi wielowariancyjnych (PCA i PLS-DA).
- IV. Zastosowanie techniki micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (**MEKC**) jako alternatywnej metody oznaczania hormonów steroidowych w **moczu** osób uprawiających sport.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

- I. *Opracowanie metody oznaczania hormonów steroidowych w osoczu krwi ludzkiej techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wraz z optymalizacją procedury ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej*

[H1] L. Konieczna, T. Bączek, Plasma steroid level measured using modern separation techniques as biomarkers in biological diagnostics, *Curr. Pharm. Anal.*, 6 (2010) 164-181. (IF: 1,710; MNiSW: 13,0)

[H2] L. Konieczna, A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Simultaneous determination of cortisol, cortisone and corticosterone in human plasma of parachutists in view of pharmacokinetic studies, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol*, 33 (2010) 1613-1629. (IF: 0,953; MNiSW: 20,0)

We wstępnym etapie badań dokonałam przeglądu literatury naukowej obejmującej głównie lata 2000-2010 na temat hormonów steroidowych jako potencjalnych biomarkerów różnych stanów patologicznych organizmu oraz technik ich oznaczania w materiale biologicznym z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi separacyjnych [H1]. Zaburzenia homeostazy steroidów mogą być powiązane z występowaniem niektórych chorób, w tym nowotworów, stąd dokładny pomiar poziomu tych małocząsteczkowych związków jest uzasadniony i wymaga dedykowanych im strategii analitycznych. Celem tego opracowania było przedstawienie rozwoju i stosowania różnych metod analitycznych, opartych na technologii rozdzielania i używanych do oznaczania steroidów w laboratorium klinicznym, biorąc pod uwagę ostatnie postępy w tych obszarach [68-71]. W oparciu o dostępną literaturę, przedyskutowałam wady i zalety wysokosprawnej chromatografii cieczowej [59,60,69] stosowanej do analizy nietłucznych steroidów i ich estrów na tle innych technik separacyjnych [58,72]. Szereg technik i metodyk wykorzystanych do oznaczania hormonów steroidowych zostało porównanych i poddanych krytycznej dyskusji oraz rozważaniom pod kątem ich wymagań analitycznych, takich jak czułość, specyficzność, prostota wykonania, granica wykrywalności i oznaczalności. Wskazałam również, że coraz większe uznanie w aspekcie analizy jakościowej i ilościowej steroidów zyskuje technika spektrometrii mas [2,14,28-30], która dostarcza użytecznych informacji strukturalnych [H1]. Przy obecnym poziomie wiedzy i w świetle oczekiwań takich dziedzin nauki jak metabolomika czy proteomika (gdzie metabolom jest zbiorem substancji drobnocząsteczkowych o różnych właściwościach fizykochemicznych, będących elementami szlaków metabolicznych w badanym systemie: komórka, tkanka, organizm, zaś proteomika jest gałęzią nauki zajmującą się badaniem całościowego składu białkowego, ich

struktury, funkcji i wzajemnych zależności, również na poziomie komórki, tkanki, organizmu), analiza związków małowcząsteczkowych jako potencjalnych biomarkerów dla diagnozy, prognozy czy terapii choroby jest głównym celem **bioanalitiky** [33]. Dodatkowo, wielowymiarowość wzajemnych powiązań pomiędzy poszczególnymi elementami metabolizmu jest wyzwaniem dla naukowców, dążących do opracowania procedury analitycznej umożliwiającej analizę całych profili związków małowcząsteczkowych i ich metabolitów. Jako analiza oparta na strategii **celowanej** [73], polegającej na zamierzonym poszukiwaniu określonych substancji, których wzorcami dysponujemy, z pewnością będzie w przyszłości użyteczna dla analizy steroidów celem diagnozy wielu chorób i analiz toksykologicznych. W dalszych etapach może również wnieść nowe informacje dotyczące progresji choroby oraz jej etiologii [H1].

Metody statystyczne i matematyczne mogą pomóc w przewidywaniu wystąpienia choroby i jej następstw, poprzez porównanie profili steroidowych pacjenta w różnych okresach jego życia, stąd podobne do Światowej Agencji Antydopingowej (*World Anti-Doping Agency*, WADA) [74] promowanie stosowania swoistego rodzaju paszportu biologicznego z odnotowanymi poziomami endogennych steroidów. Profile związków małowcząsteczkowych wykonane w różnych okresach czasowych w życiu pacjenta mogą dostarczyć informacji na temat zapoczątkowania, progresji czy regresji choroby. Informacja ta jest szczególnie istotna w kontekście ogólnego wzrostu długości życia u ludzi oraz w świetle obecnej tendencji do gromadzenia dużej liczby danych z użyciem zaawansowanych narzędzi i analiz chemometrycznych swoistego szlaku analityczno-informatycznego.

Przy obecnym poziomie wiedzy na temat fundamentalnych procesów zachodzących w szlakach metabolicznych sugeruje się wielopłaszczyznowe podejście do diagnostyki zagadnień zmierzających do analiz nie tylko pojedynczej substancji, ale całych profili związków endogennych i zaproponowania kilku kandydatów na potencjalnych biomarkerów. Postuluje się również połączenie **celowanych** i **niecelowanych** strategii analitycznych [73], z włączeniem zaawansowanych analiz chemometrycznych i wiedzy analityków, chemików, chemometryków i lekarzy klinicystów. Jednakże dla **niecelowanego** podejścia analitycznego główną przeszkodą w bezpośrednim przełożeniu na pacjenta i klinikę jest obecnie niski poziom identyfikacji analitów [33,73]. Dlatego tematyka moich badań skupia się na analizie **celowanej** hormonów steroidowych, a w świetle potencjalnych możliwości diagnostycznych i rokowniczych w przebiegu chorób cywilizacyjnych jest ona nadal zagadnieniem otwartym i aktualnym [H1].

Opisany poniżej cykl prac [H2-H8] stanowi spójny zbiór dotyczący oznaczania **hormonów steroidowych** w rzeczywistych próbkach biologicznych pochodzących od osób zdrowych i pacjentów ze zdiagnozowanymi chorobami. Począwszy od **hormonów stresu**, kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu [H2] w **osoczu** krwi ludzkiej, analiza obejmowała również **hormony płciowe**, testosteron i epitestosteron w **moczu** [H3], **hormony stresu** w **moczu** [H4] dalej zwiększając ich liczbę o kolejne anality (kortyzon, kortykosteron), aby oznaczyć **hormony stresu** i hormony płciowe męskie (**androgeny**) i żeńskie (**estrogeny**) w moczu podczas jednej analizy [H5-H6]. Prace te wykonałam w oparciu o technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (LC-UV) [H2-H4] oraz w dalszym etapie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją mas (LC-ESI/MS) [H5-H6]. Alternatywnie oznaczyłam poziom hormonów steroidowych w próbkach moczu z zastosowaniem techniki micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) [H7-H8].

Zaletą metod chromatograficznych [H2-H4] w odniesieniu do metody elektroforetycznej [H7-H8] z zastosowaniem detekcji spektrofotometrycznej jest większa czułość, co jest niezwykle ważne dla analizy związków steroidowych, które fizjologicznie występują w płynach biologicznych na niskich poziomach stężeń. W każdym przypadku [H2-H6] opracowanie nowej metodyki analitycznej rozpoczynałam od jej optymalizacji w zakresie doboru parametrów istotnych dla rozdzielania chromatograficznego, takich jak: rodzaj fazy stacjonarnej, temperatura pracy kolumny, skład fazy ruchomej, szybkość jej przepływu oraz dobór warunków pracy detektora. Podczas optymalizacji metodyki analitycznej [H2-H6] korzystałam z programu komputerowego DryLab (Molnar-Institute, Berlin, Niemcy) w celu uzyskania szybszej i bardziej efektywnej separacji oznaczanych analitów. Opracowałam szybką i wydajną metodę jednoczesnego oznaczania kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu opartej na chromatografii cieczowej z detekcją UV (HPLC-UV) przy długości fali 240 nm [H2]. Właściwej separacji badanych analitów dokonałam na kolumnie chromatograficznej Nucleosil 100 C-18, 5 µm, o wymiarach 250 x 4 mm. Fazę ruchomą stanowiła dwuskładnikowa mieszanina acetonitrylu i wody (30:70 v/v), szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min. Proponowana metoda została zweryfikowana pod względem jej przydatności do analiz biomedycznych. We wszystkich eksperymentach badawczych dokonałam pełnej walidacji metody zgodnie z wymaganiami Międzynarodowej Konferencji do spraw Harmonizacji (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), Farmakopei Stanów Zjednoczonych (ang. *United States Pharmacopeia*, USP)

i amerykańskiej rządowej Agencji Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration, FDA*). Potwierdziłam, że zaproponowana metoda jest liniowa, specyficzna, precyzyjna i dokładna. W opisanych warunkach czasy retencji dla kortyzolu, kortyzonu, kortykosteronu i deksametazonu (wzorzec wewnętrzny) wynosiły odpowiednio: 8,98; 9,98; 20,08 i 15,65 min. Całkowity czas pojedynczej analizy wynosił 25 min [H2]. Przygotowane krzywe kalibracji ekstraktów osocza ludzkiego z dodatkiem analitów wykazały wprost proporcjonalny przyrost sygnału detektora wraz ze wzrostem stężenia badanych związków w próbce, w ten sposób wykazałam liniowość metody ze współczynnikiem korelacji $R > 0,9997$ dla wszystkich analitów. Stężenie każdego steroidu wyznaczono w zakresie od 2 do 300 ng/ml, a dokładność wynosiła od 95,10 do 103,88% dla kortyzolu, od 101,40 do 102,47%, dla kortyzonu i od 94,00 do 102,21% dla kortykosteronu. Uzyskałam dobrą powtarzalność ze współczynnikiem zmienności $RSD < 9,74\%$ dla wszystkich analizowanych związków z matrycy biologicznej. Granica oznaczalności (ang. *limit of quantification, LOQ*) dla kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu wynosiła 2 ng/ml.

Opisana metoda została z powodzeniem zastosowana do monitorowania poziomów trzech endogennych hormonów steroidowych w osoczu ludzkim [H2]. Badania przeprowadziłam z udziałem trzech zróżnicowanych grup osób: pierwsza obejmowała 20 zdrowych ochotników obojga płci, bez dużego wysiłku fizycznego (stanowiących grupę kontrolną), druga: osoby uprawiające sporty ekstremalne stanowiące unikatową grupę 10-ciu skoczków spadochronowych, przed i po wysiłku, oraz trzecia: 10 pacjentów ze zdiagnozowaną depresją. Zastosowana metoda jest prosta, niedroga i powtarzalna oraz daje możliwość dokładnego ilościowego oszacowania trzech analizowanych hormonów steroidowych. Zaproponowany przeze mnie sposób analizy okazał się odpowiedni do wielu zastosowań bioanalitycznych i może stanowić wiarygodną alternatywę do zastosowania opracowanej metodyki w rutynowej analizie steroidów w laboratorium klinicznym.

Przygotowanie próbki osocza do analizy chromatograficznej

Właściwe przygotowanie próbek do analizy jest etapem, który narażony jest na największą ilość błędów ze strony analityka [75-77], dlatego wymaga szczególnej uwagi i dokładności w wykonywaniu analiz. W trakcie przygotowania próbek można doprowadzić do zwiększenia jak i zmniejszenia stężenia analitów, może temu towarzyszyć przekształcenie analitów w pochodne oraz przeniesienie do innego rozpuszczalnika lub rozpuszczalnik może być całkowicie usunięty, również mogą być usunięte zanieczyszczenia.

Na podstawie przeprowadzonych badań [78] szacuje się, że według europejskich i amerykańskich analityków, 61% z nich uważa ten etap za bardzo ważny. Należy podkreślić, że 61% czasu całej analizy zajmuje wykonanie procedury przygotowania próbek do analizy i jednocześnie etap ten wnosi ok. 30% całkowitego błędu, z jakim analiza jest wykonywana.

Optymalizację etapu przygotowania próbki do analizy rozpoczęłam od przeprowadzenia ekstrakcji ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid extraction, LLE*) [H2]. W przypadku ekstrakcji LLE z zastosowaniem niemieszających się z wodą rozpuszczalników organicznych, zastosowałam dichlorometan, octanu etylu i chloroform jako dość lotne rozpuszczalniki organiczne o małej rozpuszczalności w wodzie. Wadą LLE jest zużycie znacznych ilości rozpuszczalników i stosunkowo mały współczynnik zateżenia przy różnej jakościowo i ilościowo ekstrakcji poszczególnych związków. Wydajność ekstrakcji nie była zadowalająca, dla poszczególnych analitów mieściła się w zakresie 62-84%.

Kolejnym etapem mojej pracy było przeprowadzenie ekstrakcji do fazy stałej (ang. *solid phase extraction, SPE*) z zastosowaniem różnych rozpuszczalników eluujących [H2]. Ekstrakcja do fazy stałej w przypadku analitów o właściwościach niepolarnych, jakimi są związki o budowie steroidowej, z polarnej matrycy ciekłej, jaką jest osocze krwi ludzkiej, okazała się bardziej wydajna w porównaniu z ekstrakcją ciecz-ciecz i wynosiła odpowiednio 92,5 do 98,7% przy zastosowaniu metanolu jako rozpuszczalnika wymywającego anality ze złoża C18. Ponadto metoda SPE charakteryzuje się mniejszym zużyciem organicznych rozpuszczalników w odniesieniu do ekstrakcji ciecz-ciecz, co czyni tę metodę bardziej ekonomiczną i bardziej przyjazną środowisku. Technika SPE pozwala również na zateżenie próbki, w konsekwencji możliwość uzyskania niższej granicy oznaczalności, co jest bardzo istotne zwłaszcza w odniesieniu do próbek biologicznych. Do każdej próbki osocza krwi o objętości 1 ml dodałam 4 ml wody destylowanej celem ich rozcieńczenia, po etapie wytrząsania przez 10 min, próbki odwirowano przy 3500 obr/min w czasie 15 min. Tak przygotowaną próbkę naniesiono na kolumnki SPE z niepolarnym wypełnieniem C-18 (1ml, 100 mg), wcześniej kondycjonowane dwukrotnie za pomocą 3 ml metanolu i 3 ml wody. Następnym etapem było przemycie złoża z użyciem 2 ml wody destylowanej celem pozbycia się ewentualnych zanieczyszczeń. Po etapie suszenia złoża anality eluowałam z użyciem 0,5 ml metanolu. Warstwę organiczną odparowałam na łaźni wodnej w temperaturze 45°C w atmosferze sprężonego powietrza. Suchą pozostałość rozpuściłam w 70 µl mieszaniny acetonitryl-woda (90 : 10, v/v). Próbki po odwirowaniu przy 10 000 obr/min w czasie 8 min poddałam analizie chromatograficznej z detekcją UV [H2].

Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Oszacowałam poziom kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu u 40 osób, podzielonych na 4 grupy: grupa kontrolna (20 osób zdrowych bez ekstremalnego wysiłku), 10 osób uprawiających sporty ekstremalne (przed i po skoku spadochronowym) i 10 osób ze zdiagnozowaną depresją [H2]. Poziom kortyzolu w badanej grupie kontrolnej wynosił: 116,93 ng/ml, otrzymany wynik jest zgodny z wcześniej opublikowanymi pracami [79-80]. Stężenie kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu u badanych kobiet z grupy kontrolnej (10 osób) wynosiło odpowiednio 108,39; 75,22 i 46,23 ng/ml, natomiast u 10 mężczyzn plasowało się odpowiednio na poziomie 125,48; 70,67 i 54,79 ng/ml. Zaobserwowałam wyższy poziom kortyzolu (182,38 ng/ml) i niższe stężenie kortyzonu (50,86 ng/ml) w osoczu 10 osób ze zdiagnozowaną depresją w porównaniu z grupą kontrolną, dla której wartości te wynosiły: 116,93 ng/ml (kortyzol) i 72,94 ng/ml (kortyzon), analogicznie do wcześniejszych doniesień literaturowych [81-83]. Analizę statystyczną przeprowadziłam za pomocą pakietu programów *Statistica 8,0* (StatSoft, Polska, Kraków). Analizę porównawczą uzyskanych poziomów trzech analizowanych hormonów steroidowych wykonałam z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. W pierwszym etapie oceniłam czy spełnione są założenia testu ANOVA. W tym celu sprawdziłam, czy zmienne wykazują rozkład normalny, za pomocą testu Shapiro-Wilka i Kołmogorova Smirnowa. Następnym krokiem mojej analizy było sprawdzenie jednorodności wariancji zmiennych (stężenie analitu w osoczu krwi). Po sprawdzeniu, że zmienne spełniają kryteria rozkładu normalnego i jednorodności wariancji, porównałam wartości stężeń analizowanych hormonów w poszczególnych grupach. Wyniki testu ANOVA statystycznie istotne różnice zaobserwowałam dla **kortyzolu** i **kortyzonu** w osoczu pomiędzy grupą kontrolną a skoczkami spadochronowymi przed wysiłkiem oraz pomiędzy grupą kontrolną a skoczkami spadochronowymi po skoku. Sytuacja ta jest związana ze wzmożonym stresem towarzyszącym sportowcom przed wykonaniem zadania związanego z wysiłkiem fizycznym podobnie jak podczas treningu, udziału w zawodach sportowych czy krótko utrzymującym się stresem tuż po wzmożonym wysiłku. Nie odnotowałam takich rozbieżności w odniesieniu do kortykosteronu i wykazałam brak statystycznie istotnych różnic we wszystkich badanych grupach w porównaniu z grupą kontrolną. Należy podkreślić wystąpienie znacząco istotnych różnic dla hormonów stresu (kortyzolu i kortyzonu) u sportowców po skoku i w grupie pacjentów z depresją [H2]. Z drugiej strony nie

odnotowałam zależności pomiędzy czynnikiem stresogennym a stosunkiem kortyzol/kortyzon przed i po wysiłku, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Gatti et al. dla rowerzystów przed i po wysiłku [84], ale sprzeczne z wnioskami opisanymi dla osób uprawiających judo [85]. Ponadto występują zmiany w poziomie hormonów stresu w sytuacjach lękowych, podwyższony poziom kortyzolu i kortyzonu w osoczu zauważono u kobiet z zaburzeniami depresyjnymi [86], natomiast moje wyniki badań wykazały brak takich zmian u mężczyzn [H2]. Należy zaznaczyć, że doniesienia literatury naukowej są niejednoznaczne, a nawet sprzeczne w aspekcie zależności stres a stany lękowe i depresyjne, co dowodzi, że ta kwestia wymaga dalszych analiz. Powyższe kontrowersje zainspirowały mnie do pojęcia tej tematyki badawczej tym bardziej, że zagadnienie poziomu stresu interesuje mnie również w kontekście zależności poziom stresu a nowotwory.

Podsumowując, potwierdziłam za pomocą testów parametrycznych (ANOVA, testy post-hoc) silniejszy wpływ wysiłku fizycznego na poziom kortyzolu i kortyzonu w osoczu krwi u sportowców niż w przypadku pacjentów cierpiących na depresję. Oceeniłam również zależność pomiędzy poziomem hormonów stresu w poszczególnych grupach dla kobiet i mężczyzn. Potwierdziłam znacząco istotne różnice w stężeniach hormonów stresu pomiędzy badanymi grupami obojga płci: grupa kontrolna a skoczkowie spadochronowi przed skokiem, grupa kontrolna a skoczkowie po wysiłku ekstremalnym oraz grupa zdrowych ochotników a kobiety z depresją.

W wyniku przeprowadzonego projektu stanowiącego pierwszy etap rozprawy habilitacyjnej, opracowałam metodę jednoczesnego oznaczania kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną [H2]. Separacja analizowanych hormonów steroidowych wymagała optymalizacji procedury przygotowania próbki do rozdzielania chromatograficznego, w wyniku której najbardziej wydajna okazała się ekstrakcja do fazy stałej z użyciem kolumnienek z niepolarnym wypełnieniem - żelem oktadecylosiloksanowym, czyli żelem krzemionkowym, którego wolne grupy OH zestryfikowano grupami oktadecyłowymi C18. Zastosowanie ekstrakcji SPE umożliwiło, odpowiednie oczyszczenie ze związków endogennych pochodzących z matrycy biologicznej oraz zatężenie próbki, aby osiągnąć jak najniższą granicę wykrywalności i oznaczalności. Ponadto użycie niepolarnego sorbentu C18, właściwego do zatrzymywania związków lipofilowych o charakterze niepolarnym (steroidy) z bardziej polarnych matryc (osocze rozcieńczone wodą), jest metodą wydajną, charakteryzującą się większym odzyskiem i mniejszym zużyciem rozpuszczalników organicznych w odniesieniu do tradycyjnej ekstrakcji ciecz-ciecz [H2].

Opracowana metoda HPLC-UV jednoczesnego oznaczenia hormonów stresu charakteryzowała się kilkoma zaletami: oznaczane anality nie zostały poddane kosztownemu i pracochłonnemu procesowi upochadniania, metoda wymagała stosunkowo niewielkiej ilości materiału biologicznego uzyskanego od pacjenta w ilości 1 ml osocza w porównaniu z wcześniejszymi doniesieniami [87] oraz charakteryzowała się krótszym czasem analizy w porównaniu z opublikowanymi metodykami opartymi na detekcji UV [79-86].

Zaproponowana metoda może być rutynowo stosowana w laboratorium analitycznym i klinicznym, jest prosta i szybka, i stanowi użyteczne narzędzie do oceny poziomu hormonów stresu nie tylko w osoczu, ale również w moczu pacjentów z zaburzeniami hormonalnymi, pacjentów z depresją i osób uprawiających sport [H2]. Dlatego metoda ta po pewnych modyfikacjach była podstawą oznaczeń w kolejnych pracach [H3 i H4].

II. Opracowanie metody oznaczania hormonów steroidowych w moczu ludzkim techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wraz z optymalizacją procedury ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej

[H3] L. Konieczna, A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Optimization of LC method for the determination of testosterone and epitestosterone in urine samples in view of biomedical studies and anti-doping research studies, *Talanta*, 83 (2011) 804-814. (IF: 3,794; MNiSW: 40,0)

[H4] A. Plenis, L. Konieczna, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Simultaneous determination of urinary cortisol, cortisone and corticosterone in parachutists, depressed patients and healthy controls in view of biomedical and pharmacokinetic studies, *Mol. Biosyst.*, 7 (2011) 1487-1500. (IF: 3,534; MNiSW: 30,0)

Biorąc pod uwagę ciągle zainteresowanie badaczy tematyką roli hormonów steroidowych w patogenezie różnych stanów chorobowych organizmu, o czym pisałam we wstępie, a także ich roli jako biomarkerów narażenia na stres [83], występowania stanów depresyjnych [81,86] oraz kontroli antydopingowej u sportowców [84,85], temat ten jest wciąż otwarty i aktualny. W świetle niespójnych, często przeciwstawnych [84-86] wniosków na temat poziomu hormonów zarówno u zdrowych jak i chorych osób [79] przeprowadziłam badania dotyczące oznaczania całkowitego poziomu **testosteronu** i **epitestosteronu** w **moczu** zdrowych ochotników [H3] i sportowców uprawiających lekkoatletykę. Zaproponowałam prostą i szybką metodę oznaczenia testosteronu i epitestosteronu w próbkach moczu techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC z detekcją spektrofotometryczną w warunkach izokratycznych, która umożliwiła oznaczenie zarówno

wolnej frakcji jak i całkowitego testosteronu i epitestosteronu u zdrowych ochotników, jak również u lekkoatletów celem wykrycia dopingu testosteronem [H3].

Dokonałam modyfikacji etapu przygotowania próbki moczu do analizy, Zastosowałam ekstrakcję do fazy stałej SPE, ale w tym przypadku w miejsce sorbentu C18 użyłam kolumnienek z wypełnieniem hydrofilowo-lipofilowym HLB (*ang. hydrophilic-lipophilic balance*), po uprzednim przeprowadzeniu hydrolizy moczu w środowisku kwaśnym ze stężonym 36% HCl w wysokiej temperaturze 95°C. Celem ekstrakcji SPE jest wyizolowanie analitów z matrycy w maksymalnie czystej i skoncentrowanej postaci, a zastosowanie takiego sorbentu jak kopolimer diwinylobenzenu i winylopirolidonu (HLB, Oasis), który charakteryzuje się dużą powierzchnią aktywną, jest dobrym wyborem do ekstrakcji analitów o różniących się właściwościach hydrofobowych z próbek polarnych w układzie odwróconych faz [80]. Elementem nowości było opracowanie metody oznaczenia całkowitego stężenia testosteronu i epitestosteronu oraz ich wolnej frakcji bez etapu hydrolizy, co znacznie skróciło czas przygotowania próbki do analizy chromatograficznej [H3]. Zastąpiłam elucję za pomocą dichlorometanu przez metanol. Dichlorometan powodował lepsze oczyszczenie matrycy, ale wykazywał o 25% niższą wydajność, dlatego wybrałam metanol, który jest rozpuszczalnikiem mniej toksycznym i przyjaznym środowisku [H3]. W opracowanych warunkach oznaczyłam poziom testosteronu i epitestosteronu w moczu. Separację analitów przeprowadziłam na kolumnie C18, która wykazała wystarczającą rozdzielczość dla lipofilowych związków jakimi są androgeny. Opracowana metoda została zweryfikowana i z powodzeniem zaaplikowana do rutynowych analiz poziomu testosteronu i epitestosteronu w **moczu** w grupie 116 zdrowych osób oraz w grupie 10 sportowców uprawiających lekkoatletykę [H3]. Należy podkreślić, że osoby uczestniczące w badaniu były w zbliżonym przedziale wiekowym od 20 do 28 lat, zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie czynnych sportowców. Wyniki stężeń testosteronu i epitestosteronu w moczu wykazały, że poziom testosteronu u sportowców był znacząco wyższy (170 ng/ml) niż u zdrowych ochotników (43,91 ng/ml), co wskazuje na podwyższony poziom testosteronu w korelacji z wysiłkiem fizycznym. Przeprowadziłam ocenę statystyczną uzyskanych danych pomiarowych z zastosowaniem parametrycznych testów (test t-Studenta i ANOVA) w przypadku rozkładu normalnego zmiennych i jednorodności wariancji oraz nieparametrycznego testu U Manna Whitney'a w przypadku braku rozkładu normalnego zmiennych. Wykazałam statystycznie istotne różnice dla testosteronu i epitestosteronu pomiędzy osobami z grupy kontrolnej a osobami czynnie uprawiającymi sport. Jednakże najistotniejsze pod względem znaczenia

klinicznego były korelacje pomiędzy intensywnym wysiłkiem fizycznym a sekrecją androgenów: testosteronu i epitestosteronu. Stosunek testosteronu do epitestosteronu wynosił poniżej 3, co wskazało na brak dopingu u badanych osób. Zasadność tych badań potwierdza fakt, iż testosteron i jego pochodne są często nadużywane ze względu na efekt anaboliczny u sportowców, dlatego opisana metodyka może być zastosowana do kontroli antydopingowej, stosunek T/ET jest markerem dopingu. Zwróciłam uwagę na znaczną rozpiętość w otrzymanych wynikach w obrębie grupy kontrolnej, co wskazało na dużą zmienność osobniczą potwierdzoną w tak licznej grupie zdrowych ochotników (116 osób) [H3].

Zmodyfikowaną metodę z wykorzystaniem innego składu fazy ruchomej, zastosowałam w badaniach oznaczenia poziomu hormonów stresu w **moczu** sportowców uprawiających sporty ekstremalne (skoki spadochronowe), pacjentów ze zdiagnozowaną depresją i w grupie kontrolnej [H4]. Osoby badane były w zbliżonym przedziale wiekowym od 21 do 32 lat. Oznaczyłam stężenie kreatyniny w moczu dla wszystkich uczestników badania, otrzymane wyniki poziomu hormonów stresu znormalizowałam w odniesieniu do wartości kreatyniny, ponieważ była to jednorazowa zbiórka moczu, a nie mocz całodobowy. Największe różnice odnotowałam po zastosowaniu testów post-hoc na poziomie istotności $p < 0,05$ pomiędzy grupą kontrolną a skoczkami spadochronowymi po wykonanym skoku. Uzyskane wyniki ANOVA potwierdziły, że największe różnice w przypadku kortyzolu, nieco mniejsze dla kortyzonu. Graficzna prezentacja dwu- i trójwymiarowych wykresów PCA [H4] pozwoliła zauważyć, że profile hormonów steroidowych u sportowców po skoku były odmienne (znacząco wyższe), co wskazuje na ich podwyższony poziom wywołany stresem. Odminną grupę stanowiły osoby z depresją, choć nie różniły w sposób znaczący, co wskazuje na niejednoznaczną zależność poziom stresu a depresja. Podsumowując przeprowadzone badania wskazują na odwrotną korelację poziomu stresu z depresją [H4] Oszacowane poziomy stężenie glikokortykosteroidów [H3-H4] mogą być traktowane jako potencjalne biomarkery narażenia na stres i zaburzenia depresyjne, co potwierdzono analizą za pomocą ANOVA. Metoda PCA pozwoliła na określenie struktury badanych obiektów i zmiennych, można było zauważyć subtelne różnice pomiędzy analizowanymi grupami, jednakże osoby z depresją nie stanowiły oddzielnego klasteru. PCA jest doskonałym narzędziem do analizy struktury obiektów i zmiennych, ale nie wystarczającym do wykazania różnic pomiędzy analizowanymi grupami, dlatego w kolejnych pracach [H5-H6]

zastosowałam metodę „z nauczycielem”, jaką jest analiza dyskryminacyjna cząstkowych najmniejszych kwadratów PLS-DA [67], której zalety wyjaśniłam we wstępie.

III. *Opracowanie metody oznaczania hormonów steroidowych w moczu pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem układu moczowo-płciowego w oparciu o technikę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS).*

H5. L. Konieczna, T. Bączek, M. Belka, A. Fel, M. Markuszewski, W. Struck, M. Markuszewski, R. Kaliszan, Steroid profiles as potential biomarkers in patients with urogenital tract cancer for diagnostic investigations analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 73 (2013) 108-115. (IF: 2,829; MNiSW: 30,0)

H6. L. Konieczna, M. Belka, T. Bączek, M. Ruszkowski, W. Struck, M. Markuszewski, R. Kaliszan, M. Markuszewski, Advanced assessment of the endogenous hormone level as a potential biomarker of the urogenital tract cancer. *Comb. Chem. High Throughput Screen* 16 (2013) 463-472. (IF: 1,925; MNiSW: 25,0)

Częstotliwość występowania chorób nowotworowych nieustannie się zwiększa. Jest to związane z jednej strony z wydłużeniem średniej długości życia oraz coraz silniejszym zanieczyszczeniem środowiska, co prowadzi do zwiększonej ekspozycji na kancerogeny. Diagnostyka nowotworów jest trudna, często niemożliwe jest wykrycie zmian na wczesnym etapie rozwoju, natomiast w przypadku zdiagnozowania zmian już zaawansowanych rokowania niejednokrotnie są złe. Terapia nowotworów jest kosztowna, zwłaszcza w przypadku stosowania leków biologicznych. Dodatkowym problemem w przypadku tych leków jest zróżnicowana odpowiedź pacjentów na leczenie. Zasadne i ważne jest poszukiwanie nowych metod diagnostycznych, jak i metod umożliwiających ocenę postępu choroby i skuteczności stosowanego leczenia. Nowotwory układu moczowo-płciowego występują często, zwłaszcza rak gruczołu krokowego, a obecnie proponowane biomarkery nie są w pełni specyficzne. Dlatego głównym celem projektów [H5-H6] była ocena wzajemnej zależności pomiędzy poziomem endogennych hormonów steroidowych a zachodzącym w organizmie procesem nowotworzenia - rakiem układu moczowo-płciowego (pęcherza moczowego, nerki, raka prostaty, jądra i innych). Głównym zadaniem była ocena i wykazanie potencjalnych zmian w profilach hormonów steroidowych (kortykosteroidów, androgenów i progestagenów) w moczu pacjentów ze zdiagnozowanym procesem nowotworowym w porównaniu z grupą kontrolną z wykorzystaniem techniki LC-ESI-MS w układzie faz odwróconych w warunkach elucji gradientowej. W drugim etapie

badania dokonałam oceny przydatności profili hormonalnych jako potencjalnych biomarkerów, z zastosowaniem jednowymiarowych narzędzi bioinformatycznych, takich jak jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, test t-Studenta oraz wielowymiarowych: analizy głównych składowych (PCA) wraz z algorytmem Kennarda-Stone'a i analizy dyskryminacyjnej metodą najmniejszych cząstkowych kwadratów (PLS-DA). Zastosowanie analizy chemometrycznej pozwoliło na wykazanie różnic w stężeniach endogennych hormonów steroidowych pomiędzy grupą kontrolną a grupą osób chorych na raka układu moczowo-płciowego. Przeprowadzone badania poziomu endogennych hormonów steroidowych mają swój wymiar praktyczny, gdyż mogą posłużyć w przyszłości jako przydatny, uzupełniający test diagnostyczny wczesnego wykrywania raka układu moczowo-płciowego [H5-H6].

Optymalizacja procedury przygotowania próbki moczu do analizy chromatograficznej

Optymalizacja procedury przygotowania próbki moczu do analizy LC-MS w porównaniu z pracą [H3] polegała na zastąpieniu etapu hydrolizy kwaśnej za pomocą 36% kwasu solnego, hydrolizą enzymatyczną z użyciem β -glukuronidazy, przebiegającą w sposób znacznie łagodniejszy i bardziej bezpieczny dla analizowanych związków o budowie steroidowej w moczu [H5-H6]. Przeprowadzenie etapu hydrolizy próbek moczu było niezbędne celem uwolnienia hormonów steroidowych z ich estrów do postaci wolnej, aby oznaczyć całkowitą ilość hormonów wydalanych w próbce moczu. Należy zaznaczyć, że tylko 2-3% endogennych hormonów steroidowych występuje w postaci wolnej, pozostałe występują w postaci estrów, stąd potrzeba przeprowadzenia hydrolizy [H3].

W początkowym etapie badań hydrolizę kwaśną moczu przeprowadziłam w wysokiej temperaturze 96°C w czasie 30 min. W takich warunkach nastąpiła transformacja związków steroidowych do ich utlenionych pochodnych [84]. Jednakże z analitycznego punktu widzenia procedura charakteryzowała się pewnym dyskomfortem w pracy analityka, gdyż w trakcie procesu hydrolizy pod wpływem wysokiej temperatury hydrolizat przybierał barwę granatowo-ciemno brązową, co utrudniało w efekcie otrzymanie klarownej próbki do analizy chromatograficznej. Stąd celem usunięcia ciemnego barwnika, do etapu przemywania sorbentu kolumnienek SPE, zastosowałam mieszaninę aceton-woda (30:70, v/v), co znacząco poprawiło wygląd próbki, przede wszystkim poprawiło jakość zarejestrowanych chromatogramów eliminując w znacznym stopniu piki pochodzące z matrycy biologicznej, co wpłynęło na lepsze oddzielenie analitów od „tła” próbki. Jednakże w świetle wyżej opisanych niedogodności, zdecydowałam się na przeprowadzenie

hydrolizy enzymatycznej z zużyciem β -glukuronidazy w ilości 20 μ l (Sigma, St. Louis, MO, USA) w celu zwiększenia specyficzności tej reakcji [H5-H6]. Próbkę moczu inkubowałam w temperaturze 37°C przez 22 godziny, dzięki czemu steroidy zostały uwolnione z połączeń z kwasem glukuronowym i można było oznaczyć sumę wolnych i związanych steroidów. Elementem nowości w porównaniu z poprzednimi pracami wchodzącymi w skład niniejszego cyklu habilitacyjnego było zastosowanie hydrolizy enzymatycznej, która przebiegała w obecności buforu fosforanowego (4 ml) o pH 5,2 oraz użycie bardzo małej objętości próbki moczu do analizy, która wynosiła 1 ml. Opisane wyżej warunki pH były niezbędne do zainicjowania i podtrzymania przebiegu reakcji enzymatycznej z β -glukuronidazą. Reakcję hydrolizy zatrzymałam poprzez dodanie 750 μ l 10% węglanu potasu. W dalszym etapie do elucji analitów ze złoża wykorzystałam metanol, następnie odparowałam rozpuszczalnik organiczny do sucha w warunkach niskiego ciśnienia w temperaturze 45°C w koncentratorze próżniowym (CentriVap, Labconco, Kansas City, MO, USA). Ten etap mający na celu zatężenie próbki może odbywać się albo w atmosferze gazu obojętnego, np. argonu czy azotu bądź w atmosferze obniżonego ciśnienia w stosunku do ciśnienia atmosferycznego (w warunkach próżniowych) [58,78], jak w moim przypadku, aby zapobiec utlenieniu czy degradacji analitów. Zmniejszone ciśnienie odpowiadające ciśnieniu przyjętemu dla średniej próżni (10^{-5} Pa) spowodowało, że metanol uległ odparowaniu w temperaturze 45°C, niższej o 19,7°C niż temperatura wrzenia metanolu w warunkach ciśnienia atmosferycznego (64,7°C). Zaleca się, aby próbka do analizy chromatograficznej była przygotowana w rozpuszczalniku odpowiadającym swoim składem kompozycji fazy ruchomej. W przypadku oznaczanych związków steroidowych suchą pozostałość po odparowaniu rozpuściłam w mieszaninie o przeważającym udziale składnika organicznego, w 150 μ l 70% metanolu, aby zapewnić dobrą rozpuszczalność analitów [77,78].

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń opracowałam nową metodę jednoczesnego oznaczenia endogennych związków steroidowych, w tym kortykosteroidów, androgenów i estrogenów, w złożonej matrycy biologicznej, jaką jest mocz, w krótkim czasie 10 minut (15 minut z uwzględnieniem ekwilibracji kolumny chromatograficznej) [H5-H6]. Optymalne warunki analizy pozwoliły na zrozumienie zjawisk zachodzących podczas rozdzielania chromatograficznego pomiędzy hydrofobowymi, niepolarnymi analitami a niepolarnym wypełnieniem kolumny z ziarnami o zwiększonych możliwościach rozdzielczych w układzie faz odwróconych z polarną fazą ruchomą. Optymalizacja etapu przygotowania próbki do analizy obejmowała przede wszystkim proces hydrolizy

enzymatycznej pod kątem ilości użytego enzymu, ilości pobranego materiału biologicznego, temperatury i czasu trwania reakcji enzymatycznej. Opracowana metoda została z powodzeniem wykorzystana do analizy próbek moczu u zdrowych ochotników i pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem układu moczowo-płciowego w liczbie 154 osób, w tym 77 chorych i 77 z grupy kontrolnej [H5] oraz w liczbie 192 osób (92 chorych i 100 zdrowych) [H6]. Chromatogramy uzyskane od zdrowych ochotników i pacjentów z nowotworami układu moczowo-płciowego po zastosowaniu zoptymalizowanej metody LC-ESI/MS zaprezentowałam na **Ryc. 5**.

Wszystkie osoby biorące udział w badaniu podpisały świadomą zgodę i dostosowały się do wymagań wynikających z założeń projektu, szczególnie obowiązywał zakaz przyjmowania leków oraz spożywania napojów alkoholowych na 2 tygodnie przed badaniem. W celu eliminacji chorób nerek oznaczyłam poziom kreatyniny z zastosowaniem testu, kitu na kreatyninę z PZ Cormay (Lublin, Polska) [H5-H6]. Należy zaznaczyć, że sekrecja hormonów steroidowych podlega rytmowi dobowemu i miesięcznemu, tym trudniejsze są wiarygodne pomiary, zwłaszcza porównanie wyników z różnych ośrodków badawczych, dlatego niezbędne jest uwzględnienie kreatyniny w obliczeniach. Poziomy hormonów płciowych w moczu po przeliczeniu na kreatyninę powinny być stałe.

Analiza statystyczna i chemometryczna

Wykorzystując nowo opracowaną strategię analityczną, przeprowadziłam analizę próbek moczu pochodzących od 77 zdrowych osób z grupy kontrolnej i 77 z nowotworem układu moczowo-płciowego, w tym 47 chorych na raka pęcherza moczowego, 10 pacjentów z rakiem nerki, 7 z rakiem gruczołu krokowego, 3 z rakiem jądra oraz 10 osób z innymi nowotworami (4 osoby z potworniakiem dojrzałym, 4 z chłoniakiem złośliwym, czyli lymphoma i 2 z nowotworem nieznanego typu) [H5]. W kolejnym badaniu wzięła udział grupa 192 osób, w tym 92 pacjentów z nowotworem układu moczowo-płciowego (16 kobiet i 76 mężczyzn) oraz 100 zdrowych osób (39 kobiet i 61 mężczyzn). Wśród grupy osób z nowotworem 58 osób cierpiało na raka pęcherza moczowego, 11 osób na raka nerki, 9 osób na raka prostaty, 3 osoby na raka jądra i 11 osób na inne nowotwory, np. lymphoma [H6].

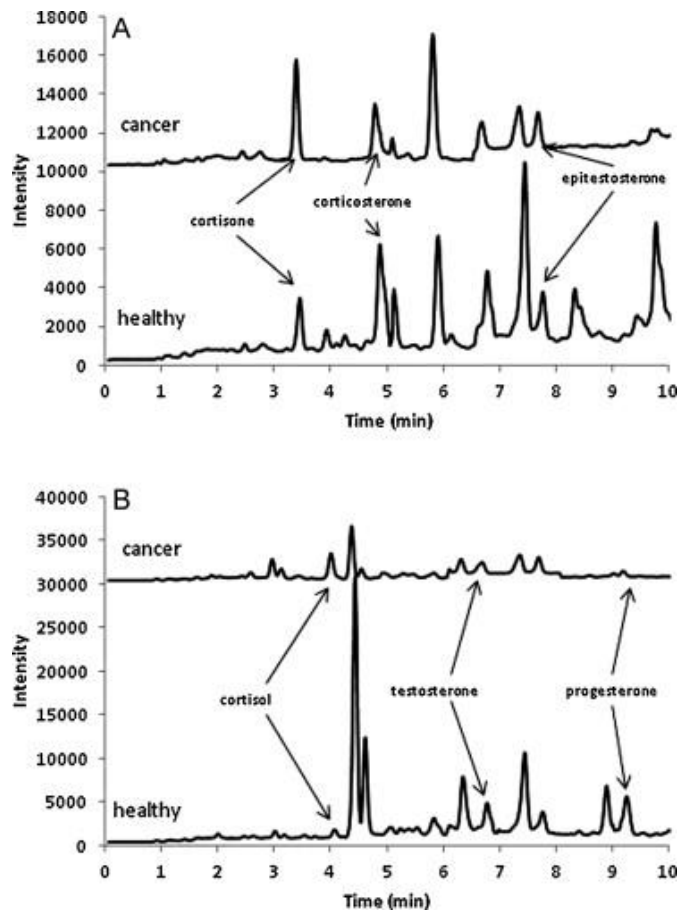
Normalność rozkładu zmiennej sprawdziłam za pomocą testu Shapiro-Wilka oraz dodatkowo testem Kołmogorowa-Smirnova z poprawką Lilieforsa. Ponieważ nie zostało spełnione kryterium normalności rozkładu zmiennej, co jest warunkiem koniecznym

do zastosowania testów parametrycznych o silnej mocy predykcyjnej, posłużyłam się testem nieparametrycznym U Manna – Whitney’ a zwanym inaczej testem Wilcoxon. [H5-H6]. Dla badanych grup pacjentów z nowotworem układu moczowo-płciowego zaobserwowałam znacząco ($p < 0,05$) podwyższone stężenie kortyzolu, kortyzonu i epitestosteronu oraz statystycznie istotnie obniżony poziom testosteronu.

Wyniki ANOVA

Do przeprowadzenia analizy porównawczej poziomów oznaczonych hormonów steroidowych w moczu pomiędzy badanymi grupami (zdrowych ochotników i pacjentów z nowotworem układu moczowo-płciowego) wykorzystałam testy parametryczne, jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test t na poziomie istotności 0,05. Statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) zostały potwierdzone w przypadku kortyzonu, który plasował się na poziomie 124,91 ng/ml w grupie kontrolnej w porównaniu do wartości 167,50 ng/ml dla grupy pacjentów z nowotworami układu moczowo-płciowego [H5]. Należy zaznaczyć, że pomimo zaobserwowania pewnych różnic dla osób z grupy kontrolnej w odniesieniu do grupy pacjentów z nowotworem, gdzie stężenie testosteronu w moczu wynosiło 81,76 ng/ml (kontrola) w stosunku do 63,57 ng/ml (chorzy), dla epitestosteronu: 50,29 ng/ml (kontrola) w porównaniu z 68,13 ng/ml (chorzy) i dla progesteronu: 4,21 ng/ml (kontrola) w odniesieniu do 20,58 ng/ml (chorzy), różnice te nie były statystycznie istotne.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki [H5], wykazałam różnice w wartościach średnich stężeń kortyzonu i ich odchył standardowych w grupie kontrolnej w odniesieniu do chorych, zauważyłam pewne różnice w profilach pozostałych analizowanych steroidów, jednakże na tym etapie niewiele można było powiedzieć o strukturze badanych obiektów czy zmiennych. Z tego powodu zasadne było przeprowadzenie dalszej analizy porównawczej za pomocą narzędzi chemometrycznych.



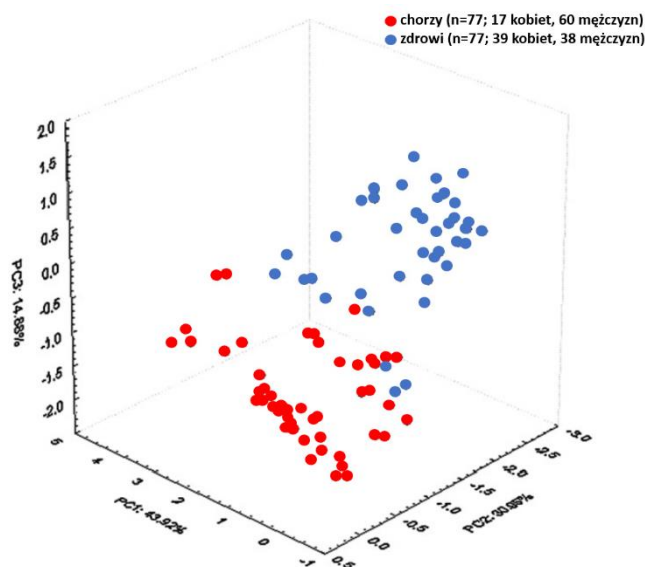
Ryc. 5. Chromatogramy uzyskane od zdrowych ochotników oraz pacjentów z chorobą nowotworową (rakiem prostaty) z dodatkiem metylotestosteronu (120 ng/ml) jako wzorca wewnętrznego z podziałem na dwa sygnały: A) SIM1, gdzie monitorowano jony molekularne kortyzonu $m/z = 361$, kortykosteronu $m/z = 347$ i epitestosteronu $m/z = 289$ oraz B) SIM2: monitorowano jony molekularne kortyzolu $m/z = 363$, testosteronu $m/z = 289$ i progesteronu $m/z = 315$ [H5].

Analiza chemometryczna

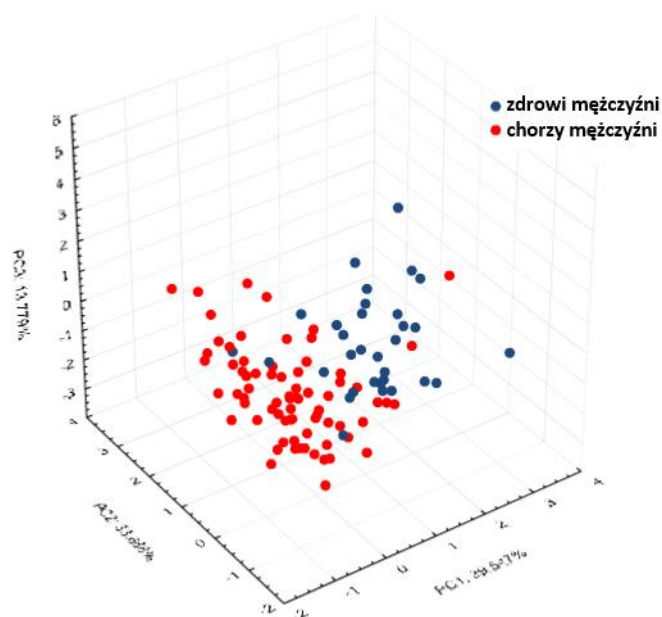
Analiza głównych składowych PCA

W celu dokonania wnikliwej interpretacji różnic pomiędzy danymi chromatograficznymi uzyskanymi w wyniku przeprowadzenia eksperymentu badawczego dla rozpatrywanych grup osób zdrowych i chorych zastosowałam narzędzia wielowymiarowe – metodę głównych składowych PCA (oprogramowanie *Statistica 10.0*; StatSoft Inc., Tulsa, OK, Stany Zjednoczone). Analizie podlegała macierz danych o wymiarach 9 (zmienne) \times 154 (obiekty), gdzie zmienne stanowiły poziomy stężenie analizowanych związków steroidowych po ich normalizacji w odniesieniu do poziomu kreatyniny oraz obiekty: badane osoby. Wszystkie dane podlegały autoskalowaniu. Metoda PCA pozwala na znalezienie struktury badanych obiektów i wizualizację różnic pomiędzy badanymi grupami, zdrowych i chorych na raka.

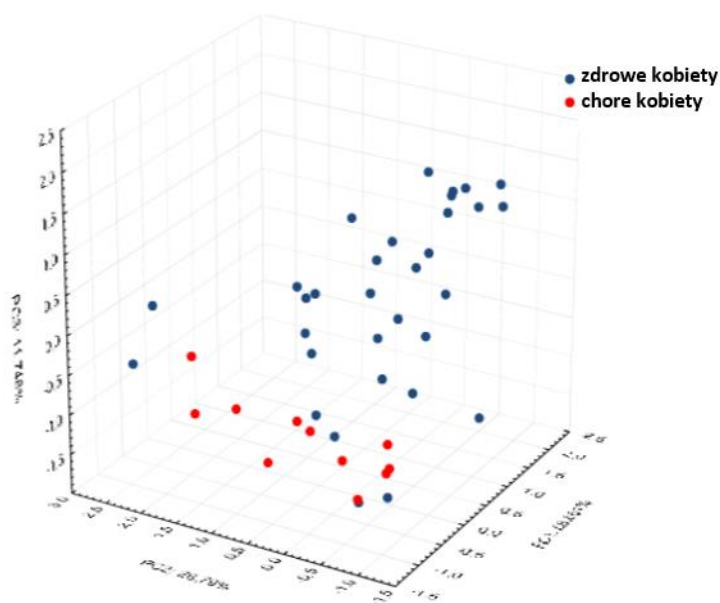
Na **Ryc. 6** przedstawiłam trójwymiarowy wykres przestrzenny skonstruowany przez czynniki PC1, PC2 i PC3. Jak można zauważyć, trzy czynniki PC1, PC2 i PC3 w odniesieniu do wszystkich uczestników badania, wyjaśniły odpowiednio 43,92%, 30,05% i 14,88% zmienności. Dwie pierwsze składowe wyjaśniły sumarycznie więcej niż 73% całkowitej zmienności, natomiast pierwsze trzy składowe główne wyjaśniły niemal 90% zmienności. Na wykresie PC1/PC2/PC3 (**Ryc. 6**) można zaobserwować dwa klastry: grupę chorych na raka i zdrowych ochotników (grupa kontrolna). Co więcej, wydaje się, że klaster pacjentów z nowotworem jest bardziej jednorodny w odniesieniu do skupiska związanego z grupą kontrolną (bardziej rozproszony). W tym badaniu pacjenci z rakiem, zarówno kobiety jak i mężczyźni odznaczają się zdecydowanie wyższym poziomem stężenia kortyzolu i kortyzonu (**Ryc. 6**). Czynniki PC1 w znaczący sposób zależy od poziomu testosteronu i epitestosteronu, znacznie mniejszy wpływ miał progesteron na pierwszą składową PC1, (43,92% wyjaśnionej zmienności). Na czynnik PC3 w moczu głównie wpłynął poziom kortykosteronu (14,88% wyjaśnionej zmienności), jednak w mniejszym stopniu niż w pozostałych analizowanych związkach steroidowych. Podsumowując, głównym źródłem zmienności są dwa czynniki, po pierwsze, poziom testosteronu i epitestosteronu, po drugie, poziomy kortyzonu i kortyzolu. Wyniki te są zgodne z opublikowanymi wcześniej badaniami [18,34,88,89].



Ryc. 6. Trójwymiarowy wykres PCA uzyskany na podstawie całkowitych profili hormonalnych kortyzonu, kortyzolu, kortykosteronu, testosteronu, epitestosteronu, progesteronu dla 154 badanych osób (77 zdrowych i 77 ze zdiagnozowanym nowotworem układu moczowo-płciowego) [H5].



Ryc. 7. Trójwymiarowy wykres PCA uzyskany na podstawie całkowitych profili hormonalnych kortyzonu, kortyzolu, kortykosteronu, testosteronu, epitestosteronu, progesteronu dla 137 badanych mężczyzn (61 zdrowych i 76 ze zdiagnozowanym nowotworem układu moczowo-płciowego) [H6].



Ryc. 8. Trójwymiarowy wykres PCA uzyskany na podstawie całkowitych profili hormonalnych kortyzonu, kortyzolu, kortykosteronu, testosteronu, epitestosteronu, progesteronu dla 55 badanych kobiet (39 zdrowych i 16 ze zdiagnozowanym nowotworem układu moczowo-płciowego) [H6].

Należy również podkreślić, że znacznie wyższy poziom kortyzonu w moczu zauważono w przypadku wszystkich chorych z nowotworem układu moczowo-płciowego w porównaniu z grupą kontrolną, co zweryfikowałam przeprowadzając test ANOVA ($p < 0,05$). Następnie analizowałam osobno poziomy steroidów w moczu kobiet i mężczyzn, chorych ze zdiagnozowanym nowotworem i grupę kontrolną (**Ryc. 7 i 8**). W przypadku grupy mężczyzn, również zaobserwowałam dwa oddzielne klastry, pacjentów z nowotworem i grupę kontrolną.

PLS-DA

Metodę PLS dostępną w programie (Matlab 7,0 Mathworks, Natick, MA, USA) zastosowałam do skonstruowania modelu dyskryminacyjnego celem oceny postulowanej zależności pomiędzy profilami steroidowymi a wystąpieniem raka. Wybór obiektów dla stworzenia modelu przeprowadzono przy użyciu algorytmu Kennarda-Stone'a [90], jednak jego modyfikacja w postaci algorytmu "duplex" oraz inne również były testowane [65,91,92].

Metodę PLS-DA wykorzystałam do klasyfikacji obiektów, umożliwiła ona rozróżnienie (dyskryminację) badanych grup osób [61]. W celu porównania zdrowych ochotników i pacjentów z nowotworem układu moczowo-płciowego, zostały stworzone dwa modele, kalibracyjny i testowy. Aby wykonać to zadanie przetestowałam dwa algorytmy selekcji: Kennarda-Stone'a i dyskryminacji. Zbiór modelowy powinien zawierać zbiór próbek reprezentujących wszystkie możliwe źródła zmienności, aby mieć pewność, że pobrane próbki modelu pokrywają całą domenę kalibracji. Jako miarę podobieństwa pomiędzy próbkami, zastosowałam odległość euklidesową. Wyniki eksperymentalne wykazały, że do bezpośredniej normalizacji danych odległość euklidesowa była lepsza niż Mahalanobisa. W celu wyboru zmiennych potwierdzających reprezentatywność badanej populacji zastosowałam algorytm Kennarda-Stone'a, stąd ostatecznie 55 osób z pierwotnej liczby 77 zostało włączonych do modelu. Takie rozwiązanie było zgodne z założeniami, że model powinien zawierać 70% całkowitej liczby obiektów (w tym przypadku 71,43%, pozostałe 22 próbki tworzyły zestaw testowy) [H5]. W kolejnej pracy zostało wprowadzonych do modelu 78 osób zdrowych z ich pierwotnej liczby 99 oraz 72 osoby z nowotworem z ich wyjściowej ilości 93 (co stanowi odpowiednio 78,79% i 77,42% całkowitej liczby analizowanych podmiotów badawczych) [H6]. Ponadto oba zestawy zostały zbadane pod kątem adekwatności modelu, to znaczy czy model testowy pasuje do

kalibracyjnego w kalibracji krzyżowej. Siłę wzajemnej relacji pomiędzy profilami steroidowymi a obecnością raka dróg moczowo-płciowych oceniłam dodatkowo przez zastosowanie PLS-DA. Analiza danych (wcześniej automatycznie skalowanych) pozwoliła na podstawie skonstruowanego modelu przewidzieć procent poprawnie zakwalifikowanych przypadków do grupy chorych lub zdrowych.

Wyniki klasyfikacji danych zostały przedstawione w **Tabeli 1**, aż 49 osób spośród 55 zdrowych uczestników badań zostało poprawnie zakwalifikowanych do grupy kontrolnej, co stanowi 89% osób sklasyfikowanych prawidłowo. Z drugiej strony, aż 100% poprawnej przynależności do grupy chorych uzyskałam dla pacjentów z nowotworem [**H5**]. Monitorowanie dalszych różnic w oparciu o liczniejszą grupę badawczą (początkowo 192, z tego włączonych do modelu 150 osób), przyniosło zadawalające wyniki. Na 78 zdrowych podmiotów badań 58 sklasyfikowano prawidłowo (co stanowi 74,36%). Z kolei wśród 93 pacjentów z nowotworem 58 zdiagnozowano jako chorych (80,56%) [**H6**]. Podsumowując, skonstruowany w trakcie analizy chemometrycznej model dyskryminacyjny PLS-DA charakteryzował się wysoką **specyficznością** i **czułością**, wynoszącą odpowiednio 89,09 i 100 % dla grupy 110 osób włączonych do modelu [**H5**] oraz 74,36 i 80,56% dla grupy 150 osób [**H6**]. Na podstawie dokonanych obliczeń wykazałam, że w przeprowadzonych badaniach hormony steroidowe stanowią dobry model diagnostyczny dla choroby nowotworowej układu moczowo-płciowego. Dodatkowo potwierdziłam wzajemną zależność między poziomem hormonów steroidowych a występowaniem raka układu moczowo-płciowego. Przeprowadzone przeze mnie badania miały na celu oszacowanie zaburzeń hormonalnych w chorobach powiązanych z nowotworzeniem. Profile steroidowe wydają się tworzyć nowe możliwości dla badań potencjalnych biomarkerów w aspekcie badań przesiewowych. Porównanie profili hormonów steroidowych w badanych grupach w połączeniu z analizą chemometryczną z wykorzystaniem PCA i PLS-DA jest nowym podejściem w aspekcie poszukiwania potencjalnych biomarkerów w badaniach biomedycznych. Dla właściwej interpretacji wyników niezbędne było odpowiednie przygotowanie danych analitycznych przed analizą (ang. *pre-processing*).

Reasumując, zaproponowałam kompleksowe podejście do badania profili steroidowych w moczu z zastosowaniem odpowiednich nowatorskich metod oraz procedur analitycznych, jak również właściwej obróbki wstępnej uzyskanych danych. W ten sposób możliwe było pozyskanie nowych informacji w trakcie oceny zależności pomiędzy profilami hormonów steroidowych w moczu osób zdrowych i pacjentów z nowotworem

układu moczowo-płciowego. Wyniki moich badań są wstępnym etapem, punktem wyjścia do dalszych analiz mających na celu ocenę dyskryminacji pacjentów z rakiem układu moczowo-płciowego w odniesieniu do grupy kontrolnej, z uwzględnieniem większej liczby badanych osób. Jak zaznaczyłam we wstępie, implementacja biomarkera do praktyki klinicznej wymaga przeprowadzenia walidacji opartej na analizie 1000 próbek. Niezbędna jest dokładna analiza czynników mających wpływ na zmiany w profilach steroidowych takich jak współistniejące choroby czy zastosowany schemat leczenia.

Tabela 1 Wyniki klasyfikacji osób podlegających badaniu metodą analizy dyskryminacyjnej cząstkowych najmniejszych kwadratów PLS-DA po zastosowaniu algorytmu Kennarda-Stone'a [H5].

Grupa badana	Osoby prawidłowo sklasyfikowane %	Grupa 1 (zdrowi)	Grupa 2 (pacjenci z nowotworem)
Grupa 1 (zdrowi)	89,09	49	6
Grupa 2 (pacjenci z nowotworem)	100	0	55
Sumarycznie	94,55	49	61

Podsumowując, wyznaczyłam profile hormonów steroidowych w moczu ludzkim u 154 osób, w tym 77 zdrowych ochotników (grupa kontrolna) i 77 osób ze zdiagnozowanym nowotworem układu moczowo-płciowego, techniką LC-ESI/MS [H5] oraz w kolejnym badaniu 192 osób, w tym 100 zdrowych i 92 z nowotworem [H6]. Potwierdziłam, że oszacowane poziomy endogennych związków steroidowych były użytecznym czynnikiem w medycznej praktyce diagnostycznej i mogą być polecane do klinicznych i biomedycznych badań mających na celu odkrycie zaburzeń hormonalnych i hormonozależnych nowotworów. Profile steroidowe wydają się tworzyć nowe możliwości dla badań potencjalnych biomarkerów diagnostycznych na tym wstępnym etapie badań. Istotnym wydaje się szczegółowa analiza statystyczna porównania profili hormonalnych w połączeniu z analizą chemometryczną z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, analizy głównych składowych PCA i analizy dyskryminacyjnej (PLS-DA) w podejściu biomarkerowym do badań biomedycznych a także poprawa oceny różnic między grupą kontrolną a grupą pacjentów z nowotworem układu moczowo-płciowego. Do właściwej interpretacji uzyskanych danych użyteczne było wstępne przetworzenie wyjściowych danych analitycznych. Nowe informacje zostały wyodrębnione podczas oceny wzajemnej zależności pomiędzy profilami steroidowymi osób zdrowych i pacjentów z rakiem układu moczowo-płciowego. Przeprowadzone analizy steroidów jako potencjalnych biomarkerów mogą być rozpatrywane jako punkt wyjścia dla dalszych badań

oceniających różnice pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych, stąd w dalszych etapach powinny być rozpatrywane bardziej precyzyjne informacje, takie jak choroby współistniejące, zastosowana terapia lecznicza, mające wpływ na steroidowe profile hormonalne w moczu. Potencjalne biomarkery steroidowe w moczu mogą być rozpatrywane za pomocą proponowanej przeze mnie strategii, pod warunkiem pomyślnego zakończenia procesu walidacji, jako uzupełniający element diagnostyczny umożliwiający wcześniejszą diagnozę chorób nowotworowych układu moczowo-płciowego.

W toku powyższych rozważań wykazałam, że podjęcie badań dotyczących oznaczania profili steroidowych w moczu techniką LC-MS było zasadne. Potwierdzenie zależności pomiędzy zmianami w profilach steroidowych a występowaniem nowotworów układu moczowo-płciowego w oparciu o większą grupę pacjentów i pomyślne zakończenie walidacji (jednego z etapów implementacji potencjalnego biomarkera do praktyki klinicznej, o czym wspomniałam we wstępie), może w przyszłości pozwolić na wprowadzenie tej metody do badań diagnostycznych tych chorób.

IV. *Zastosowanie techniki micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) jako alternatywnej metody oznaczania hormonów steroidowych w moczu osób uprawiających sport.*

[H7]. I. Olędzka, A. Plenis, **L. Konieczna**, T. Bączek, Micellar electrokinetic chromatography for the determination of cortisol in urine samples in view of biomedical studies, *Electrophoresis*, 31 (2010) 2356-2364. (IF: 3,569; MNiSW: 32,0)

[H8]. T. Bączek, I. Olędzka, **L. Konieczna**, P. Kowalski, A. Plenis, Biomedical evaluation of cortisol, cortisone and corticosterone along with testosterone and epitestosterone applying micellar electrokinetic chromatography, *Sci. World J.*, 268120 (2012) 8s.. (IF: 1,730; MNiSW: 35,0)

W kolejnych badaniach hormonów steroidowych wzbogaciłam swój warsztat analityczny poprzez zastosowanie alternatywnej techniki separacyjnej do HPLC, jaką jest jedna z technik elektromigracyjnych, a mianowicie micelarna chromatografia elektrokinetycznej (MEKC). Jak wspomniałam we wstępie technika MEKC z wykorzystaniem detektora spektrofotometrycznego jest mniej czuła w odniesieniu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej, dlatego należało użyć aż 15 ml moczu w celu oznaczenia kortyzolu [H7] w przeciwieństwie do 6 ml czy 3 ml w HPLC-UV [H3, H4]. Tę niedogodność rekompensowało mniejsze zużycie toksycznych odczynników w MEKC, co czyni tę technikę bardziej przyjazną środowisku, zwłaszcza w odniesieniu do obecnie

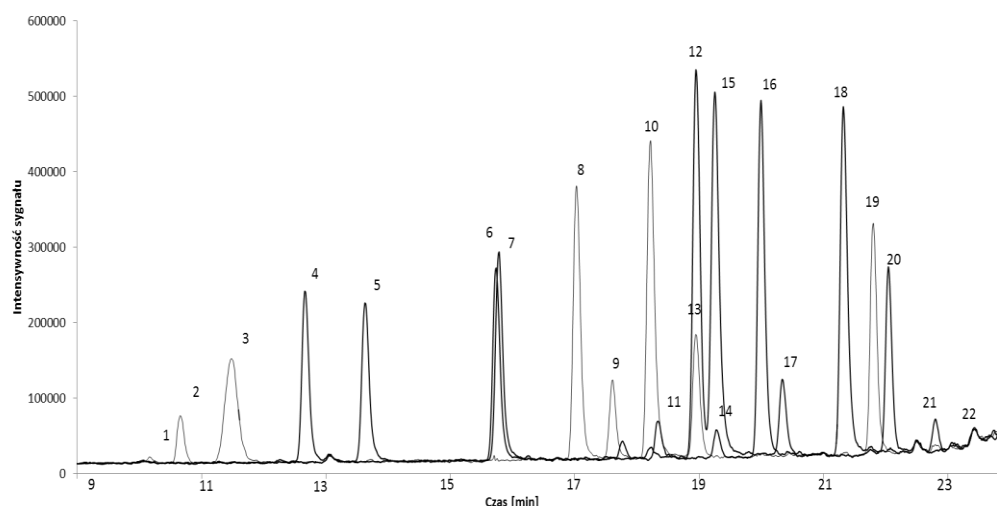
propagowanych 12-tu zasad „zielonej chemii”. Na tym etapie badań pogłębiłam swoją wiedzę na temat podstaw teoretycznych technik elektromigracyjnych, mechanizmu rozdzielania elektroforetycznego oraz ich potencjału aplikacyjnego w praktyce klinicznej. W sposób teoretyczny i praktyczny zapoznałam się z procesem doboru optymalnych parametrów elektroforetycznych, w tym z czynnikami wpływającymi na selektywność analiz, zwłaszcza techniką MEKC, do których należy: rodzaj surfaktanta, pH buforu separacyjnego (ang. *background electrolyte*, BGE), temperatura i rodzaj modyfikatora organicznego [58,77]. Oznaczyłam poziom kortyzolu w moczu w grupie 29 zdrowych ochotników na poziomie $160.8 \pm 76,7$ ng/ml, który mieścił się w zakresie fizjologicznym (od 50 do 250 ng/ml). Zauważyłam dużą zmienność osobniczą i podwyższone wartości u 11 osób, u których na podany wynik wpłynął prawdopodobnie czynnik stresogenny [H7]. Szerszy zakres możliwości techniki MEKC zaprezentowano w drugiej pracy [H8], która dotyczyła jednoczesnego oznaczenia pięciu hormonów steroidowych w próbkach moczu w czasie 8 minut. Przeprowadzone zostały również badania w grupie zdrowych ochotników i u osób uprawiających sport. Nie odnotowałam podwyższonego poziomu testosteronu i epitestosteronu u badanych osób, również stosunek testosteronu do epitestosteronu (T/ET) nie został przekroczony, mieścił się w zakresie od 1,1 do 3,6, czyli poniżej 4 [H8]. Otrzymane wyniki dowiodły brak stosowania dopingu anabolicznego w grupie sportowców. Podsumowując, opracowane metody oparte na technice MEKC [H7-H8] zostały wykorzystane do oceny ewentualnych zaburzeń hormonalnych, poziomu stresu oraz kontroli antydopingowej i stanowią alternatywne narzędzie separacyjne wobec HPLC, natomiast w odniesieniu do technik łączonych LC-ESI/MS mogłyby być konkurencyjne dopiero po połączeniu z detektorem mas.

W ramach kontynuacji moich badań [H5-H6] w obszarze analiz biomedycznych obejmujących grupę osób z rakiem układu moczowo-płciowego z wykorzystaniem potencjału technik chromatograficznych w połączeniu z detekcją mas, potwierdziłam zasadność i celowość rozwijania tego kierunku badawczego w kolejnych eksperymentach.

Nowoczesna walka z rakiem wymaga wszechstronnych i wiarygodnych danych obejmujących analizę nie pojedynczego biomarkera, ale całego spektrum biomarkerów [H5-H6], dlatego w dalszym etapie moich badań naukowych opracowałam metodę jednoczesnego oznaczenia panelu 22 hormonów steroidowych metodą LC-MS (Ryc. 9). Wyzwaniem dla metod chromatograficznych jest szybkie, jednoczesne i efektywne rozdzielanie wielu substancji w szerokim zakresie stężeń i różnych właściwościach fizykochemicznych. Taka szybka separacja panelu związków często skutkuje bardzo wysokim

ciśnieniem roboczym, co stawia ogromny opór i stanowi obciążenie dla aparatury HPLC. Z tego powodu zastosowałam kolumnę z wypełnieniem typu *core-shell* z ziarnami złożonymi z rdzenia i porowatej powłoki, znanej również jako powierzchniowo porowate mikrosfery, wykorzystywane do bardzo wydajnego i szybkiego rozdzielania przy racjonalnie niskim ciśnieniu, służące do rozdzielania związków zarówno o małej jak i dużej masie cząsteczkowej oraz związków o budowie kompleksowej. Elementem nowości opracowanej strategii analitycznej było zastosowanie wspomnianej kolumny wykonanej w technologii *core-shell* do oznaczania endogennych związków steroidowych, co znacząco poprawiło rozdzielczość, wydajność i czułość metody, redukując jednocześnie czas analizy i zużycie rozpuszczalników w porównaniu z popularnymi całkowicie porowatymi ziarnami zastosowanymi wcześniej [H2-H6]. Wśród różnego typu wypełnień stosowanych w chromatografii, wszystkie te możliwości wydawały się być zarezerwowane dla systemów UHPLC/UPLC, jednak *core-shell* dzięki kontrolowanej technologii umożliwiającej ograniczenie m. in. zjawiska dyfuzji wirowej, oporu przenoszenia masy oraz zminimalizowania wartości rozkładu wielkości cząstek w kolumnie, pozwala na uzyskanie ultra wysokich sprawności, a zwiększona sprawność pozwala na osiągnięcie lepszej czułości. Zatem kolumny typu *core-shell* generują niskie ciśnienia wsteczne, stąd możliwość ich zastosowania w każdym systemie do chromatografii ciekowej, dodatkowo można w łatwy sposób dokonać transferu metody UHPLC do dowolnego systemu HPLC i odwrotnie. Ze względu na wysokie możliwości rozdzielcze, kolumna *core-shell* jest odpowiednim narzędziem do wykorzystania w badaniach analitycznych, klinicznych i testach diagnostycznych (Ryc. 9).

Opracowana metoda LC-MS została wykorzystana do analizy ilościowej hormonów steroidowych w moczu osób chorych z udokumentowanym nowotworem układu moczowo-płciowego (pęcherza moczowego, gruczołu krokowego, jądra i nerki). Dla analizowanych nowotworów zaobserwowałam statystycznie istotny wzrost stężenia estronu, aldosteronu, kortyzonu, 5-pregnen-3 β -ol-20-onu, kortyzolu oraz epitestosteronu, natomiast obniżony poziom testosteronu i epiandrosteronu w odniesieniu do grupy kontrolnej. Ponadto w grupie pacjentów z rakiem pęcherza zauważyłam statystycznie istotnie obniżony poziom transdehydroandrosteronu, natomiast wśród pacjentów z rakiem prostaty zaobserwowałam obniżone stężenie β -estradiolu.



Ryc. 9. Chromatogram moczu ludzkiego z dodatkiem 22 hormonów steroidowych w kolejności: estriol (1) aldosteron (2), kortyzon (3), kortyzol (4), betametazon (5, wzorzec wewnętrzny), kortykosteron (6), 4-androsten-3,17-dion (7), estron (8), β -estradiol (9), testosteron (10), α -estradiol (11), trans-dehydroandrosteron (12), 17- α hydroksyprogesteron (13), metylosteron (14, wzorzec wewnętrzny), 17- α hydroksypregnenolon (15), epiandrosteron (16), epitestosteron (17), 5- α -androstan-17 β -ol-3-on (18), progesteron (19), etiocholan-3 α -ol-17-on (20), androsteron (21), 5-pregnen-3 β -ol-20-on (22) [praca w recenzji].

Podsumowując, wyznaczyłam profile hormonów steroidowych w moczu ludzkim u 340 osób, w tym 100 zdrowych ochotników (grupa kontrolna) i 240 osób ze zdiagnozowanym nowotworem układu moczowo-płciowego, techniką przy zastosowaniu techniki LC-ESI/MS (praca w recenzji).

PODSUMOWANIE

Znaczący postęp w rozwoju nauk biologicznych i medycznych w ostatnich latach pozwala coraz lepiej rozumieć biochemiczne i molekularne podstawy funkcjonowania żywych organizmów, prowadząc w ten sposób do pełniejszego poznania zmian, które są przyczyną powstawania różnych chorób. Konsekwencją zdobytej wiedzy jest wynalezienie skuteczniejszych leków w odniesieniu do różnych chorób, zwłaszcza nowotworowych oraz poszukiwanie nowych metod diagnostycznych, jak i rozwój już istniejących.

Badania naukowe zaprezentowane w opisanych powyżej pracach, wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego [H1-H8] dotyczyły analizy endogennych hormonów steroidowych jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych stanów patologicznych organizmu. Przedstawiłam zatem możliwość włączenia oznaczonych profili

hormonów steroidowych w przyszłości jako uzupełniających badania przesiewowe. Aktualnie poszukuje się wciąż nowych biomarkerów diagnostycznych stanów chorobowych, przede wszystkim chorób nowotworowych, które przebiegają często w sposób bezobjawowy, a ich zbyt późne wykrycie nie daje pacjentowi szans na wyleczenie. Przeprowadzone badania w ramach realizacji przedstawionego osiągnięcia naukowego mają swój wymierny efekt praktyczny, dostarczyły nowatorskich, specyficznych, czułych i szybkich metodyk analitycznych z wykorzystaniem technik chromatograficznych opartych na chromatografii cieczowej i chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją mas oraz micelarnej elektrokinetycznej chromatografii, wspomaganych narzędziami chemometrycznymi.

W ramach realizacji celów badawczych objętych osiągnięciem naukowym:

1. Opracowałam i przeprowadziłam optymalizację specyficznych, czułych i dokładnych metodyk chromatograficznych z użyciem narzędzi informatycznych takich jak program komputerowy DryLab, co skróciło proces optymalizacji i przyczyniło się do ekonomizacji procesu chromatograficznego poprzez zmniejszenia kosztów analizy i obniżenie zużycia rozpuszczalników, ograniczenie czasochłonności eksperymentu i nakładów pracy analityka.
2. Zaproponowałam nowatorskie podejście do analizy biomarkerów wskazując na zasadność badania związków małowcząsteczkowych, jakimi są hormony steroidowe i rozpatrywania ich jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych stanów patologicznych (narażenia na stres i zaburzeń depresyjnych) u osób uprawiających sport i chorych na depresję.
3. Wykazałam użyteczność opracowanych przez mnie metodyk analitycznych do oceny zaburzeń hormonalnych wykorzystanych w badaniach poziomu stresu i kontroli antidopingowej.
4. Udokumentowałam istnienie statystycznie istotnych różnic z wykorzystaniem testów parametrycznych i nieparametrycznych w profilach steroidowych pacjentów z rakiem pęcherza moczowego i prostaty.

5. Przeprowadziłam wielowariancyjną analizę chemometryczną oznaczonych profili steroidowych u pacjentów z udokumentowanym nowotworem układu moczowo-płciowego i osób zdrowych z grupy kontrolnej.
6. Wyznaczenie profili steroidowych może zostać w przyszłości, po zakończonym procesie walidacji i testach klinicznych, wprowadzone jako uzupełniający element diagnostyczny nowotworów układu moczowo-płciowego.

Podsumowując, przeprowadzony przeze mnie cykl badań obejmował 8 spójnych tematycznie prac opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Opracowane przeze mnie nowatorskie, specyficzne i czułe metodyki analizy jakościowej i ilościowej hormonów steroidowych są użytecznym narzędziem analityczno-chemometrycznym mającym swój wymiar praktyczny, mogą być wykorzystane zarówno w diagnostyce medycznej jak i w badaniach antydopingowych u sportowców. Niezależnie od zastosowania medycznego powiązanego z diagnostyką medyczną, oceną stresu czy dopingu, wykazałam innowacyjność i zasadność przeprowadzonych badań.

Znaczącym efektem osiągnięcia naukowego jest wkład w poszerzenie wiedzy na temat technik chromatograficznych jako narzędzi separacyjnych dla związków endogennych, metodyk przygotowania próbek biologicznych do analizy obejmujących wyizolowanie analitów z matrycy biologicznej, a przede wszystkim molekularnych podstaw badania procesów nowotworowych w oparciu o opracowane i zweryfikowane nowatorskie narzędzia analityczno-bioinformatyczne.

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawiony powyżej cykl publikacji przyczynił się niewątpliwie do poszerzenia wiedzy w zakresie roli hormonów steroidowych jako potencjalnych kandydatów na biomarkery hormonozależnych chorób nowotworowych. Przeprowadzone prace naukowo-badawcze ze względu na podjętą tematykę miały charakter interdyscyplinarny, wymagały współpracy z innymi ośrodkami badawczymi i klinikami. Zadania wynikające z projektów badawczych realizowane były we współpracy z Katedrą i Zakładem Biofarmacji

i Farmakodynamiki GUMed, z Kliniką Urologii GUMed, szczególnie z dr Marcinem Markuszewskim, który nadzorował projekt od strony klinicznej.

Badania były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach realizacji projektu N N405 024340, Narodowe Centrum Nauki w ramach uzyskanego przeze mnie grantu 2011/03/B/NZ7/02333 oraz częściowo w ramach dotacji Krajowego Narodowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na Wydziale Farmaceutycznym z OML GUMed.

Perspektywy i wyzwania

- Moje naukowe prace doświadczalne do chwili obecnej obejmowały analizę **celowaną** związków małowcząsteczkowych jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych chorób, w tym endogennych hormonów steroidowych będących przedmiotem postępowania habilitacyjnego [**H1-H8**], amin biogennych i ich metabolitów potwierdzonych opublikowanymi artykułami pełnotekstowymi [**zał. 4 pkt. II A poz. 1-2, str. 7-8**] oraz aminokwasów (praca w recenzji). W dalszej perspektywie moje zainteresowania badawcze są skierowane również na analizę **niecelowaną** w/w związków metodą chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (ang. *time of flight*, Q-TOF), co nie tylko wzbogaci moje umiejętności analityczne, ale pozwoli na potwierdzenie proponowanych przeze mnie w/w związków małowcząsteczkowych jako potencjalnych kandydatów na biomarkery na podstawie wcześniej uzyskanych wyników techniką LC-MS z jednej strony, z drugiej strony na rozszerzenie listy potencjalnych kandydatów.
- Poszukiwanie biomarkerów jako narzędzia przydatnego w kształtowaniu terapii spersonalizowanej w mojej opinii wymaga przyjęcia jako stałej reguły badania profilu metabolicznego u osób od najmłodszych lat i w przyszłości traktowanie jako obowiązkowego w badaniach okresowych (indywidualna próba kontrolna). Takie postępowanie pozwoliłoby na monitorowanie ewentualnych zmian w tym profilu na przestrzeni lat oraz prawdopodobnych przyczyn tego zjawiska. Ponadto porównanie profili u osób pozostających w relacjach najbliższego pokrewieństwa (rodzina), mogłoby być

pomocne w diagnostyce chorób, którymi człowiek jest obciążony i tym samym na ewentualne zidentyfikowanie grup ryzyka wynikających z dziedziczenia.

- Na uwagę zasługuje nowatorskie podejście do realizacji postawionego celu, obejmujące wieloaspektowy charakter eksperymentu poprzez poszukiwanie nie tylko jednej substancji jako kandydata na pojedynczego potencjalnego biomarkera, ale rozpatrywanie zestawu kilku substancji, co może stanowić przełom w podejściu do „problematyki biomarkerowej”.
- Szczególną uwagę należy zwrócić na właściwe zaplanowanie eksperymentu badawczego. Niezwykle trudnym zadaniem był dobór i precyzyjna charakterystyka grupy badanych osób pod względem kryteriów wykluczania, wieku, liczebności oraz stadium zaawansowania choroby. Jednak **kluczowym** dla tego typu badań jest dobór grupy **kontrolnej**. Należy podkreślić, że poziomy hormonów steroidowych podlegają zmianom wraz z wiekiem. W związku z tym do badań zakwalifikowano osoby w ściśle określonym przedziale wiekowym, dokładnie odpowiadającym grupie badanej tak, aby wyeliminować błędną interpretację uzyskanych wyników. Należy zaznaczyć, że grupę kontrolną powinny stanowić osoby zdrowe, które nie przyjmują żadnych leków, a o takie bardzo trudno w przedziale wiekowym powyżej 55 roku życia. Sytuacja wydaje się o wiele prostsza, gdy uczestnikami badań są dzieci.
- Zalecane jest dokładne zaplanowanie czasu, miejsca i ilości pobieranego od pacjenta materiału biologicznego. Ilość wydzielanych hormonów steroidowych zależna jest od dobowego (np. kortyzol, testosteron) i miesięcznego rytmu wydzielania (estrogeny), stąd istotnym było uszczegółowienie czy próbki do badań będą pobierane w godzinach rannych jako pierwszy poranny mocz, czy incydentalnie, czy też powinien to być mocz całodobowy.
- Trudności w pozyskaniu naturalnych próbek sprawiają, że na ogół analizuje się ich zbyt mało, w większości liczba ta nie przekracza 30, wówczas należy zwrócić uwagę na trudności interpretacyjne ostatecznych wyników, gdzie może być niewspółmiernie duża liczba zmiennych opisująca zbyt małą liczbę badanych osób [33].
- Jak już zaznaczyłam we wstępie, implementacja biomarkera do praktyki klinicznej jest procesem złożonym i wielostopniowym, wśród czterech wymienionych wcześniej

etapów, walidacja i optymalizacja metody wymaga analizy ok. 1000 próbek przed przeprowadzeniem testów klinicznych, na tym etapie eksperymenty badawcze najczęściej ulegają przerwaniu. W przypadku niewystarczającej ilości próbek, badania powinny być kontynuowane.

- Podsumowując, w mojej pracy posługuję się sformułowaniem „**potencjalny biomarker**”. Podkreślam, że biomarker musi wykazywać się **czułością i specyficnością**, a te cechy można ustalić tylko poprzez przeprowadzenie badań na ogromnej liczbie próbek. Jest oczywiste, że samo wykazanie różnic nawet statystycznie istotnych w profilach steroidowych pomiędzy grupą kontrolną a grupą osób z nowotworem nie jest wystarczające do określenia steroidów jako biomarkerów. Zdaję sobie sprawę, że dotychczas opublikowano tysiące publikacji odwołujących się do słów kluczowych „biomarker, nowotwór”, a mimo to żaden z opisanych biomarkerów nie znalazł praktycznego zastosowania w onkologii. W niniejszym projekcie przebadalam do tej pory 300 próbek pochodzących od pacjentów z nowotworem układu moczowo-płciowego, projekt jest na etapie **walidacji** i aktualnie badania są kontynuowane.
- Zatem zmiana określenia „**potencjalny biomarker**” na „**rzeczywisty biomarker**” może nastąpić po pozytywnym zakończeniu walidacji jako etapu wchodzącego w skład procesu implementacji biomarkera do praktyki klinicznej.

LITERATURA

- [1] R.K. Murray., D.A. Bender, K.M. Botham, *Harper's Illustrated Biochemistry (29th Edition)*, McGraw-Hill, USA 2012.
- [2] M. Rauh, Steroid measurement with LC-MS/MS. Application examples in pediatrics. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 121 (2010) 520–527.
- [3] K.L. Becker, *Principles and practice of endocrinology and metabolism*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1990.
- [4] A. Dođruk Unal, H.I. Gozu, N. Guverner Demirađ, Addison's disease patient presenting with Cushing's syndrome findings, Case Report, *Turk. J. Endocrinol. Metab.*, 17 (2013) 15–18.
- [5] M.M. Kushnir, A.L. Rockwood, W.L. Roberts, B. Yue, J. Bergquist, A.W. Meikle, Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories, *Clin. Biochem.*, 44 (2011) 77–88.
- [6] K.K. Gaddam, E. Pimenta, S. Husain, A.D. Calhoun, Aldosterone and cardiovascular disease, *Curr. Probl. Cardiol.*, 34 (2009) 51–84.
- [7] M.B. Patel, A.A. Mehta, Aldosterone and angiotensin: role in diabetes and cardiovascular diseases, *Eur. J. Pharmacol.*, 697 (2012) 1–12.

- [8] M. Palermo, C.H. Shackleton, F. Mantero, P.M. Stewart, Urinary free cortisone and the assessment of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in man, *Clin. Endocrinol.*, 45 (1996) 605–611.
- [9] A. Szczeklik, *Choroby wewnętrzne*, Medycyna Praktyczna, Kraków 2005.
- [10] U. Bogner, U. Eggens, J. Hansen W. Oelkers, Incidentally discovered ACTH-dependent adrenal adenoma presenting as Pre-Cushing's syndrome, *Acta Endocrinol.*, 111 (1986) 89–92.
- [11] F. Kokot, *Choroby wewnętrzne*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006.
- [12] C. Gruber, W. Tschugguel, C. Schneeberger, J. Huber, Production and actions of estrogens, *N. Engl. J. Med.*, 346 (2002) 340–352.
- [13] N.W. Gaikwad, Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for profiling of steroid metabolome in human tissue, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 4951–4960.
- [14] S.J. Soldin, O.P. Soldin, Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.*, 55 (2009) 1061–1066.
- [15] H.A. Eliassen, S.A. Missmer, S.S. Tworoger, S.E. Hankinson, Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer: Does the association vary by Woman's predicted breast cancer risk?, *J. Clin. Oncol.*, 24 (2006) 1823–1829.
- [16] A. Morgentaler, Testosterone and prostate cancer: What are the risks for middle-aged men?, *Urol. Clin. North Am.*, 38 (2011) 119–123.
- [17] J.T. Wang, E.S. Gao, L. Ding, Y.Y. Cheng, J.W. Yan, Association between endogenous hormones receptors and cervical cancer, *Chin J. Oncol.*, 28 (2006) 494–497.
- [18] B.E. Henderson, B. Benton, J. Jing, M.C. YU, M.C. Pike, Risk-factors for cancer of the testis in young men, *Int. J. Cancer*, 23 (1979) 598–602.
- [19] P.L. Horn-Ross, A.J. Canchola, H. Ma, P. Reynolds, Hormonal factors and the risk of papillary thyroid cancer in the California teachers study cohort, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 20 (2011) 1751–1759.
- [20] L.C. Johnson, A general theory of bone tumors, *Bull. Acad. Med.*, 29 (1953) 164–171.
- [21] A. Basaki, Z. Kirkali, E. Tuzel, K. Yorukoglu, M.U. Mungan, M. Sade, Prognostic significance of estrogen receptor expression in superficial transitional cell carcinoma of the urinary bladder, *Eur. Urol.*, 41 (2002) 342–345.
- [22] M. McGrath, D.S. Michaud, I. D Vivo, Hormonal and the reproductive factors and the risk of bladder cancer in women, *Am. J. Epidemiol.*, 163 (2006) 163–244.
- [23] R.F.X. Noronha, B.R. Rao, Sex hormone receptor in localized and advanced transitional cell carcinoma of urinary tract in humans, *Urology*, 28 (1986) 401–403.
- [24] J. Taieb, C. Benattar, A.S. Birr, A. Lindenbaum, Limitations of steroid determination by direct immunoassay, *Clin. Chem.*, 48 (2002) 583–585.
- [25] S. Juricskay, E. Telegdy, Urinary steroids in women with androgenic alopecia, *Clin. Biochem.*, 33 (2000) 97–101.
- [26] C. Almeida, J.M. Nogueira, Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 1303–1311.
- [27] P. Britz-McKibbin, T. Ichihashi, K. Tsubota, D.D. Chen, S. Terabe, Complementary on-line preconcentration strategies for steroids by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1013 (2003) 65–76.
- [28] N. Krone, B.A. Hughes, G.G. Lavery, P.M. Stewart, W. Arlt, C.H. Shackleton, Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 121 (2010) 496–504.
- [29] C. Shackleton, Clinical steroid mass spectrometry: A 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 121 (2010) 481–490.

- [30] H. Sirén, T. Seppanen-Laakso, M. Oresic, Capillary electrophoresis with UV and mass spectrometry in method development for profiling metabolites of steroid hormone metabolism, *J. Chromatogr. B Analyst Technol. Biomed. Life Sci.*, 871 (2008) 375-382.
- [31] Biomarkers Definitions Working Group, Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 69 (2001) 89-96.
- [32] A. de Gramont, S. Watson, L.M. Ellis, J. Rodon, J. Tabernero, A. de Gramont, S.R. Hamilton, Pragmatic issues in biomarker evaluation for targeted therapeutic in cancer. Review, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 12 (2015) 197-212.
- [33] A. Kraj, A. Drabik, J. Stilberring, *Proteomika i metabolomika*, Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2010.
- [34] R.S. Negm, M. Verma, S. Srivastava, The promise of biomarkers in cancer screening and detection, *Trends Mol. Med.*, 8 (2002) 288-293.
- [35] D.M. Parkin, Global cancer statistics in the year 2000, *Lancet Oncol.*, 2 (2001) 533-543.
- [36] C.L. Owens, A review of reporting systems and terminology for urine cytology. *Cancer Cytopathol.*, 121 (2013) 9-14.
- [37] H. Gao, Metabonomic profiling of renal cell carcinoma: high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of human serum with multivariate data analysis, *Anal. Chim. Acta*, 624 (2008) 269-277.
- [38] V. Ficarra, G. Novara, F. Zattoni, The role of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) test for the diagnosis of prostate cancer in the era of opportunistic prostate-specific antigen screening, *Eur. Urol.*, 58 (2010) 482-484.
- [39] M. Avgeris, K. Mavridis, A. Scorilas, Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance, *Biol. Chem.*, 393 (2012) 301-317.
- [40] T. Wang, Prostate stem cell antigen polymorphisms and susceptibility to gastric cancer: a systematic review and meta-analysis, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 21 (2012) 843-850.
- [41] Z. Zhao, Serum early prostate cancer antigen (EPCA) level and its association with disease progression in prostate cancer in a Chinese population. *PLoS One*, 6 (2011) e19284.
- [42] H.L. Bader, T. Hsu, Systemic VHL gene functions and the VHL disease. *FEBS Lett.*, 586 (2012) 1562-1569.
- [43] D. Castellano, Therapy management with sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: key concepts and the impact of clinical biomarkers, *Cancer Treat. Rev.*, 39 (2013) 230-240.
- [44] E. Jonasch, State of the science: an update on renal cell carcinoma, *Mol. Cancer Res.*, 10 (2012) 859-880.
- [45] H. Kitamura, T. Tsukamoto, Prognostic biomarkers of renal cell carcinoma: Recent advances, *Indian J. Urol.*, 24 (2008) 10-15.
- [46] C.H. Lamers, Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity, *Mol. Ther.*, 21 (2013) 904-912.
- [47] A.J. Pantuck, Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy, *Cancer*, 109 (2007) 2257-2267.
- [48] A. Horiguchi, Elevated Akt activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma, *J. Urol.*, 169 (2003) 710-713.
- [49] H.W. Herr, Natural history of superficial bladder tumors: 10- to 20-year follow-up of treated patients, *World J. Urol.*, 15 (1997) 84-88.
- [50] R.W. de Vere White, E. Stapp, Predicting prognosis in patients with superficial bladder cancer, *Oncology*, 12 (1998) 1717-1723.
- [51] V. Serretta, Urinary NMP22 for the detection of recurrence after transurethral resection of transitional cell carcinoma of the bladder: experience on 137 patient, *Urology*, 52 (1998) 793-796.

- [52] C. Zippe, L. Pandrangi, A. Agarwal, NMP22 is a sensitive, cost-effective test in patients at risk for bladder cancer, *J. Urol.*, 161 (1999) 62–65.
- [53] B. Johnston, Rapid detection of bladder cancer: a comparative study of point of care tests. *J. Urol.*, 158 (1997) 2098–2101.
- [54] B.W. van Rhijn, H.G. van der Poel, T.H. van der Kwast, Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur. Urol.*, 47 (2005) 736–748.
- [55] P. Dey, Urinary markers of bladder carcinoma, *Clin. Chim. Acta*, 340 (2004) 57–65.
- [56] J.M. Trigo, Tumor markers at the time of recurrence in patients with germ cell tumors, *Cancer*, 88 (2000) 162–168.
- [57] T.D. Gilligan, American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline on uses of serum tumor markers in adult males with germ cell tumors, *J. Clin. Oncol.*, 28 (2010) 3388–3404.
- [58] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski, *Techniki elektromigracyjne. Teoria i praktyka*, Malamut, Warszawa 2012.
- [59] S. Fanali, P.R. Haddad, C.F. Poole, P. Schoenmakers, D. Lloyd, *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*, Elsevier Inc., Waltham 2013.
- [60] R.A.W. Johnstone, M.E. Rose, *Spektrometria mas: podręcznik dla chemików i biochemików*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
- [61] J. Mazerski, *Podstawy chemometrii*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2000.
- [62] S. Wold, Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it?, *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 30 (1995) 109–115.
- [63] M. Dobosz, *Wspomagana komputerowo statystyczna analiza wyników badań*, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2001.
- [64] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Principal component analysis, *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 2 (1987) 37–52.
- [65] M. Daszykowski, B. Walczak, D.L. Massart, Projection methods in chemistry, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 65 (2003) 97–112.
- [66] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, UK 1989.
- [67] R.G. Brereton, *Applied chemometrics for scientists*, Wiley & Sons, Chichester, UK 2007.
- [68] K. Shimada, K. Mitamura, T. Higashi, Review. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids, *J. Chromatogr. A*, 935 (2001) 141–172.
- [69] P. Volin, Review. High-performance liquid chromatographic analysis of corticosteroids, *J. Chromatogr. B*, 671 (1995) 319–340.
- [70] R. Izquierdo-Hornillos, R. Gadzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, Method development for cortisol and cortisone by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate: application to urine samples of rugby players, *J. Chromatogr. Sci.* 43 (2005) 235–240.
- [71] A.H. Que, A. Palm, A.G. Baker, M. V. Novotny, Steroid profiles determined by capillary electrochromatography, laser-induced fluorescence detection and electrospray-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 887 (2000) 379–391.
- [72] M.T. Galceran, L. Puignou, Capillary electrochromatographic techniques for the analysis of biological fluids, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 743–758.
- [73] F.G. Bowling, M. Thomas, *Analyzing the metabolome*, Springer Science+Business Media, New York, USA 2014.
- [74] K. Alsadi, S.C. Voss, S. Kraiem, A. Alwahaibi, S. Alyazedi, N. Dbes, R. Goebel, V. Mohamed-Ali, S. Alsowaidi, A.M. Seyam, A.S. Bashraheel, M. Alsayrafi, C. Georgakopoulos, The effect of fasting during Ramadan on parameters of the haematological and steroidal modules of the athletes biological passport – a pilot study, *Drug Test. Anal.*, 7 (2015) 1017–1024.
- [75] P. Konieczna, J. Namieśnik, *Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007.
- [76] J. Pawliszyn, *Handbook of solid phase microextraction*, Chemical Industry Press, Beijing, China 2009.

- [77] Z. Brzózka, *Miniaturyzacja w analityce*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2005.
- [78] Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Podstawy chromatografii cieczowej i technik elektromigracyjnych*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2012.
- [79] S. Nomura, M. Fujitaka, N. Sakura, Circadian rhythms in plasma cortisone and cortisol and the cortisone/cortisol ratio, *Clin. Chim. Acta*, 266 (1997) 83–91.
- [80] S. AbuRuz, J. Millership, L. Heaney, Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges, *J. Chromatogr. B*, 798 (2003) 193–201.
- [81] A.P. Zis, R.A. Grant, B.E. Zis, The evening urine cortisol excretion test in depression, *Arch. Gen. Psychiat.* 44 (1987) 919–925.
- [82] P.M. Stewart, I. Mason, Cortisol to cortisone: glucocorticoid to mineralocorticoid. *Steroids*, 60 (1995) 143–146.
- [83] S.S. Inslicht, C.R. Marmar, T.C. Neylan, Increased cortisol in woman with intimate partner violence-related posttraumatic stress disorder, *Psychoneuroendocrinology*, 31 (2006) 825–838.
- [84] R. Gatti, E. Capellin, B. Zecchin, Urinary high performance reversed phase chromatography cortisol and cortisone analyses before and the end of a race in elite cyclists, *J. Chromatogr. B*, 824 (2005) 51–56.
- [85] A. Salvador, F. Suay, E. Gonzalez-Bono, M.A. Serrano, Anticipatory cortisol, testosterone and psychological responses to judo competition in young men, *Psychoneuroendocrinology*, 28 (2003) 364375.
- [86] B. Romer, S. Lewicka, D. Kopf, F. Lederbogen, B. Hamann, M. Gilles, C. Schilling, V. Onken, P. Frankhauser, M. Deuschle, Cortisol metabolism in depressed patients and healthy controls, *Neuroendocrinology*, 90 (2009) 301–306.
- [87] C.J. Chang, High-performance liquid chromatography of steroids in serum of goats during the breeding season, *Small Rumin. Res.*, 25 (1997) 175–180.
- [88] S.H. Lee, Y.J. Yang, K.M. Kim, B.Ch. Chung, Altered urinary profiles of polyamines and endogenous steroids in patients with benign cervical disease and cervical cancer, *Cancer Lett.*, 201 (2003) 121–131.
- [89] K. Detrich, E. Demidenko, A. Schned, M.S. Zens, J. Heaney, M.R. Karagas, Parity, early menopause and the incidence of bladder cancer in women: a case-control study and meta-analysis, *Eur. J. Cancer*, 47 (2011) 592–599.
- [90] R.W. Kennard, L.A. Stone, Computer aided design of experiments, *Technometrics*, 11 (1969) 137–148.
- [91] R.D. Snee, Validation of regression models: methods and examples, *Technometrics*, 19 (1977) 415–428.
- [92] M. Daszykowski, B. Walczak, D.I. Massart, Representative subset selection, *Anal. Chim. Acta*, 468 (2002) 91–103.

5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

We wrześniu 1997 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej ówczesnej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie

Gdański Uniwersytet Medyczny) pod kierunkiem prof. dr hab. Henryka Lamparczyka. W początkowym okresie mojej działalności naukowej realizowałam projekt badania składu złożonych leków obniżających ciśnienie krwi bez potrzeby ich wstępnego rozdzielania techniką spektrofotometrycznego miareczkowania w środowisku niewodnym z zastosowaniem rozpuszczalników różnicujących. Wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej i przedstawione na konferencji [zał. 4, pkt. 1., str 1]. Kluczowym etapem mojej pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych była realizacja szeregu projektów badawczych związanych z analizą jakościową i ilościową substancji leczniczych w preparatach farmaceutycznych i w materiale biologicznym metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem różnych sposobów detekcji: spektrofotometrycznej, fluorescencyjnej, elektrochemicznej. W ramach swojej działalności naukowej uczestniczyłam w badaniach biodostępności i biorównoważności preparatów farmaceutycznych zawierających m.in. metoklopramidu chlorowodorek, imipraminy chlorowodorek, karbamazepinę, hydrochlorotiazyd, glibenklamid, diklofenak potasu, gemfibrozil, piracetam, baklofen, 5-monoazotan izosorbidu, ciprofloksacyny chlorowodorek, ofloksacyny chlorowodorek, moklobemid. Powyższe badania były prowadzone we współpracy z Zakładami Farmaceutycznymi, Polpharma S.A. w Starogardzie Gdańskim i Polfa Warszawa, Biovena Pharma Sp. Z o.o. w Warszawie oraz z klinikami, m.in. z prof. Marianem Smoczyńskim z Kliniki Gastroenterologii i Hepatologii ówczesnej Akademii Medycznej w Gdańsku (AMG), dr hab. Walentym Nyką (obecnie prof.) z Kliniki Neurologii Dorosłych AMG (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny, GUMed) oraz z dr med. Jarosławem Kornowskim ze Szpitala dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Starogardzie Gdańskim. Ten etap pracy naukowej pozwolił mi na opanowanie warsztatu analitycznego w aspekcie nie tylko analiz chromatograficznych, z włączeniem chromatografii cieczowej i gazowej, ale i elektroforetycznych, jak i różnych sposobów przygotowania próbek do analiz z preparatów farmaceutycznych i matrycy biologicznej. W tym czasie w sposób teoretyczny i praktyczny szczegółowo zapoznałam się z walidacją metod analitycznych. Wyniki tej części mojej pracy badawczej obejmowały wyznaczenie profili farmakokinetycznych substancji leczniczych z różnorodnych grup farmakologicznych po jednorazowym podaniu doustnym oraz iniekcji dożylniej dawki leku u ludzi, a także u zwierząt hodowlanych. Rezultaty badań zostały opublikowane w artykule pełnotekstowym [zał.4 poz.2, str.1] oraz w komunikatach naukowych zaprezentowanych na sympozjach, zjazdach i konferencjach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym [zał.4 poz.1-9, str.2; poz.10,12-17 str.3 oraz poz.

18-21 str.4]. Byłam inicjatorem zakupu programu farmakokinetycznego *WinNonlin wersja 4.0.1.* akceptowanego przez FDA, za pomocą którego opracowywałam wyniki analiz chromatograficznych poprzez wyliczenie wartości parametrów farmakokinetycznych celem wykazania/bądź nie biorównoważności preparatów: badanego i referencyjnego. W latach 1999-2003 uzyskałam finansowanie ze źródeł wewnętrznych ówczesnej Akademii Medycznej w ramach badań własnych nt. Opracowanie metod oznaczania wybranych leków w materiale biologicznym techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Wyniki przeprowadzonych badań zostały zaprezentowane przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych w komunikatach zjazdowych [zał.4 poz.1-9 str.2 oraz pkt.10,12-17 str.3 i poz.18 str.4]. W tym czasie opracowałam szereg metodyk chromatograficznych i elektroforetycznych oznaczania substancji leczniczych zarówno w preparatach farmaceutycznych, jak i w materiale biologicznym (surowica, osocze, mocz, tkanki jadalne zwierząt).

Otrzymane wyniki analiz biodostępności preparatów badanych i referencyjnych, zawierających substancje lecznicze z różnych grup farmakologicznych, były dla mnie podstawą do podjęcia badań związanych z tematem mojej rozprawy doktorskiej nt. „Wpływ płci na farmakokinetykę wybranych leków”. W tym czasie samodzielnie zapoznałam się z metodami analiz statystycznych, z wykorzystaniem jedno- i wielowymiarowych narzędzi statystycznych, ze sprawdzeniem ich założeń i właściwym wykorzystaniem do oceny uzyskanych wyników analiz chromatograficznych i elektroforetycznych.

Promotorem mojej rozprawy doktorskiej był prof. dr hab. Henryk Lamparczyk, a jej przedmiotem była analiza statystyczna i chemometryczna profili farmakokinetycznych czternastu badanych i czternastu referencyjnych preparatów farmaceutycznych uzyskanych w ramach badania ich biodostępności i biorównoważności z wykorzystaniem technik separacyjnych. Rozprawę doktorską obroniłam 11 marca 2004 roku.

5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych moje zainteresowania badawcze głównie skupiały się na analizie substancji leczniczych oraz substancji endogennych w materiale biologicznym. W tym czasie kontynuowałam badania związane z analizą leków i ich zanieczyszczeń, zarówno w preparatach farmaceutycznych, jak i w materiale biologicznym. Rozwijałam swoje umiejętności analityczne, dalej zajmowałam się opracowaniem metod przygotowania próbek biologicznych do analizy

chromatograficznej i elektroforetycznej. W tym okresie zainteresowałam się, poza analizą steroidowych związków endogennych w moczu i osoczu krwi w kontekście analiz biomedycznych (w ocenie zaburzeń ich wydzielania jako wskaźników chorób - biomarkerów, w ocenie narażenia na stres), innymi związkami małowcząsteczkowymi (aminokwasy, neurotransmitery z ich metabolitami i prekursorami) jako potencjalnymi biomarkerami diagnostycznymi, prognostycznymi i predykcyjnymi. Wyniki tych analiz zostały zaprezentowane na sympozjach i konferencjach naukowych [zał. 4 pkt. II K poz.1-6 str.18] oraz [pkt.III B poz.1-10 str.19-20], a także pkt. III B poz.12,14-16;18-19;22,25,29-30,33,38,46,48,50 str. 20-24], a także [poz.52,58,61,63,65,68 str.24-26] i ten kierunek badań zamierzam kontynuować.

Istotnym elementem analiz jest etap przygotowania próbki, który obarczony jest największym błędem, zwłaszcza w przypadku próbek biologicznych. Dlatego moje zainteresowania badawcze obejmowały zastosowanie różnych technik ekstrakcji, takich jak ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid extraction, LLE*) [zał. 4 pkt. II A poz.8,11,16,19-25] oraz zał. 4 pkt III B poz. 6-10, 14,16,24,49,51,62,84,67,69-78,83-87,99-106] i ekstrakcji do fazy stałej (ang. *solid-phase extraction, SPE*) z zastosowaniem różnych wypełnień [zał. 4 pkt. II A poz. 3-4,13-15,17-18] oraz [zał. 4 pkt. III B poz. 3-5,11,15,18-21,22-26,33,37,38,40-48,50,55 63,63,65-68].

Obecnie moja działalność badawcza skupia się na optymalizacji technik ekstrakcji, ze szczególnym uwzględnieniem efektywnej mikroekstrakcji, w tym mikroekstrakcji do fazy stałej (ang. *solid phase microextraction SPME*), dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz (ang. *dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME*) i mikroekstrakcji do stałego sorbentu umieszczonego w igle strzykawkki (ang. *microextraction in package syringe, MEPS*) z zastosowaniem półautomatycznej pipety typu *eVol*. Wyniki przeprowadzonych analiz z wykorzystaniem optymalnej mikroekstrakcji dla izolacji małowcząsteczkowych związków polarnych, jakimi są neuroprzebieżniki, zostały opublikowane w artykułach pełnotekstowych z listy filadelfijskiej [zał. 4 pkt. II A pkt. 1,2 str. 7-8].

Wieloletnia współpraca z Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMed zaowocowała pełnotekstowymi artykułami [zał. 4 pkt. II A poz. 1-2, str. 7-8 i poz. 11 str.10] oraz licznymi doniesieniami na konferencjach i zjazdach o zasięgu krajowym i międzynarodowym dotyczącymi monitorowania leków przeciwnowotworowych stosowanych w leczeniu ostrej białaczki szpikowej AML [zał. 4 pkt III B poz. 1-2,5 10,12,14,16 str.19-20].

W ramach współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Onkologicznej GUMed dotyczącej analizy osteopontyny jako potencjalnego biomarkera raka sutka, otrzymane wyniki badań zostały opublikowane w artykule pełnotekstowym [zał. 4 pkt. II A poz. 7, str. 9] oraz przedstawione w formie komunikatów zjazdowych na konferencjach i sympozjach [zał. 4 pkt III B poz. 2,13,23,28 str19-22].

Głównym kierunkiem moich badań naukowych jest udoskonalanie metodyk chromatograficznych i elektroforetycznych celem poszukiwania małowcząsteczkowych związków endogennych jako potencjalnych biomarkerów różnych chorób, zwłaszcza chorób nowotworowych. Ważnym nurtem moich badań jest kontynuacja optymalnego oznaczania związków steroidowych w **analizie celowanej** techniką łączoną LC-MS. Poza publikacjami włączonymi do cyklu [**H2-H8**], kolejne prace są w trakcie recenzji, dotyczą jednoczesnych analiz panelu (12, w dalszym etapie 22) hormonów steroidowych i ich metabolitów oraz 21 aminokwasów w osoczu, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym u dzieci ze zdiagnozowaną ostrą białaczką limfoblastyczną (ang. *acute lymphoblastic leukemia, ALL*). Rezultaty tych analiz były prezentowane na sympozjach i konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym [zał. 4 pkt III-B poz.3,4,18 str. 18,21]. W opracowaniu jest manuskrypt obejmujący oznaczanie poziomu aminokwasów u dzieci chorych na ostrą białaczką limfoblastyczną ALL w momencie diagnozy, w trakcie chemioterapii i po jej zakończeniu. Obecnie moje zainteresowania badawcze obejmują jednoczesną analizę poziomu związków małowcząsteczkowych, odpowiednio 9 i 12, amin biogennych i ich metabolitów oraz prekursorów jako potencjalnych biomarkerów chorób nowotworowych, w tym guzów litych u dzieci. Pierwsze wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej [zał. 4 pkt. II A poz. 1-2, str. 7-8] oraz zał. 4 pkt II-B poz. 27 i 28].

W ramach kontynuacji głównego kierunku badań poszukiwania biomarkerów chorób, planuję wykonanie **analizy niecelowanej** przechowywanego w warunkach głębokiego zamrożenia materiału biologicznego uzyskanego od pacjentów, jako alternatywę, a jednocześnie uzupełnienie dotychczasowych wyników w kontekście nowoczesnego wielopoziomowego podejścia do problematyki biomarkerowej.

W obszarze moich zainteresowań badawczych było opracowanie metod oznaczania substancji leczniczych w preparatach i w materiale biologicznym, jak również związków endogennych w płynach ustrojowych technikami elektromigracyjnymi, w tym elektroforezy kapilarnej (ang. *Capillary Electrophoresis, CE*), elektrokinetycznej micelarnej chromatografii kapilarnej (ang. *Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis, MEKC*) oraz elektroforezy żelowej jedno- i dwukierunkowej (ang. *One and Two Dimensional Gel*

Electrophoresis, 1D-PAGE, 2D-PAGE). Wyniki przeprowadzonych analiz zostały opublikowane w postaci artykułów pełnotekstowych [zał. 4 pkt II A poz.6 str. 9, poz.13 str. 11, poz.17 str. 12, poz.25 str.14] oraz zaprezentowane na konferencjach naukowych [zał. 4 pkt III-B poz.23,27,28,30,32,33,35-36,42,48,54,60,64,67,69,73,75,84,105]. W ramach poszerzania swojego warsztatu analitycznego, interesujące były prace porównawcze wyników analiz wykonanych różnymi technikami separacyjnymi, HPLC i CE co pozwoliło na poszerzenie wiedzy w zakresie stosowania obu technik, zapoznanie się z możliwościami oraz dokonanie oceny wad i zalet prezentowanych technik separacyjnych. Wyniki analiz porównawczych zostały przedstawione na konferencjach naukowych [zał. 4 pkt. III B poz. 5,103] oraz w formie pełnotekstowej publikacji [zał. 4 pkt. II A, poz.24 str.14].

Byłam współwykonawcą projektu dotyczącego klasyfikacji kolumn metodą QSRR mającym na celu dokonanie oceny przydatności wypełnień kolumn, ich użyteczności w odwróconym układzie faz dla jednoczesnego oznaczenia dwóch substancji czynnych, lidokainy i tribenozydu wraz z ich zanieczyszczeniami, czego efektem było opracowanie i zaproponowanie alternatywnej metody jednoczesnego oznaczania obu substancji czynnych oraz ich zanieczyszczeń w odniesieniu do dwóch farmakopealnych metod dotyczących analizy pojedynczych związków, lidokainy i tribenozydu [zał. 4 pkt IIA poz. 8, str.9] oraz [zał. 4 pkt. III-B poz. 9].

We współpracy z prof. dr hab. Barbarą Kamińską z Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego opracowałam pionierską metodę jednoczesnego oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach; A, D i jej metabolitów, E i K we krwi u dzieci chorych na mukowiscydozę. Celem projektu była ocena poziomu wymienionych witamin u młodych pacjentów w momencie diagnozy mukowiscydozy, sprawdzenie efektów suplementacji witamin w trakcie stosowania zindywidualizowanej diety, przebiegającej pod ścisłą kontrolą lekarza i dietetyka w trakcie leczenia. Ponadto sprawdzenie efektów terapii po roku leczenia żywieniowego oraz ewentualna odpowiedź na pytanie, czy przeprowadzone badania oszacowania poziomu witamin mogą być użyteczne jako wskaźniki stanu odżywiania dzieci z mukowiscydozą i czy mogą posłużyć w przyszłości jako potencjalne biomarkery diagnostyczne, być może też prognostyczne tego schorzenia. Interesujące wyniki badań zostały opracowane pod względem statystycznym i chemometrycznym z zastosowaniem programu SIMCA, aktualnie praca jest przyjęta do druku w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016.

W ramach współpracy z dr hab. med. Tomaszem Zdrojewskim z Zakładu Prewencji i Dydaktyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej biorę udział w przekrojowych badaniach epidemiologicznych „*Silent AF Survey*” mającym na celu ocenę częstości występowania migotania przedsionków w Polsce w kontekście czynników ryzyka sercowo-naczyniowego w populacji 65+.

Obecnie w obszarze moich zainteresowań naukowych jest rozwój i udoskonalanie metodyk chromatograficznych, chromatografii ciekowej LC i LC sprzężonej z detekcją mas LC-MS. Związki małowcząsteczkowe o budowie polarnej, jakimi są aminokwasy i aminy biogenne z ich metabolitami i prekursorami są trudne do analizy w odwróconym układzie faz RP, gdyż są słabo zatrzymywane w kolumnie wypełnionej niepolarną fazą stacjonarną. Zatrzymywanie w takiej kolumnie bardzo polarnych analitów wymaga stosowania faz o małej lotności z dużą zawartością wody. Trudno stosować takie fazy, gdy chromatograf jest połączony ze spektrometrem mas, w którym stosuje się elektrorozpraszanie. W takich przypadkach idealnym rozwiązaniem jest zastosowanie chromatografii oddziaływań hydrofilowych *HILIC*, gdzie chromatografowanie zaczyna się przy użyciu fazy ruchomej zawierającej dużą ilość lotnego rozpuszczalnika organicznego w wyniku tego nie ma potrzeby długotrwałego odparowywania rozpuszczalnika i ponownego rozpuszczania analitu. Opracowałam metodę LC-HILIC/MS do oznaczania aminokwasów i neurotransmiterów wraz z ich metabolitami i prekursorami. Wyniki badań dotyczących neurotransmiterów opublikowano w czasopiśmie z listy filadelfijskiej [zał. 4 pkt. II A poz. 1-2, str. 7-8].

6. *Udział w projektach badawczych*

W trakcie działalności naukowo-badawczej zrealizowałam dwa projekty badań własnych, które były finansowane przez ówczesną Akademię Medyczną w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny) dotyczących zastosowania techniki wysokosprawnej chromatografii ciekowej do analizy leków z różnych grup farmakologicznych w preparatach farmaceutycznych i w materiale biologicznym. Jednym z wykonanych projektów była osteopontyna jako potencjalny biomarker raka piersi [zał. 4 pkt II-I poz.2 str.16].

W latach 2010-2013 uzyskałam dofinansowanie z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako kierownik grantu dotyczącego analizy osteopontyny jako potencjalnego

biomarkera raka piersi [pkt II-I poz.3 str.16]. Grant został rozliczony w zaplanowanym terminie, efektem jest publikacja [zał 4 pkt IIA, poz.7 str.9] włączona do dorobku naukowego. W tym samym okresie również współpracowałam jako główny wykonawca grantu N N 405 423839 uzyskanego z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, obejmującego usprawnienie rozdzieleń peptydów w proteomice z wykorzystaniem HPLC z gradientem pH, czego efektem jest współautorstwo publikacji obejmującej klasyfikację kolumn QSRR [zał. 4 pkt IIA, poz. 8, str. 9].

Obecnie jestem kierownikiem grantu nr 2011/03/B/NZ7/02333 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki nt. Biomedyczna i chemometryczna ocena nowych narzędzi analitycznych w badaniach substancji endogennych jako biomarkerów nowotworowych, w ramach którego do chwili obecnej opublikowałam dwie prace [**H7** i **H8**] włączone do cyklu przedstawionego osiągnięcia naukowego. Aktualnie opublikowane zostały dwie prace w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, *Journal of Chromatography A* i *Talanta*, gdzie jestem pierwszym autorem [zał. 4 pkt. II A poz. 1-2, str. 7-8]. Kolejne dwa manuskrypty zostały wysłane do recenzji w *Journal of Chromatography B* i *PLoS ONE*.

Również bardzo aktywnie występowałam w latach 2010-2015 do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz do Narodowego Centrum Nauki z wnioskami o finansowanie 10 projektów badawczych, w tym 6 jako kierownik projektu i 4 jako wykonawca. Uzyskałam finansowanie jako kierownik grantu dla dwóch projektów, ponadto 3 z nich pomimo niezakwalifikowania do finansowania, uzyskały wysokie oceny recenzentów określone jako projekt bardzo dobry i wyróżniający się.

7. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

W ramach działalności dydaktycznej jestem współautorem skryptu dla studentów III roku kierunku farmacja dotyczącego chemicznych metod ilościowego oznaczenia środków leczniczych. Prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów III roku kierunku farmacja w ramach ćwiczeń z przedmiotu Chemia Farmaceutyczna. Biorę aktywny udział w zajęciach fakultatywnych dla studentów II-V roku kierunku farmacja. Ponadto aktywnie uczestniczę w prowadzeniu kursów szkoleniowych w ramach kształcenia ustawicznego dla farmaceutów oraz w prowadzeniu zajęć będących elementem kursów podyplomowych dla farmaceutów i przedstawicieli przemysłu z branży analitycznej i chemicznej z zakresu optymalizacji

metod chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas wraz z ich walidacją oraz z zakresu analizy środków leczniczych i preparatów farmaceutycznych. W latach 2000 – 2014 byłam opiekunem 20 prac magisterskich zakończonych uzyskaniem tytułu magistra przez studentów Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dawnej Akademii Medycznej). Wielokrotnie sprawowałam opiekę merytoryczną nad studentami uczelni zagranicznych, przebywających na naszym Wydziale w ramach odbywania praktyk z tytułu międzynarodowej wymiany studentów.

W zakresie działalności organizacyjnej byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego XXIII Konferencji Naukowej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku nt. „Wydział Farmaceutyczny AMG w obszarach badawczych farmacja kosmetyki biotechnologia”, która odbyła się w dniach 21-22 maja 2009 roku na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dawnej Akademii Medycznej w Gdańsku), aktywnie uczestniczyłam w jej przygotowaniu organizacyjnym i programowym, przeprowadzeniu i w podsumowaniu konferencji oraz w przygotowaniu Przewodnika Bibliograficznego [zał. 4 pkt. II E poz. 3, str. 16].

Od roku 2004 zajmuję się planowaniem i realizacją zakupu aparatury, sprzętu, odczynników chemicznych, substancji leczniczych niezbędnych do wykonywania badań zarówno na polu naukowym, jak i dydaktycznym w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej. Biorę czynny udział w przetargach na zakupienie odpowiedniej dla Katedry aparatury i sprzętu laboratoryjnego.

Jestem założycielem i od roku 2011 opiekunem Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GUMed. Wraz ze studentami Koła Naukowego w roku 2014 w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej skatalogowałam próbki biologiczne przechowywane w temperaturze głębokiego zamrożenia (-80°C) tworząc elektroniczną bazę danych stanowiącą „mini bio-bank”, co umożliwiła łatwą i szybką weryfikację posiadanego materiału biologicznego przeznaczonego do dalszych badań.

Moją pasją są podróże i zwiedzanie interesujących zakątków Europy, dlatego opisałam moje wspomnienia z wycieczki pracowników ówczesnej Akademii Medycznej (obecnie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) do Francji (Paryż i zamki nad Loarą) w 2007 roku. Artykuł został zamieszczony w Gazecie AMG [zał. 4 pkt. II D poz. 4 str. 15].

8. Nagrody i wyróżnienia

W uznaniu za prace badawcze i działalność dydaktyczną w latach 2007-2014 uzyskałam łącznie osiem Naukowych Nagród Zespołowych Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w tym 2 nagrody II stopnia w latach 2007- 2009 i 6 nagród I stopnia w latach 2009, 2011, 2012 (dwie nagrody), 2013 i 2014 [zał. 4 pkt II-J str.17].

9. Podsumowanie dorobku naukowego

Charakter pracy	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora
Łączna liczba wszystkich prac oryginalnych i przeglądowych:		36
Liczba opublikowanych prac oryginalnych:	2	34
w tym publikacji z listy filadelfijskiej:	2	31
w tym spoza listy filadelfijskiej:	-	3
Liczba opublikowanych prac przeglądowych:	-	1
w tym spoza listy filadelfijskiej:		1
Łączna liczba doniesień naukowych:	20	108
w tym posterów:	19	102
w tym komunikatów ustnych:	1	6
Sumaryczny IF ¹ prac; punktacja MNiSW:	2,121; 17,00	59,099; 703
Sumaryczny IF ¹ wszystkich prac:		61,22; 720,0
Sumaryczna liczba cytowań wszystkich prac według bazy Web of Science ² ; według bazy Scopus ³	195 ² (bez autocytowań 184) ²	227 ³ (bez autocytowań 215) ³
Index Hirscha ^{4,5}		9 ⁴ /9 ⁵

¹Wartości IF zgodnie z rokiem opublikowania oprócz prac z roku 2015 (brak wskaźnika)

²Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science z dnia 24.11.2015 r.

³Liczba cytowań publikacji według bazy Scopus z dnia 24.11.2015 r.

⁴Indeks Hirscha według bazy Web of Science z dnia 24.11.2015 r.

⁵Indeks Hirscha według bazy Scopus z dnia 24.11.2015 r.

Lucyna Konieczna