AUTOREFERAT

Dr n. med. Danuta Dudzik

NIECELOWANE ANALIZY METABOLOMICZNE W PRAKTYCE KLINICZNEJ NA PRZYKŁADZIE PERINATOLOGII

Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki
Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2019

I. Imię i nazwisko

Danuta Dudzik

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

02 listopada 2004 tytuł magistra farmacji, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Białymstoku

18 listopada 2009 tytuł doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej; rozprawa doktorska pt. ”Aktywność N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy lizosomalnej oraz N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy cytoplazmatyczno-jądrowej w surowicy krwi i w łożysku w cukrzycy ciążowej” Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2005 – 2009 Studia Doktoranckie, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

2009 – 2014 Asystent, Zakład Farmakologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

2011 – 2014 Staż podoktorski, Centrum Metabolomiki i Bioanaliz (CEMBIO), Uniwersytet San Pablo CEU, Madryt, Hiszpania

2014 – obecnie Pracownik naukowy, Centrum Metabolomiki i Bioanaliz (CEMBIO), Uniwersytet San Pablo CEU, Madryt, Hiszpania

2018 – obecnie Asystent (pracownik naukowy), Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Niecelowane analizy metabolomiczne w praktyce klinicznej na przykładzie perinatologii

b) Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe

Osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny w ramach postępowania habilitacyjnego stanowi cykl 6 publikacji (4 prace oryginalne i 2 prace poglądowe), opublikowane w latach 2014-2018. W 4 pracach jestem pierwszym autorem, natomiast w 2 pracach pełniłam funkcję autora

korespondencyjnego. Wszystkie publikacje zostały zmieszczone w czasopismach znajdujących się w *bazie Journal Citation Reports* (JRC) o łącznym współczynniku oddziaływania (**IF**) z roku ukazania się publikacji równym **19,461** i łącznej wartości punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (**MNiSW**) wynoszącej **205**. Przedstawione prace są monotematyczne i dotyczą wykorzystania zaawansowanych, wielkoskalowych technik analitycznych opartych na spektrometrii mas połączonej z różnymi technikami separacyjnymi tj. wysokosprawną chromatografią cieczową, chromatografią gazową oraz elektroforezą kapilarną w niecelowanych analizach metabolomicznych. Wyniki prac ukazują niewątpliwy potencjał i szerokie perspektywy płynące z wykorzystania nowoczesnych rozwiązań analitycznych w praktyce klinicznej, co przedstawiono na przykładzie badań prowadzonych w obszarze perinatologii. Ponadto, przedstawiony cykl prac zawiera dwie prace poglądowe skupiające się na newralgicznych aspektach analiz niecelowanych, związanych z poprawnym przeprowadzeniem i utrzymaniem standardów najwyższej jakości projektu badawczego. Według rankingów udostępnionych przez wydawnictwa *Wiley Online Library* oraz *Elsevier*, prace te cieszą się dużym zainteresowaniem środowiska naukowego, o czym bezsprzecznie świadczy wysoka liczba cytowań.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

O1 **Dudzik D**, Zorawski M, Skotnicki M, Zarzycki W, Kozlowska G, Bibik-Malinowska K, Vallejo M, García A, Barbas C, Ramos MP. Metabolic fingerprint of Gestational Diabetes Mellitus. J Proteomics. 2014 May 30;103:57-71.
IF = 3,888 / MNiSW: 35

O2 Lorenzo MP, **Dudzik D**, Varas E, Gibellini M, Skotnicki M, Zorawski M, Zarzycki W, Pellati F, García A. Optimization and validation of a chiral GC-MS method for the determination of free D-amino acids ratio in human urine: application to a gestational diabetes mellitus study. J Pharm Biomed Anal. 2015 Mar 25;107:480-7.
IF = 3,169 / MNiSW: 35

O3 **Dudzik D**, Zorawski M, Skotnicki M, Zarzycki W, García A, Angulo S, Lorenzo MP, Barbas C, Ramos MP. GC-MS based Gestational Diabetes Mellitus longitudinal study: Identification of 2- and 3-hydroxybutyrate as potential prognostic biomarkers. J Pharm Biomed Anal. 2017 Sep 10;144:90-98.
IF = 2,831 / MNiSW: 35

O4 **Dudzik D***, Revello R, Barbas C, Bartha JL. LC-MS-based metabolomics identification of novel biomarkers of chorioamnionitis and its associated perinatal neurological damage. J Proteome Res. 2015 Mar 6;14(3):1432-44.
IF = 4,173 / MNiSW: 40

O5 Hernandes VV, Barbas C, **Dudzik D***. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. Electrophoresis. 2017 Sep;38(18):2232-2241.
IF = 2,569 / MNiSW: 25

O6 Dudzik D, Barbas-Bernardos C, García A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. A review. J Pharm Biomed Anal. 2018 Jan 5;147:149-173. IF = 2,831 / MNiSW: 35

* W pracach **O4** oraz **O5,** pełniłam funkcję autora korespondencyjnego
Szczegółowe informacje dotyczące mojego wkładu w powstanie poszczególnych prac zostały zawarte w załączniku nr 3.

Sumaryczny IF = 19,461 / MNiSW: 205

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

1. WPROWADZENIE

1.1. Poznanie ludzkiego metabolomu

Metabolomika to prężnie rozwijająca się, zwłaszcza w ostatniej dekadzie dziedzina biologii systemowej obejmująca szeroki i interdyscyplinarny zakres wiedzy. Współczesne ujęcie metabolomiki odnosi się do zaawansowanych technologicznie badań mających na celu poznanie kompletnego składu metabolitów (metabolomu), który może wykazywać różnice zależne od stanu fizjologicznego, stopnia rozwoju bądź obecności zaburzeń w funkcjonowaniu komórki, tkanki, narządu czy też całego organizmu [1–3]. Badania metabolomiczne pozwalają na jakościowe oraz ilościowe analizy składu próbek biologicznych w kierunku poszukiwania zależności i wyjaśnienia zmian między obserwowanym profilem metabolicznym a występowaniem określonej jednostki chorobowej [1]. Metabolom tworzy złożona kompozycja małocząsteczkowych związków, zazwyczaj o masie molekularnej mieszczącej się w granicach 80 – 1500 Da, znalezionych w organizmie ludzkim, należących do różnych klas chemicznych włączając w to między innymi węglowodany, lipidy, aminokwasy, oligopeptydy, peptydy, minerały, aminy biogenne, nukleotydy, kwasy organiczne, witaminy, hormony. Ponadto, skład endogennego metabolomu może być zaburzony różnorodnymi czynnikami egzogennymi. Wprowadzony termin ekspozom (ang. *exposome*) służy do opisania całkowitego narażenia organizmu na zagrożenia środowiskowe np. zanieczyszczenie środowiska, leki, toksyny, dodatki żywności, kosmetyki, pestycydy, barwniki oraz obejmuje wszelkie inne substancje, które są spożywane, metabolizowane czy katabolizowane przez organizm począwszy od momentu poczęcia [4–6]. W związku z tym oszacowanie całkowitego rozmiaru ludzkiego metabolomu jest bardzo trudne [6]. Niemniej, w roku 2007 w ramach projektu *The Human Metabolome Project* opracowano ogólnodostępną bazę *The Human Metabolome Database* (HMDB) i po raz pierwszy przedstawiono zarys 2180 metabolitów występujących w tkankach oraz płynach ludzkich [7]. Obecnie HMDB jest uznana za największą na świecie, obszerną bazę zawierającą charakterystykę 114 100 związków, zarówno tych już poznanych

jak i mogących wystąpić, a scharakteryzowanych dzięki zaawansowanym modelom matematycznym przy użyciu narzędzi *in silico* [6].

1.2. Metabolomika w ujęciu biologii systemowej

Technologie „omiczne" (genomika, transkryptomika, proteomika oraz metabolomika) będące podstawą biologii systemowej w istotnym stopniu zmieniły sposób postrzegania funkcjonowania ludzkiego organizmu, zarówno w stanie homeostazy, jak i w odpowiedzi na czynniki chorobotwórcze. Nauki te charakteryzują oraz dostarczają cennych informacji o funkcjonowaniu ludzkiego genomu, transkryptomu, proteomu czy też metabolomu. Biologia systemowa ma za zadanie integrować dane zdobywane przez poszczególne „omiki" w celu możliwie pełnego zrozumienia i modelowania procesów zachodzących na wszystkich poziomach molekularnych. Jednakże, niezwykle ważnym faktem jest iż metabolomika, jako końcowy etap wszystkich procesów biologicznych jest kluczowym ogniwem, najdokładniej obrazującym aktualny stan organizmu i jego fenotyp [8]. Metabolity stanowią produkt metabolizmu, reakcji biochemicznych, zapisanych w szlakach metabolicznych, stanowiąc produkt pośredni zapisu kodu genetycznego. Zmiany obserwowane na poziomie genomu, transkryptomu czy też proteomu mogą jedynie świadczyć o predyspozycjach danego zdarzenia, podczas gdy metabolom odzwierciedla aktualny stan fizjologiczny na poziomie komórki, tkanki, narządu czy całego organizmu. Właśnie w tym aspekcie metabolomika stanowi doskonałe narzędzie badawcze ściśle ukierunkowane na poszukiwanie nowych biomarkerów prognostycznych i diagnostycznych, jak też przyczynia się do opracowania lepszych możliwości terapeutycznych. Systemowe ujęcie poszczególnych „omik" i ich związek z regulowanymi procesami przedstawiono na rycinie 1.

1.3. Strategie badawcze w metabolomice

W zależności od celu prowadzonych badań metabolomicznych stosowane są dwa podejścia analityczne: analiza celowana (ang. *targeted*) oraz niecelowana (ang. *untargeted, non-targeted*).

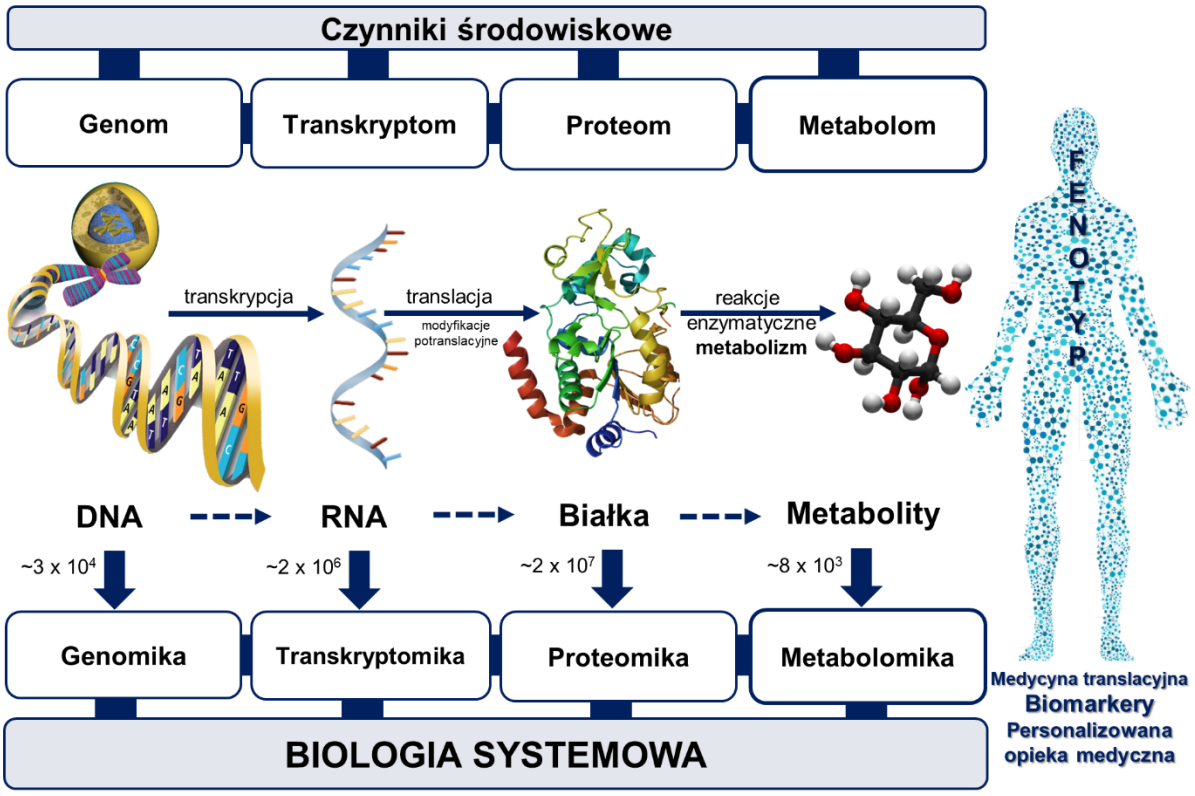
Analiza celowana ogranicza się do pomiaru znanych substancji, jednego lub kilku metabolitów, o dużym znaczeniu biologicznym, zidentyfikowanych oraz scharakteryzowanych w wyniku uprzednio prowadzonych badań. W tym celu stosowane są ilościowe metody analityczne charakteryzujące się wysokim poziomem specyficzności, precyzji oraz selektywności. Oznaczenie stężenia danego analitu, wykonywane jest za pomocą krzywych kalibracyjnych sporządzonych przy użyciu wyselekcjonowanych substancji wzorcowych. Celowane analizy ilościowe wykonywane są najczęściej z wykorzystaniem selektywnych i czułych spektrometrów mas typu potrójny kwadrupol, operujących w trybie monitorowania wybranych jonów, SIM (ang. *selected ion monitoring*) lub monitorowania reakcji wielokrotnych, MRM (ang. *multiple reaction monitoring*) [9].

Analiza niecelowana, określana również **metabolomiczną analizą odcisku palca** (ang. *metabolic fingerprinting*) z założenia ma charakter globalny, gdzie w przebiegu jednego eksperymentu priorytetem jest równoczesny pomiar możliwie dużej ilości metabolitów w każdej analizowanej próbce. Analiza

niecelowana jest wolna od stawianych *a priori* hipotez i jest obecnie traktowana jako faza czysto poznawcza, której nadrzędnym zadaniem jest charakterystyka oraz badanie danego metabolomu pod kątem jego zmian jakie zachodzą w odpowiedzi na działanie danego czynnika [10]. Strategia niecelowana pozwala na wyznaczenie nowych kierunków i założeń badawczych. Należy pamiętać, iż, wyniki uzyskane w wyniku przeprowadzenia pomiarów o charakterze analizy globalnej powinny zostać zweryfikowane przeprowadzeniem analiz celowanych [10].

Ponadto, można wykonać również tzw. **profilowanie metabolitów** (ang. *metabolic profiling*), określające analizę metabolomiczną mającą na celu badanie związków wchodzących w sprecyzowany szlak metaboliczny (np. cykl Krebsa, metabolizm kwasów tłuszczowych, szlak pentozofosforanowy) bądź analizę określonej grupy metabolitów o podobnych właściwościach fizykochemicznych np. aminokwasów, węglowodanów, nukleozydów. Profilowanie często obejmuje nie tylko identyfikację, ale również ocenę ilościową metabolitów [11].

Specyficzną odmianą niecelowanych analiz jest również tzw. **badanie metabolomicznego odcisku stopy** (ang. *metabolic footprinting*), które odnosi się do pomiaru metabolitów zewnątrzkomórkowych, tzw. egzometabolomu czyli np. metabolitów wydzielanych do podłoża hodowlanego przez wyselekcjonowane szczepy bakterii [12].



Rycina 1. Systemowe ujęcie technik „omicznych" i schemat przepływu informacji na poszczególnych poziomach molekularnych pozwalający na holistyczną ocenę procesów charakterystycznych dla aktualnego stanu organizmu. Metabolom, jako końcowy produkt transkrypcji genów, jest najbardziej zbliżony do fenotypu badanego systemu biologicznego.

1.4. Narzędzia badawcze w niecelowanych analizach metabolomicznych

Niecelowana analiza metabolomiczna skupia się na kompleksowej charakterystyce oraz oznaczeniu jakościowym i ilościowym zmian zachodzących w całym badanym metabolomie. Podstawowym celem stosowanych narzędzi badawczych jest umożliwienie pomiaru jak największej ilości metabolitów w analizowanej matrycy. Jednakże, zadanie to stanowi duże wyzwanie analityczne, gdyż metabolity są związkami chemicznymi posiadającymi zróżnicowane właściwości fizykochemiczne i strukturalne, występujące również w różnym zakresie stężeń. Dlatego też niecelowane analizy metabolomiczne wymagają zastosowania wysoce wydajnych i komplementarnych technik analitycznych o wysokiej czułości, precyzji, dokładności oraz powtarzalności pomiarów. W tym celu wykorzystywane są metody oparte głównie na spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, NMR (ang. *nuclear magnetic resonance*) oraz spektrometrii mas, MS (ang. *mass spectrometry*) [5,13–15].

Technika **NMR** charakteryzuje się łatwością w przygotowaniu próbek do analizy, wysokim stopniem powtarzalności i jest metodą preferowaną przy określeniu struktury, konformacji oraz dynamiki poszczególnych związków chemicznych. Ponadto, w przypadku złożonych próbek biologicznych składniki matrycy w mniejszym stopniu wpływają na intensywność sygnału. Głównym ograniczeniem NMR jest jej niska czułość oraz złożoność uzyskanych widm [15–17].

Z kolei **spektrometria mas**, jest wysoce wydajną i niezwykle czułą techniką, opartą na pomiarze stosunku masy do ładunku (*m/z*) jonów w fazie gazowej. Obecnie pozwala ona oznaczyć związki chemiczne na poziomie nanomolowym, pikomolowym czy nawet femtomolowym [16]. Technika MS umożliwia dokładną charakterystykę danego związku względem jego struktury poprzez określenie jego dokładnej masy, rozkładu izotopowego, wzoru sumarycznego, jak też umożliwia uzyskanie charakterystycznych jonów fragmentacyjnych służących do jego identyfikacji [16,18]. Ze względu na złożone matryce biologiczne, którymi najczęściej są płyny ustrojowe np. osocze, mocz bądź inny materiał biologiczny np. tkanki, hodowle komórkowe, metody wykorzystujące spektrometrię mas wymagają wcześniejszego zastosowania technik separacyjnych umożliwiających rozdzielenie analizowanych związków. Metodą z wyboru w badaniach wielkoskalowych jest połączenie spektrometrii mas z wysokorozdzielczymi technikami rozdzielania takimi jak chromatografia cieczowa, LC (ang. *liquid chromatography*), chromatografia gazowa, GC (ang. *gas chromatography*) czy elektroforeza kapilarna, CE (ang. *capillary electrophoresis*) [13,19].

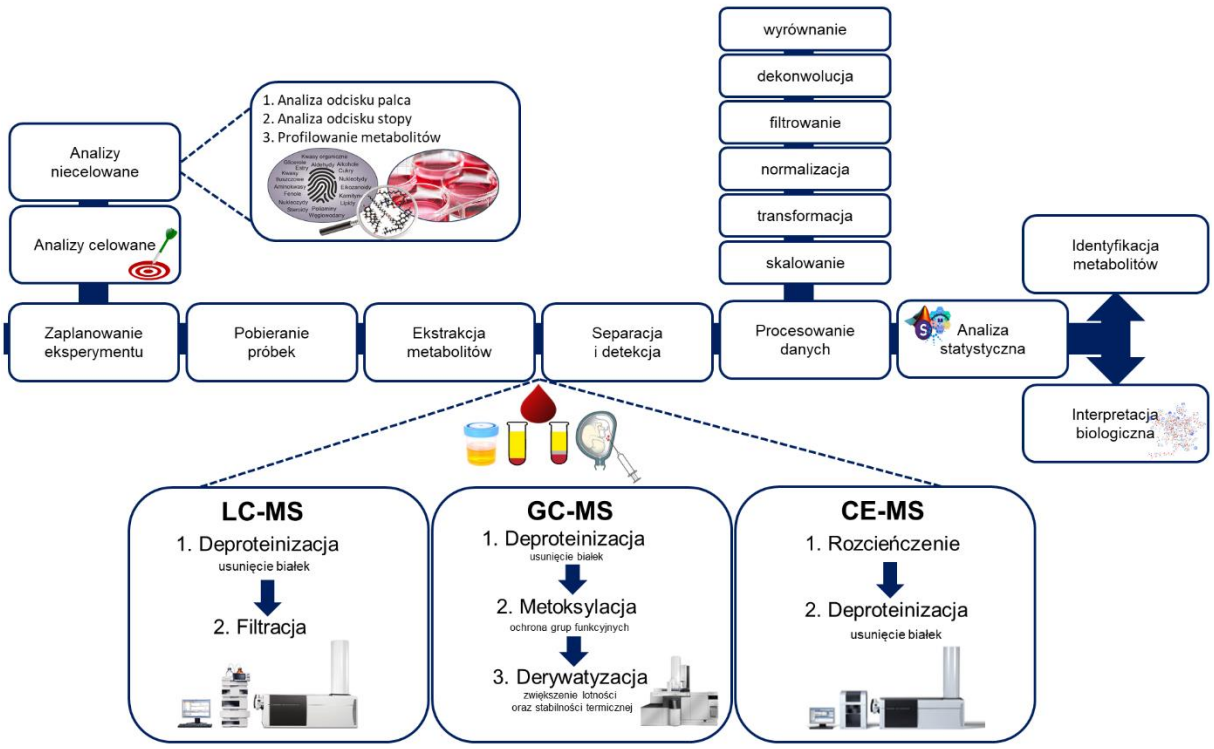
Badania z wykorzystaniem techniki **LC-MS** pozwalają na analizę jakościową setek a nawet tysięcy metabolitów podczas jednego eksperymentu. W technice LC-MS wybór odpowiedniej procedury ekstrakcji metabolitów, dobór odpowiednich kolumn chromatograficznych (np. chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych, HILIC (ang. *hydrophilic interaction liquid chromatography*) bądź w odwróconym układzie faz RPLC (ang. *reversed phase liquid chromatography*) i dobór kompozycji faz ruchomych zapewnia możliwość analizowania szerokiego spektrum związków, od hydrofilowych po hydrofobowe [19]. W praktyce najczęściej stosowana jest wysokosprawna

chromatografia cieczowa, HPLC (ang. *high-performance liquid chromatography*), bądź ultrasprawna chromatografia cieczowa, UHPLC (ang. *ultra-high performance liquid chromatography*) z wykorzystaniem chromatografii odwróconej fazy, RPLC, w połączeniu z tandemową spektrometrią mas z analizatorem kwadrupolowym i czasu przelotu, Q-TOF (ang. *quadrupole – time of flight*), oraz z zastosowaniem wybranej metody jonizacji np. opartej na transferze jonów z roztworu do fazy gazowej przez rozpylanie w polu elektrycznym, ESI (ang. *electrospray ionization*), bądź zastosowaniu innych rozwiązań technologicznych [13,15].

Wykonanie analiz **GC-MS** wymaga przekształcenia substancji nielotnych w lotne pochodne poprzez proces upochadniania (konwersja chemiczna), związany z wprowadzeniem do analizowanych związków odpowiednich grup funkcyjnych lub z ich blokowaniem. Proces ten zwiększa również stabilność termiczną oraz wpływa na poprawę rozdzielczości, selektywności oraz specyficzności oznaczeń [13,20]. Do konwersji chemicznej związków organicznych zawierających grupy funkcyjne z aktywnymi atomami wodoru, tj. np.: -COOH, -OH, -NH i -SH stosuje się najczęściej reakcję sililowania, w której aktywny wodór jest zastąpiony przez grupę alkilosililową, na przykład trimetylosililową (-$SiMe_3$) [21]. GC-MS umożliwia analizę związków takich jak kwasy tłuszczowe, aminokwasy, kwasy organiczne, węglowodany czy też alkohole alifatyczne.

Kolejna, platforma **CE-MS** dostarcza istotnych informacji o niskocząsteczkowych polarnych związkach oraz metabolitach obdarzonych ładunkiem elektrycznym. Mechanizm separacji w CE zasadniczo różni się od mechanizmów LC oraz GC, przez co oznaczanie związków techniką elektroforezy kapilarnej dostarcza komplementarnych informacji o kompozycji badanej próbki biologicznej.

Typowy projekt związany z zastosowaniem niecelowanych analiz metabolomicznych zakłada przeprowadzenie poszczególnych procedur według ustalonego schematu, który został przedstawiony na rycinie 2. Najważniejsze elementy tego procesu skupiają się na (1) właściwym zaplanowaniu eksperymentu, (2) pobieraniu próbek i ich zabezpieczeniu zgodnie z ustalonymi wytycznymi, (3) przygotowaniu próbek oraz przeprowadzeniu procesu ekstrakcji metabolitów, (4) wykonaniu analiz metabolomicznych (np. LC-MS, GC-MS, CE-MS), (5) przygotowaniu oraz procesowaniu uzyskanych danych, (6) wykonaniu analizy statystycznej (jednowymiarowe, wielowymiarowe analizy statystyczne), (7) identyfikacji metabolitów (na podstawie interpretacji widm fragmentacyjnych, przeszukiwania dostępnych bibliotek, analizy dostępnych standardów chemicznych) oraz (8) interpretacji i dyskusji nad uzyskanymi wynikami w kontekście ich znaczenia biologicznego. Należy podkreślić, iż każda składowa tego procesu jest niezwykle istotna a od kontroli i jakości jej wykonania może zależeć powodzenie całego projektu. Obszerny przegląd wszystkich niepożądanych zmiennych mogących wystąpić zarówno przed rozpoczęciem analiz, na poziomie analitycznym jak i po zakończeniu pomiarów, związanych z dalszym przetwarzaniem uzyskanych informacji, w istotny sposób mogących wpływać na jakość i wiarygodność uzyskanych wyników, wraz ze szczegółowym opisem procedur kontrolnych został przedstawiony w pracy wchodzącej w skład osiągnięcia **O6**.



Rycina 2. Klasyczny plan eksperymentu niecelowanych analiz metabolomicznych, z wyszczególnieniem etapu wyboru strategii analitycznej eksperymentu, wskazaniem standardowych procedur związanych z przygotowaniem próbki do analiz oraz z podsumowaniem działań chemometrycznych podejmowanych na etapie przetwarzania uzyskanych danych.

1.5. Metabolomika w praktyce klinicznej

Wykorzystanie zaawansowanych rozwiązań technologicznych wraz z rozwojem wyszukanych narzędzi chemometrycznych umożliwiających analizę danych wielkoskalowych całkowicie zmienia współczesne spojrzenie na prowadzenie prac badawczych. Innowacyjne analizy metabolomiczne w coraz większym stopniu prężnie wkraczają do codziennej praktyki klinicznej. Metabolomika jest jednym z najważniejszych komponentów biologii systemowej i stanowi jej ważne uzupełnienie pozwalające na holistyczną ocenę procesów molekularnych w złożonych układach biologicznych, jaki stanowi organizm człowieka. To nowatorskie podejście badawcze oraz zrozumienie, iż to właśnie metabolomika daje nam unikatową szansę na uzyskanie bezpośredniego obrazu wszystkich metabolitów obecnych w badanej próbce biologicznej, stwarza nowe perspektywy poznania i próby zrozumienia mechanizmów charakterystycznych zarówno dla stanu fizjologicznego jak i w przypadku ich zaburzeń prowadzących do rozwoju choroby [22]. Metabolity ulegają szybkim przemianom i są zaangażowane w wiele procesów biologicznych, dlatego ich analiza dostarcza cennych informacji o faktycznym stanie organizmu.

Badania metabolomiczne można podzielić na te, które służą do generowania nowych hipotez badawczych, oraz te, które mają na celu ich zweryfikowanie [23]. Zasadniczo niecelowane analizy

metabolomiczne ukierunkowane są na globalną analizę, która w perspektywie klinicznej jest unikatowym narzędziem służącym nie tylko do poznania mechanizmów choroby, ale przede wszystkim mającym na celu wykrycie metabolitów, które mogłyby służyć w przyszłości jako nowe czynniki prognostyczne bądź diagnostyczne [22]. Badania takie wykonuje się na stosunkowo niewielkiej grupie pacjentów (n <100), dobrze scharakteryzowanych pod względem parametrów klinicznych jak i fizjologicznych (płeć, wiek, BMI, etc.). W wyniku przeprowadzonych analiz oraz zastosowanych metod bioinformatycznych z tysiąca rejestrowanych sygnałów możliwe jest wyselekcjonowanie metabolitów o największym potencjale dyskryminacyjnym w stosunku do badanych grup (np. chorzy *vs.* zdrowi). Uzyskane wyniki w dużej mierze mają charakter poznawczy i służą do wysnucia nowych hipotez badawczych. Wyselekcjonowane metabolity (najczęściej 1-20) są następnie oznaczane w analizach celowanych na nowej i znacznie liczniejszej grupie badawczej liczącej powyżej 100 do około 1000 uczestników. Pełne zrozumienie założeń oraz ogromnego potencjału metabolomiki, ale również ograniczeń płynących głównie z poprawnego zaplanowania eksperymentu, włączając w to zwłaszcza dobór pacjentów, zebranie materiału biologicznego oraz przeprowadzenie analizy metabolomicznej wraz ze złożonym procesem chemometrycznym, jest nieodzownym czynnikiem wzajemnego zrozumienia i owocnej współpracy pomiędzy badaczami a klinicystami. Należy podkreślić fakt, iż metabolomika jest dziedziną nauk podstawowych szczególnie bliską medycynie, gdyż zgodnie z założeniami medycyny translacyjnej, jej nadrzędnym celem jest transfer uzyskanej wiedzy z laboratorium do codziennej praktyki klinicznej [24]. Związane jest to głównie z dużymi perspektywami identyfikacji nowych biomarkerów umożliwiających wykonanie prostych prewencyjnych badań przesiewowych niezmiernie ważnych we wczesnej diagnostyce i odgrywających, potencjalnie kluczową rolę w zmniejszeniu śmiertelności. Opracowanie innowacyjnych testów diagnostycznych jest szczególnie ważne biorąc pod uwagę, iż w wielu przypadkach choroba jest wykrywana w stadium zaawansowanym, gdy wymagane jest już przeprowadzenie inwazyjnej diagnostyki pacjenta np. wykonanie biopsji. Procedury takie stanowią duże obciążenie dla pacjenta. Dlatego też metabolomika jest doskonałym narzędziem badawczym pozwalającym na wczesne wykrycie zmian np. we krwi bądź w moczu pacjenta dając podstawę do opracowania nowych, nieinwazyjnych rozwiązań diagnostycznych.

Biomarkery cieszą się rosnącym zainteresowaniem również w dziedzinie medycyny spersonalizowanej (ang. *personalised medicine*), ponieważ dostarczają szczegółowych informacji o stanie zdrowia pacjenta będąc wskaźnikiem prawidłowych procesów biologicznych, procesów chorobowych bądź odpowiedzi na interwencję terapeutyczną [25]. Pozwala to na fenotypowanie pacjentów pod kątem wyboru optymalnych opcji terapeutycznych. W tym kontekście coraz większe znaczenia ma również zastosowanie tzw. farmakometabolomiki, jako jednej ze strategii bezpośrednio przyczyniającej się do opracowywania nowych form terapeutycznych [26]. Jest to szczególnie istotne w kontekście poprawy opieki zdrowotnej, gdzie priorytetem jest dostarczenie nowych narzędzi i sposobów umożliwiających określanie skuteczności i monitorowania bezpieczeństwa środka terapeutycznego [27].

1.6. Perinatologia jako szczególny obszar badawczy metabolomiki

Perinatologia, coraz częściej określana również jako medycyna matczyno-płodowa jest niezwykle dynamicznie rozwijającą się dziedziną kliniczną zajmującą się fizjologią i diagnostyką schorzeń kobiety ciężarnej oraz płodu i noworodka. Postęp ten bezpośrednio przekłada się na stosowanie zaawansowanych metod diagnostycznych pozwalających na wczesną diagnostykę prenatalną i precyzyjną ocenę stanu zdrowia rozwijającego się płodu, a w konieczności interwencji terapeutycznej, zastosowania nowatorskich metod leczenia, w tym małoinwazyjnych zabiegów w łonie matki. Procedury takie są niezwykle ważne i pozwalają na zminimalizowanie ryzyka komplikacji i uzyskanie satysfakcjonujących efektów leczenia. Rozwój płodu, a w szczególności okres, w którym zachodzi organogeneza oraz różnicowanie się tkanek jest niezwykle złożonym procesem, który może zostać zachwiany nawet subtelnymi zmianami środowiska wewnątrzmacicznego. Rosnąca liczba doniesień potwierdza ten fakt, kładąc coraz większy nacisk na słuszność tzw. hipotezy Barkera o płodowym pochodzeniu szeregu chorób wieku dziecięcego i dorosłego, w tym chorób metabolicznych takich jak cukrzyca, otyłość, choroby układu sercowo-naczyniowego, nowotwory i wielu innych [28,29]. Zjawisko to nazwano programowaniem płodowym (ang. *fetal programming*), które jest procesem, gdzie niekorzystne warunki środowiska wewnątrzmacicznego powstające w następstwie oddziaływania zarówno czynników genetycznych, jak i czynników środowiskowych (np. niewłaściwa dieta ciężarnej, narażenie na stres, działanie ksenobiotyków w tym leków, powikłania ciąży, zaburzenia hormonalne, zanieczyszczenie środowiska, etc.,) modulują strukturę i funkcję poszczególnych układów i narządów rozwijającego się płodu. Liczne obserwacje pozwoliły stwierdzić, iż zaburzenia w życiu płodowym wiążą się z modyfikacją ekspresji genów, będącą następstwem zmian epigenetycznych wywołanych ekspozycją na wymienione wcześniej czynniki. Długoterminowo mogą mieć one szkodliwy wpływ i skutkować rozwojem chorób w życiu dorosłym [28,29]. W tym aspekcie ogromną wagę mają prace badawcze których celem jest dogłębne poznanie profilu metabolitów w przebiegu ciąży, zarówno fizjologicznej jak i w ciąży wysokiego ryzyka związanej z występowaniem zagrożeń zarówno dla rozwijającego się dziecka jak i będącym dużym obciążeniem dla zdrowia matki. Niecelowane analizy metabolomiczne z powodzeniem są wdrażane w projekty kliniczne z dziedziny perinatologii [30–32] stając się doskonałym narzędziem umożliwiającym poznanie procesów patofizjologicznych prowadzących do powikłań ciąży, chorób rozwijającego się dziecka oraz poznania mechanizmów wewnątrzmacicznego programowania fenotypu płodu i predyspozycji do wystąpienia chorób przewlekłych w życiu dorosłym.

Prace stanowiące osiągnięcie naukowe (**O1, O2, O3, O4**) dotyczą dwóch częstych zaburzeń towarzyszących ciąży, a mianowicie **cukrzycy ciążowej**, GDM (ang. *gestational diabetes mellitus*) oraz ***chorioamnionitis*** czyli **stanu zapalnego błon płodowych i łożyska**. W obu przypadkach powikłania te stanowią duże zagrożenie i prowadzą do szeregu zaburzeń zarówno matczynych jak i płodowych z daleko idącymi konsekwencjami zdrowotnymi.

Ciągły wzrost liczby osób chorych na **cukrzycę** spowodował, iż jest ona obecnie uważana za chorobę epidemiczną, jedną z największych w historii, odpowiedzialną rocznie za co najmniej 5 milionów zgonów. Według danych Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej 8,3% dorosłych - 382 miliony osób choruje na cukrzycę, a 175 milionów przypadków jest obecnie niezdiagnozowanych. Szacuje się, iż w niespełna 25 lat liczba ta przekroczy nawet 592 miliony [33]. Statystyki te ulegają nawet zwiększeniu biorąc pod uwagę 21 milionów przypadków wysokiego stężenia glukozy we krwi występującego w ciąży [34]. W obliczu globalnego wzrostu otyłości, szacuje się, iż 17% kobiet w skali światowej, a 2-6% w Europie jest dotkniętych cukrzycą ciążową [34,35]. Cukrzyca ciążowa nadal stanowi poważny problem kliniczny. Pomimo postępów w diagnostyce i kontroli glikemii, GDM nadal wiąże się z poważnymi i potencjalnie zagrażającymi życiu powikłaniami ciążowymi, zarówno dla zdrowia dziecka jak i zdrowia matki [36–39]. Tkanki płodu są niezwykle wrażliwe na zmiany metaboliczne. W związku z czym nawet niewielkie wahania stężenia glukozy we krwi mogą być przyczyną zaburzeń organogenezy i powodować nieprawidłowy rozwój dziecka. Stopień powikłań zależy głównie od czasu rozpoznania GDM, co związane jest bezpośrednio z okresem narażenia płodu na wysokie stężenie glukozy. Podwyższone stężenie glukozy na początku ciąży predysponuje do rozwoju wad rozwojowych oraz niesie ryzyko poronień. Nadmierne przenikanie glukozy przez łożysko w drugiej połowie ciąży oraz rozwijająca się hiperinsulinemia płodowa prowadzi do wystąpienia tzw. fetopatii cukrzycowej, szeregu zaburzeń metabolicznych, hipoglikemii, hiperbilirubinemii, zaburzeń elektrolitowych oraz predysponuje do wystąpienia zaburzeń oddychania. Makrosomia płodu dodatkowo zwiększa ryzyko wystąpienia urazów okołoporodowych. Czynniki wpływające na wzrost wewnątrzmaciczny płodu w ciąży powikłanej GDM mają wpływ na jego wewnątrzmaciczne programowanie i mogą mieć daleko idące konsekwencje w okresie pozapłodowym, zwiększając ryzyko wystąpienia m.in. cukrzycy typu 2, otyłości, zespołu metabolicznego bądź chorób sercowo-naczyniowych. Z kolei kobiety z GDM obciążone są wyższym ryzykiem wystąpienia nadciśnienia tętniczego indukowanego ciążą, stanu przedrzucawkowego, zakażeń dróg moczowych a także wystąpieniem innych powikłań. Dotychczasowe badania wykazały również, że czynniki ryzyka rozwoju cukrzycy ciążowej w dużej części pokrywają się z czynnikami ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2. Ma to szczególnie duże znaczenie, ponieważ, przebycie cukrzycy w ciąży silnie predysponuje do wystąpienia cukrzycy typu 2 w przyszłości [36–39].

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż przeprowadzanie badań przesiewowych oraz diagnostycznych z zastosowaniem testu obciążenia glukozą w celu wykrycia zaburzeń gospodarki węglowodanowej u kobiet w okresie ciąży od wielu lat wzbudza wiele kontrowersji. Pomimo wielu badań, diagnostyka GDM jest wciąż niejednorodna, zarówno w zakresie strategii przeprowadzenia (schemat jednostopniowy *vs.* dwustopniowy), jak i ustalenia wartości diagnostycznych glikemii. Niestety brak ogólnoświatowego konsensusu w zakresie rozpoznania GDM powoduje, iż część przypadków nadal nie zostaje prawidłowo rozpoznana, co może prowadzić do poważnych konsekwencji zdrowotnych [36,40].

Kolejnym, szczególnie niebezpiecznym powikłaniem ciąży stanowiącym jedną z głównych przyczyn komplikacji okołoporodowych i niosącym bezpośrednie zagrożenie życia matki i dziecka jest **zapalenie błon płodowych i łożyska (*chorioamnionitis*)**. Dane epidemiologiczne wskazują, iż zakażenie to występuje w przypadku 1-4% wszystkich ciąż, jednakże oszacowanie dokładnej częstotliwości jest niezmiernie trudne do określenia za względu na różne kryteria diagnostyczne. Rozpoznanie *chorioamnionitis* odbywa się na podstawie kryteriów klinicznych, histopatologicznych wraz z uwzględnieniem czynników ryzyka [41]. Szczególne zagrożenie stwarza trudna do rozpoznania bezobjawowa, subkliniczna (histologiczna) postać zapalenia błon płodowych, które jest stwierdzane badaniem histopatologicznym na podstawie obecności infiltracji błon płodowych (kosmówki, owodni) neutrofilami [41]. Zapalenie błon płodowych może stwarzać zagrożenie wstrząsem septycznym u ciężarnej oraz związane jest ze szczególnie niekorzystnym wpływem na stan zdrowia płodu i noworodka. Szczególnie niebezpieczne jest rozwinięcie płodowego zespołu odpowiedzi zapalnej, FIRS (ang. *fetal inflammatory response syndrome*) jako płodowa odpowiedź immunologiczna na infekcję, związana z uwalnianiem czynników prozapalnych takich jak interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8), czynnika martwicy nowotworów TNF-α (ang. *tumor necrosis factor α*), białka C reaktywnego, CRP (ang. *C-reactive protein*) bądź metaloporteinaz [41,42]. Wystąpienie tego zespołu jest powiązane z wysokim ryzykiem porodu przedwczesnego, ryzykiem wystąpienia zgonu okołoporodowego, posocznicy, zaburzeń oddychania oraz poważnych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego [41]. Wśród wczesnych uszkodzeń mózgu dominują krwawienia około i dokomorowe, IVH (ang. *intraventricular hemorrhage*) i leukomalacje okołokomorowe, PVL (ang. *periventricular leukomalacia*). Czynniki zapalne prowadzą do uszkodzenia bariery krew - płyn mózgowo-rdzeniowy płodu, powodując aktywację mikrogleju i astrocytów [43]. Mogą również zmieniać działanie neuroprzekaźników i w ten sposób działać toksycznie na prekursory dojrzewających w substancji białej oligodendrocytów, powodując dalsze uszkodzenia mózgu płodu [44,45]. Rozpoznanie opiera się głównie na obrazie klinicznym noworodka i diagnostyce obrazowej.

Mając na względzie poważne konsekwencje kliniczne, które bezpośrednio rzutują na zdrowie a nawet życie zarówno kobiet będących w ciąży jak i rozwijającego się dziecka, niezwykle istotne jest podejmowanie wszelkich wysiłków zmierzających do wczesnego wykrywania zmian prowadzących do wystąpienia zaburzeń wpływających na przebieg ciąży oraz zdrowie matki i dziecka.

2. CEL PROWADZONYCH BADAŃ

Zasadnicze cele badawcze realizowane w ramach przedłożonego osiągnięcia naukowego to:

I. Poznanie profilu metabolicznego charakterystycznego dla ciąży fizjologicznej oraz ciąży wysokiego ryzyka związanej z wystąpieniem cukrzycy ciążowej oraz zapalenia błon płodowych i łożyska z wykorzystaniem zaawansowanych technik badawczych opartych na niecelowanych analizach metabolomicznych oraz nowatorskich strategiach analityczno –bioinformatycznych.

II. Identyfikacja związków wskazujących na wystąpienie zaburzeń gospodarki węglowodanowej w przebiegu cukrzycy ciążowej oraz nad ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2.

III. Identyfikacja związków pozwalających na wczesne wykrywanie uszkodzeń neurologicznych u płodów i poprawy strategii diagnostycznej histologicznej postaci *chorioamnionitis* oraz wykorzystanie potencjału niecelowanych analiz metabolomicznych w poznaniu mechanizmów powikłań neurologicznych związanych z zapaleniem błon płodowych i łożyska.

IV. Identyfikacja związków, pozwalających na różnicowanie badanych grup oraz korelacja danych metabolomicznych z danymi klinicznymi w celu poprawy metod stratyfikacji.

V. Poszukiwanie nowych biomarkerów pozwalających na wczesne rozpoznanie zaburzeń gospodarki węglowodanowej w przypadku cukrzycy ciążowej oraz nowych strategii diagnostycznych w kierunku subklinicznej postaci zapalenia błon płodowych i łożyska.

VI. Identyfikacja profilu D-aminokwasów w moczu w przebiegu cukrzycy ciążowej z zastosowaniem chiralnej chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

VII. Doskonalenie warsztatu badawczego niezbędnego do prawidłowego przeprowadzenia niecelowanych analiz metabolomicznych.

3. CHARAKTERYSTYKA ORAZ OMÓWIENIE UZYSKANYCH WYNIKÓW

Publikacje wchodzące w skład przedstawionego osiągnięcia naukowego są efektem mojej wieloletniej współpracy z Centrum Metabolomiki i Bioanaliz (CEMBIO) oraz Katedrą Biochemii i Biologii Molekularnej mieszczących się na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu San Pablo CEU w Madrycie. Centrum CEMBIO stanowi ośrodek referencyjny specjalizujący się w zakresie niecelowanych analiz metabolomicznych. Prace z zakresu cukrzycy ciążowej (**O1, O2, O3**) są efektem wspólnego projektu z Kliniką Położnictwa i Perinatologii oraz Kliniką Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Ponadto praca **O4** powstała we współpracy z Kliniką Perinatologii Szpitala Uniwersyteckiego *La Paz* w Madrycie.

O1 **Dudzik D**, Zorawski M, Skotnicki M, Zarzycki W, Kozlowska G, Bibik-Malinowska K, Vallejo M, García A, Barbas C, Ramos MP. Metabolic fingerprint of Gestational Diabetes Mellitus. J Proteomics. 2014 May 30;103:57-71.

O2 Lorenzo MP, **Dudzik D**, Varas E, Gibellini M, Skotnicki M, Zorawski M, Zarzycki W, Pellati F, García A. Optimization and validation of a chiral GC-MS method for the determination of free D-amino acids ratio in human urine: application to a gestational diabetes mellitus study. J Pharm Biomed Anal. 2015 Mar 25;107:480-7.

O3 **Dudzik D**, Zorawski M, Skotnicki M, Zarzycki W, García A, Angulo S, Lorenzo MP, Barbas C, Ramos MP. GC-MS based Gestational Diabetes Mellitus longitudinal study: Identification of 2-and 3-hydroxybutyrate as potential prognostic biomarkers. J Pharm Biomed Anal. 2017 Sep 10;144:90-98.

Tematem przewodnim badań przedstawionych w publikacjach **O1, O2, O3** jest cukrzyca ciążowa oraz zastosowanie niecelowanych analiz metabolomicznych pozwalających na dokładną charakterystykę profilu metabolicznego, w celu lepszego poznania mechanizmów prowadzących do zaburzeń gospodarki węglowodanowej w ciąży oraz identyfikację zawiązków małocząsteczkowych pozwalających na wczesne rozpoznawanie i poprawę diagnostyki cukrzycy ciążowej, jak i mających zastosowanie przy określaniu ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2 po porodzie.

Badany materiał stanowiły próbki osocza oraz próbki moczu pobrane od pacjentek, u których rozpoznano cukrzycę ciążową na podstawie doustnego testu obciążenia glukozą (2-h 75-g OGTT, ang. *oral glucose tolerance test*) przy wartości glikemii ≥140 mg/dL (7,8 mmol/L) [40]. Grupę kontrolną stanowiły kobiety będące w ciąży, posiadające prawidłowe wartości glikemii, nie będące również w grupie ryzyka wystąpienia GDM oraz nie wykazujące innych powikłań ciąży. Wykonano dokładną charakterystykę badanych grup pod względem innych parametrów klinicznych m.in. hemoglobiny glikowanej HbA1c, oceny wskaźnika masy ciała BMI (ang. *body mass index*), oceny profilu lipidowego, pomiaru białka ostrej fazy CRP (ang. *C-reactive protein*), wykonania diagnostyki w kierunku insulinooporności (HOMA-IR, QUICKI) oraz zebrania dokładnego wywiadu. Badaniem zostały objęte pacjentki kliniki Położnictwa i Perinatologii oraz Kliniki Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Materiał do badań pobierano w

22-28 tygodniu ciąży (diagnostyka GDM), w 35-40 tygodniu ciąży, oraz miesiąc i trzy miesiące po porodzie (ponowne wykonanie 2-h 75-g OGTT). W doborze grupy badanej (GDM) jak i kontrolnej zostały uwzględnione czynniki takie jak np. wiek czy też wskaźnik BMI mogące bezpośrednio rzutować na obserwowany profil metaboliczny. Badanie to zostało starannie zaplanowane uwzględniając szczegółowe wytyczne specyficzne dla prawidłowego przeprowadzenia niecelowanych analiz metabolomicznych. Dokładny opis tych rekomendacji, zebranych w dużej mierze z własnego wieloletniego doświadczenia oraz z wnikliwego przeglądu literaturowego został zawarty w dwóch pracach przeglądowych stanowiących osiągnięcie **O5, O6**.

Pierwsza praca z cyklu (**O1**) jest szczególnie istotna z punktu poznawczego, gdyż jest uważana za jedną z pierwszych opublikowanych doniesień, w którym wielkoskalowe niecelowane analizy metabolomiczne zostały wykorzystane do badań nad mechanizmami zaburzeń metabolicznych w cukrzycy ciążowej. W pracy tej zastosowano komplementarne techniki analityczne opierające się na spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową (LC-MS), chromatografią gazową (GC-MS) oraz z elektroforezą kapilarną (CE-MS), jak też kompleksowe rozwiązania bioinformatyczne z zakresu przetwarzania uzyskanych danych oraz doboru optymalnych metod statystycznych.
Grupę badawczą w tej pracy stanowiło 20 pacjentek z rozpoznaną cukrzycą ciążową oraz 20 zdrowych kobiet w ciąży. Materiał do badań stanowiło osocze krwi oraz mocz pobrane w 22-28 tygodniu ciąży, przed wykonaniem doustnego testu obciążenia glukozą.

Analizy **LC-MS** wykonano po ówczesnej ekstrakcji metabolitów z próbek osocza polegającej na strąceniu białek za pomocą rozpuszczalnika organicznego (zastosowano mieszaninę metanol-etanol w stosunku 1:1 (*v/v*) o temp. -20°C), odwirowaniu (15,700*g*, 20 min., 4°C), a następnie analizie chromatograficznej przygotowanej próbki za pomocą systemu UHPLC z wykorzystaniem chromatografii w odwróconym układzie faz (kolumna Zorbax Extend C18 2,1x50 mm, o wielkości ziaren 1,8 µm); w warunkach elucji gradientowej przy kompozycji faz ruchomych acetonitryl oraz woda z dodatkiem modyfikatora organicznego (0,1% kwas mrówkowy) oraz z zachowaniem przepływu 0,6 mL/min w temperaturze 60°C, z zastosowaniem jonizacji próbki przez elektrorozpraszanie (ESI) i wykorzystaniu spektrometru masowego z analizatorem typu potrójny kwadrupol i analizatorem czasu przelotu (LC-ESI-QTOF-MS). Uzyskanie dokładnego pomiaru mas było możliwe dzięki systemowi ciągłego wprowadzania i pomiaru mas referencyjnych *m/z* 121,0509 ($C_5H_4N_4$) oraz *m/z* 922,0098 ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$) w jonizacji dodatniej oraz *m/z* 112,98568 ($C_2O_2F3(NH_4)$) i *m/z* 1033,9881 ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$) w jonizacji ujemnej.

Próbki osocza do przeprowadzenia analiz **GC-MS** zostały przygotowane po strąceniu białek za pomocą rozpuszczalnika organicznego (acetonitryl o temp. -20°C, 1:3, *v/v*,), odwirowaniu (15,400*g*, 10 min., 4°C) oraz odparowaniu płynu nadosadowego i przeprowadzeniu procesu chemicznego upochadniania próbek. W tym procesie wykorzystano reakcję sililowania mającą na celu zastąpienie atomu wodoru obecnego w grupach funkcyjnych grupą sililową. W celu zwiększenia efektywności procesu zastosowano mieszaninę reagentów sililujących BSTFA z TMCS (N,O-

bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid z trimetylochlorosilanem), w której jeden reagent działa jak katalizator wspomagając proces przekazania grupy sililowej od drugiego. W wyniku opisanej konwersji chemicznej związki nabywają nowych cech chemicznych i fizycznych co umożliwia wykonanie analiz z zastosowaniem chromatografii gazowej. Rozdzielenie chromatograficzne wykonano przy użyciu kolumny kapilarnej DB-5-MS, 30 m x 0,25 mm, wypełnionej fazą 5% difenylo- i 95% dimetylopolisiloksanu o grubości filmu 0,25 µm, z zastosowaniem helu jako gazu nośnego, o przepływie 1,0 mL/min, oraz temperaturą kolumny zaprogramowaną od 60°C z szybkością wzrostu 10°C /min. do 325°C (26,5 min)

Widma masowe mierzono za pomocą spektrometru masowego w układzie jonizacji elektronowej o energii 70eV, EI (ang. *electron impact*).

Przygotowanie próbek moczu do analizy **CE-MS** ograniczało się jedynie do ich rozcieńczenia 0,125 M roztworem kwasu mrówkowego (1:4, *v/v*). Analiza została wykonana z zastosowaniem kapilary ze stopionej krzemionki o średnicy wewnętrznej 50 µm i długości 96 cm. Cieczą osłonową (ang. *sheath liquid*) była mieszanina metanol-woda (1:1, *v/v*) z dodatkiem 1,0 mmol/L kwasu mrówkowego oraz mas referencyjnych *m/z* 121,0509-puryna ($C_5H_4N_4$) i *m/z* 922,0098—HP-921 ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$) o przepływie 0,6 mL/min i z podziałem strumienia w stosunku 1:100. W analizach zastosowano połączenie CE ze spektrometrią mas oraz analizatorem czasu przelotu (CE-TOF-MS).

Niecelowane analizy metabolomiczne generują złożone i wielowymiarowe zbiory danych, zawierające tysiące rejestrowanych sygnałów. Wdrożenie zaawansowanych algorytmów bioinformatycznych i chemometrycznych z zachowaniem złożonych procedur kontrolnych (opisanych w pracy stanowiącej osiągnięcie **O6**) pozwala na otrzymanie danych wysokiej jakości i uzyskanie wiarygodnych wyników przeprowadzonego eksperymentu. Przetwarzanie uzyskanych danych metabolomicznych obejmowało procesy związane z redukcją rejestrowanych szumów, detekcją pików oraz dekonwolucją, wyrównania widm, filtrowania, transformacji oraz skalowania. Tak przygotowana matryca danych została poddana szczegółowej analizie z wykorzystaniem narzędzi chemometrycznych pozwalających na eksplorację uzyskanych informacji. Uzyskane dane eksperymentalne zostały poddane jednowymiarowej analizie statystycznej z wykorzystaniem testu *t* Studenta z zastosowaniem korekty poziomu istotności testów ze względu na wielokrotność porównań (korekta Benjamini-Hochberg), która jest przeprowadzana w celu kontroli frakcji fałszywych odkryć tzw. FDR (ang. *false discovery rate*). Ponadto wykonano analizę skupień (ang. *cluster analysis*), analizę korelacji pomiędzy zmiennymi z zastosowaniem współczynnika korelacji (r_s) Pearsona, a w celu sprawdzenia efektywności modelu predykcyjnego zastosowano analizę krzywej ROC (ang. *receiver operating characteristic*). Do oceny uzyskanych danych zastosowano również wielowymiarowe techniki statystyczne takie jak analiza składowych głównych, PCA (ang. *principal component analysis*), analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną, PLS-DA (ang. *partial last squares discriminant analysis*) oraz ortogonalna analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną, OPLS-DA (ang. *orthogonal partial last squares discriminant analysis*).

Analiza PCA, której celem jest znalezienie nowych zmiennych, tzw. czynników głównych, PC (ang. *principal components*), umożliwiła kompresję danych wielowymiarowych, dostarczając wiedzy o ich strukturze oraz wzajemnym podobieństwie obiektów. Każdy kolejny czynnik główny opisuje jak największą wariancję danych, nieopisywaną przez poprzednie czynniki i jest do nich ortogonalny. W przypadku analiz LC-MS wykonanych zarówno w jonizacji dodatniej jaki i w ujemnej analiza PCA ukazała wyraźną separację na płaszczyźnie PC 1 i PC 2 pomiędzy grupą kontrolną a grupą z cukrzycą ciążową, co świadczy o dużej wariancji danych i wysokim poziomie ich istotności. Metoda PCA pozwoliła również na sprawdzenie matrycy danych pod kątem występowania danych odstających tzw. outlierów, które mogą zaburzać lub utrudniać interpretację wyników. Analizy dyskryminacyjne oparte na modelach PLS-DA oraz OPLS-DA pozwoliły na dalszą eksplorację danych wskazując na istnienie różnic pomiędzy badanymi grupami. Każdy z modeli wielowymiarowych charakteryzował się wysokimi wartościami parametrów zdolności predykcyjnej modelu Q2 oraz współczynnika separacji R2.

W wyniku przeprowadzonych analiz nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic związanych z wiekiem oraz wartościami ciśnienia krwi. BMI przed ciążą było porównywalne, ale jego istotny statystycznie wzrost zaobserwowano w grupie GDM w II trymestrze ciąży. Stężenie glukozy, HbA1c, triacylgliceroli, cholesterolu było istotnie statystycznie wyższe w grupie GDM. Nie zaobserwowano zmian w stężeniach frakcji HDL oraz LDL cholesterolu, insuliny, C-peptydu, białka CRP oraz we wskaźnikach insulinooporności HOMA-IR i QUICKI.

Analizy metabolomiczne pozwoliły na stworzenie unikalnego profilu metabolicznego charakterystycznego dla cukrzycy ciążowej. Przeprowadzone analizy wykazały masywne zmiany w metabolizmie będące konsekwencją zaburzenia gospodarki węglowodanowej i pozwoliły na zidentyfikowanie w osoczu 142 istotnych statystycznie metabolitów, włączając w to 83 glicerofosfolipidy (w tym 51 lizo- oraz 32 fosfoglicerydów), 9 sfingofosfolipidów (6 sfingomielin, 2 sfingoetanoloamin, sfingozyno-fosforanu), 25 kwasy tłuszczowe i ich pochodne, karnitynę, 5 acylokarnityn, 7 aminokwasów i ich pochodnych, 4 kwasy żółciowe i ich pochodne, glicerol, kreatyninę, kwas 2- oraz 3-hydroksymasłowy oraz 4 związki należące do innych klas chemicznych. W analizie moczu stwierdzono istotność statystyczną sześciu związków należących do grupy aminokwasów i ich pochodnych oraz karnityny. Szczególnie znamienny spadek stężenia (określane jako stężenie względne, ang. *relative concentration*) w GDM odnotowano w przypadku lizofosfatydylocholin, LPC (ang. *lysophosphatidylcholine*) zawierającymi reszty acylowe 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:3, 20:4, 20:5, oraz lizofosfatydyloetanoloamin, LPE (ang. *lysophosphatidylethanolamines*) z łańcuchami 16:0, 18:0, 18:2, 20:0, 20:1, 20:2, 22:4 oraz 22:6 oraz innych glicerofosfolipidów, których reszty acylowe zawierają wielonienasycone kwasy tłuszczowe, PUFA (ang. *polyunsaturated fatty acids*). Analiza korelacji dowiodła istotną statystycznie zależność pomiędzy 135 zidentyfikowanymi związkami a stężeniem glukozy osiągniętym po 2-h teście OGTT, oraz w dużym stopniu z HbA1c, natomiast wystąpienia takiej korelacji nie zaobserwowano w przypadku wskaźnika HOMA-IR oraz QUICKI. Najsilniejsze korelacje

(p<0,000001) z 2-h stężeniami glukozy wykazywały związki takie jak LPC(18:1), LPC(18:2), LPC(20:4), LPC(20:5), LPE(20:1), LPE(20:2). Po przeanalizowaniu krzywych ROC pod względem siły predykcji cukrzycy ciążowej znamienne właściwości potencjalnych biomarkerów spośród wielu glicerofosfolipidów w szczególności wykazywały LPE(20:1) oraz LPE(20:2) – AUC 0,995 (p<0,0001, czułość 100%, specyficzność 95%), LPE(20:2) – AUC LPC(18:1) - AUC 0,988 (p<0,0001, czułość 100%, specyficzność 95%) oraz LPC(18:2) – AUC 0,99 (p<0,0001, czułość 100%, specyficzność 95%). Okazało się, iż nasze obserwacje są zgodne z danymi literaturowymi, które donoszą o zmniejszonym poziomie LPC, fosfatydylocholiny (PC) oraz glicerofosfocholiny w cukrzycy typu 2 [46,47]. Szczególną uwagę poświęca się LPC(18:2), któremu przypisywane są właściwości predykcyjne zaburzeń glikemii oraz cukrzycy typu 2 [48,49]. Postuluje się, że mechanizm ten związany jest ze stymulowaniem przez LPC wydzielenia insuliny i dysfunkcją komórek β wysp trzustkowych [48,50,51]. Interesującym jest również fakt, iż pacjenci z nieprawidłową tolerancją glukozy, IGT (ang. *impaired glucose tolerance*) oraz z cukrzycą typu 2 wykazują zmniejszoną aktywność enzymatyczną cytozolowej fosfolipazy A2, $cPLA_2$ (ang. *calcium-dependent phospholipase-A2 isoform*), co może przyczyniać się do zmniejszenia stężenia kwasu arachidonowego oraz innych długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, LC-PUFA (ang. *long chain polyunsaturated fatty acids*) [46,49]. W wielu badaniach wykazano, iż glicerofosfolipidy zawierające nasycone kwasy tłuszczowe o krótkich łańcuchach tłuszczowych mogą przyczyniać się do rozwoju cukrzycy typu 2, natomiast te zwierające LC-PUFA wykazują działanie protekcyjnie [47,52]. Co ciekawe, w naszych badaniach stosunek nasyconych do nienasyconych reszt acylowych w LPC, LPE oraz LPI był zwiększony w GDM, co świadczy o udziale tych związków w regulowaniu metabolizmu węglowodanów oraz lipidów. Z równoczesnym spadkiem stężenia lizoglicerofosfolipidów, wykonane badania wykazały zmniejszenie stężenia plazmalogenów, fosfolipidów eterowych w grupie z cukrzycą ciążową. Badania innych autorów wskazały na istnienie negatywnej korelacji plazmalogenów z otyłością oraz insulinoopornością [47,53]. Zasugerowano również, że związki te mogą chronić lipoproteiny przed utlenianiem [53]. W nawiązaniu do tego faktu obserwowany w naszym badaniu spadek stężenia plazmalogenów może sugerować zapoczątkowany już proces utleniania lipoprotein w drugim trymestrze ciąży, prawdopodobnie związany z rozwojem cukrzycy ciążowej.

Wykonane badania zwróciły również uwagę na powiązanie koniugowanych z tauryną kwasów żółciowych z patogenezą GDM. Znaczenie kwasów żółciowych w GDM jest coraz szerzej dyskutowane na podstawie innych doniesień [46,54,55]. Ponadto, przeprowadzone analizy metabolomiczne wskazały na wzrost stężenia acetyl-karnityny oraz spadek stężenia karnityny i acyl-karnityn długołańcuchowych. Fakt ten potwierdza zauważalny spadek ekspresji acetyl-CoA transferazy karnitynowej, enzymu warunkującego syntezę acetyl-karnityny u pacjentów z nieprawidłową tolerancją glukozy oraz w przypadku cukrzycy typu 2 [49,56]. Zmniejszone stężenie karnityny uważa się jako jeden z oznak zaburzonej tolerancji glukozy oraz insulinooporności [57].

Kolejną znamienną obserwacją było istotne statystycznie zmniejszenie w GDM stężenia glicyny oraz kwasu pirogronowego. Spadek stężenia glicyny demonstrują pacjenci z IGT, cukrzycą typu 2 i jest on powiązany z mechanizmami otyłości i insulinooporności [58]. W przypadku GDM, sytuacja ta może oznaczać nasiloną glukoneogenezę, zwiększenie syntezy glutationu bądź oba te procesy łącznie [59]. Fakt nasilonej glukoneogenezy potwierdzają też niskie stężenia pirogronianu, zużywanego w tym procesie. Dominujący proces glukoneogenezy prowadzi do zwiększenia uwalniania kwasów tłuszczowych, które w tych warunkach stanowią alternatywne źródło energii. Procesy te przyczyniają się do zwiększenia poziomu kwasu 3-hydroksymasłowego, na co również wskazały moje analizy. Niezwykle interesujące było również stwierdzenie w grupie GDM istotnie statystycznego wzrostu stężenia kwasu 2-hydroksymasłowego, który posiada obiecujące właściwości predykcyjne w kierunku wczesnego rozpoznawania zaburzeń metabolizmu związanego z rozwojem cukrzycy [48,60]. Niewątpliwie ciekawym doświadczeniem podczas interpretacji uzyskanych danych, było wykonanie analizy skupień, dzięki której uzyskano klaster składający się z grupy kontrolnej oraz grupy z cukrzycą ciążową. Zastosowanie rozwiązanie, walidowane również metodami statystki wielowymiarowej, zwróciło uwagę na dwa przypadki błędnej klasyfikacji, gdzie jedna próbka należąca do grupy kontrolnej wykazywała cechy GDM, a próbka należąca do grupy GDM wykazywała cechy kontroli. Po weryfikacji danych klinicznych, okazało się, iż w pierwszym przypadku była to pacjentka z niezdiagnozowaną cukrzycą ciążową (HbA1c w III trymestrze ciąży na poziomie 9%), w drugim przypadku glikemia pacjentki była doskonale wyrównana, z wartościami glukozy na czczo 100 mg/dL (5,55mM).

Kontynuacją prowadzonych badań były eksperymenty opisane w publikacjach stanowiących osiągnięcie **O2** oraz **O3**. Istotnym zagadnieniem skupiającym coraz większą uwagę środowiska naukowego jest analiza D-aminokwasów (D-AA), których źródłem może być pożywienie, racemizacja istniejących już L-enancjomerów, oraz w znacznym stopniu wytwarzanie ich przez florę bakteryjną przewodu pokarmowego [61]. Uważa się, iż głównym czynnikiem regulującym poziom D-AA jest zachodząca w nerkach ich konwersja w wyniku działania oksydaz [62]. Okazuje się, iż D-AA spełniają funkcje regulacyjne i tak np. został wykazany związek D-Ala z chorobą Alzheimera [63] czy też D-Ser ze schizofrenią [64]. Te obserwacje wywołały rosnące zainteresowanie chiralnymi AA i określenie nowego obszaru badawczego w analizach biomedycznych ukierunkowanych na poszukiwanie nowych biomarkerów prognostycznych bądź diagnostycznych. Niemniej, wyzwaniem w oznaczaniu D-AA jest ich niezwykle niskie stężenie, w związku z czym procedury analityczne wymagają opracowania i walidowania zarówno metod przygotowania próbek jak i samej metody pomiarowej. Zasadniczym celem projektu była więc optymalizacja metody analizy D-AA w próbce moczu z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Opracowana metoda pozwalająca na oznaczenie 14 par D-L-aminokwasów została zastosowana do przebadania próbek moczu pochodzących od pacjentek z cukrzycą ciążową oraz zdrowych kobiet w ciąży stanowiących grupę kontrolną. Materiał do badań pochodził z wcześniej opisanej kohorty. Próbka moczu była przygotowana za pomocą ekstrakcji do fazy stałej, SPE (ang. *solid phase extraction*) przy zastosowaniu kolumienek

ekstrakcyjnych z wypełnieniem kationowym Discovery DSC-SCX SPE (500 mg/3 mL) i wykonaniu upochadniania D-AA do ich 2-propylowych estrów N(O)-pentafluoropropionylo-aminokwasowych. Do rozdzielania enancjomerów użyto kolumny kapilarnej ze stopionej krzemionki pokrytej powłoką Chirasil-L-Val (polisiloksan N-propionylo-L-walino-tert-butyloamidowy) o grubości filmu 0,12µm (25m x 0,25mm) i zaprogramowaną temperaturą elucji. Detekcja wykonana była z wykorzystaniem analizatora mas o typie pułapki jonowej (ang. *ion trap*), a identyfikacja D-AA opierała się na analizie czasu retencji oraz uzyskanych widm masowych.

Aplikacja opracowanej metody do projektu cukrzycy ciążowej miała szczególnie duże znaczenie poznawcze, gdyż stanowiła ona pierwsze doniesienie o poziomie D-AA w moczu w tej populacji kobiet. Przeprowadzone oznaczenia wskazały na istotny statystycznie wzrost stężenia D-fenyloalaniny w grupie GDM. Zaznaczona była również wyraźna tendencja wzrostowa w przypadku D-alaniny, D-seryny, D-ornityny oraz D-lizyny. Istotnym faktem jest, iż w pierwszym eksperymencie z wykorzystaniem strategii niecelowanej (stanowiącym osiągnięcie **O1**), również wykazano istotny statystycznie wzrost fenyloalaniny w moczu kobiet z GDM. Uzyskane wyniki są zbieżne z innymi pracami badawczymi, które demonstrują zwiększony poziom fenyloalaniny w zaburzeniach gospodarki węglowodanowej oraz jej związek z ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2 [47]. Obserwacje związane z poziomem D-aminokwasów uzupełniają istniejący stan wiedzy oraz dostarczają nowych informacji, które mogą przyczynić się do zrozumienia mechanizmów prowadzących do zaburzeń metabolizmu.

Kolejny eksperyment, opisany w publikacji stanowiącej osiągniecie **O3** również był prowadzony w ramach projektu związanego z badaniami nad cukrzycą ciążową. Niewątpliwym atutem tych badań była możliwość wyselekcjonowania grupy badawczej oraz sparowanych próbek osocza, zebranych w 4 punktach czasowych (pobranie materiału w II oraz III trymestrze ciąży oraz miesiąc i 3 miesiące po porodzie). Analiza tego materiału została przeprowadzona z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas i z wykorzystaniem niecelowanego podejścia oraz metodologii zawartej w opisie osiągnięcia **O1**. Ponadto, badanie obserwacyjne kobiet z GDM w ciąży dostarczyło cennych informacji, które umożliwiły wykonanie dodatkowych analiz statystycznych w kierunku wyselekcjonowania związków o największym potencjale prognostycznym. Wyniki badania zademonstrowały odmienny profil metaboliczny pomiędzy grupą kontrolną oraz GDM nie tylko w ciąży (II oraz III trymestr), ale co więcej po porodzie (miesiąc oraz 3 miesiące). Zmiany te były szczególnie silnie zaznaczone w przypadku kobiet, u których rozwinęła się cukrzyca typu 2 (dwuletnia obserwacja retrospektywna). Szczególnie istotną kwestią poruszoną w interpretacji uzyskanych wyników jest rola kwasu 2- oraz 3- hydroksymasłowego, jak i kwasu stearynowego, jako związków wykazujących obiecujące właściwości predykcyjne w kierunku wczesnego rozpoznawania zaburzeń metabolicznych, nie tylko tych związanych z cukrzycą ciążową, ale co szczególnie istotne powiązane z ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2 [48,65,66]. Wykazano, iż zarówno kwas 2- jak i 3- hydroksymasłowy wykazują wysoką korelację ze stężeniem glukozy (test OGTT) oraz HbA1c, przy czym zależność ta jest szczególnie silnie zaznaczona dla kwasu 2-hydroksymasłowego. Potencjał dyskryminacyjny tych

związków widoczny był również w przypadku porównania profilu metabolicznego kobiet, u których wystąpiła cukrzyca ciążowa, ciążowa bez zmian wskazujących na zaburzoną gospodarkę węglowodanową po ciąży (stan normoglikemii) oraz tych, u których wystąpiła cukrzyca typu 2.

Uzyskane wyniki potwierdzają słuszność spostrzeżeń wynikających z przeprowadzenia pierwszych analiz GC-MS w II trymestrze ciąży (opisanych w osiągnięciu **O1**), jednakże obserwacja retrospektywna badanej grupy nadaje im nowy wymiar. Uzyskane wyniki stanowią niezwykle ciekawą hipotezę i podstawę do przeprowadzenia dalszych badań pozwalających na ich walidację w szerzej zakrojonych badaniach kohortowych.

O4 **Dudzik D***, Revello R, Barbas C, Bartha JL. LC-MS-based metabolomics identification of novel biomarkers of chorioamnionitis and its associated perinatal neurological damage. J Proteome Res. 2015 Mar 6;14(3):1432-44.

Celem kolejnej pracy było wykorzystanie potencjału niecelowanych analiz metabolomicznych w poznaniu mechanizmów komórkowych leżących u podstaw zapalenia błon płodowych i łożyska (*chorioamnionitis*), a w szczególności podjęcie próby identyfikacji związków które mogłyby przyczynić się do wczesnego wykrywania uszkodzeń neurologicznych u płodów jak i poprawy strategii diagnostycznej histologicznej postaci *chorioamnionitis*. W pracy tej, analizie poddany był płyn owodniowy, który stanowi szczególny materiał badawczy, gdyż każda zmiana dotycząca jego składu bądź objętości odzwierciedla stan fizjologiczny rozwijającego się płodu [67]. Niecelowane analizy metabolomiczne zostały wykonane z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-QTOF-MS), z zachowaniem metodologii, w zakresie użytej metody analitycznej jak i metod chemometrycznych podanej w opisie pracy stanowiącej osiągnięcie **O1**. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testów parametrycznych bądź nieparametrycznych (test *t* Studenta i ANOVA, bądź test U Manna Whitney'a i Krsukala Wallis'a w przypadku braku rozkładu normalnego zmiennych z zachowaniem korekty FDR. Dodatkowo wykonano analizę korelacji oraz analizę krzywych ROC dla wybranych zmiennych. Przeprowadzono także wielowymiarową analizę statystyczną opartą na modelu PLS-DA, która wykazała wyraźne różnice pomiędzy badanymi grupami (grupa kontrolna *vs. chorioamnionitis*, *chorioamnionitis vs. chorioamnionitis* z powikłaniami neurologicznymi). Uzyskane wyniki wskazały, iż w wyniku zapalenia błon płodowych dochodzi do zaburzenia szlaków metabolicznych związanych między innymi z regulacją procesów glikolizy oraz glukoneogenezy, metabolizmu sfingolipidów, glicerofosfolipidów, kwasów żółciowych, aminokwasów czy też i innych szlaków komórkowych. W szczególności, największą odpowiedź na zapalenie wykazywała grupa związków należących do lizofosfatydylocholin oraz lizofosfatydyloetanoloamin zawierających nasycone 16:0. 18:0 oraz nienasycone 18:1, 18:2, 20:4 kwasy tłuszczowe. Interesującym faktem było stwierdzenie, że kwasy tłuszczowe z łańcuchem 16:0 oraz 18:1 stanowiły również komponent istotnych statystycznie lizofosatydyloseryn, fosfatydylocholiny, sfingomielin oraz laktozoceramidu. Dokładna charakterystyka badanych próbek pozwoliła na wykonanie testu korelacji

pomiędzy wynikami analizy metabolomicznej, a danymi klinicznymi, w szczególności stężeniem glukozy, poziomem IL-6 i leukocytów, które to stanowią obecnie standard diagnostyczny. Zbadanie tych zależności pozwoliło na wysnucie ciekawych obserwacji i nowych hipotez. Wszystkie związki należące do klasy lipidów wykazały negatywną korelację ze stężeniem glukozy. Najsilniejszą korelację z glukozą w grupie z *chorioamnionitis* wykazały LPE(P-16:0) ($r_s = -0.8787$), LacCer(d18:1/16:0) ($r_s = -0.8285$), LacCer(d18:1/24:1) ($r_s = -0.8034$), oraz siarczan kwasu glikochenodeoksycholowego ($r_s = -0.8452$). Z kolei LPE(P-16:0), LPE(20:4) i laktozoceramidy wykazywały również wysoką korelację z IL-6 i poziomem leukocytów. Pomimo istotnie statystycznego zwiększenia stężenia LPC(16:0) i LPC(18:1) obserwowanego w grupie z *chorioamnionitis*, związki te nie wykazują istotnej zależności z żadnym z poddanym ewaluacji parametrem diagnostycznym. W przypadku szukania tych zależności w grupie, u której wystąpiły zaburzenia neurologiczne, wysoce negatywną korelację z glukozą zaobserwowano w przypadku LPE(O-18:)/LPE(P-18:0) ($r_s = -0.9856$), LacCer(d18:1/16:0) ($r_s = -0.9276$), PC(34:1) ($r_s = -0.8971$), LacCer(d18:1/24:1) ($r_s = -0.8707$), LPE(20:4) ($r_s = -0.8117$), oraz LPE(18:1) ($r_s = -0.8117$). Z kolei najwyższy stopień zależności z IL-6 wykazał LPC(18:2) ($r_s = -0.7537$). Analiza krzywej ROC pozwoliła na wytypowanie LPE(18:1), LPE(16:0), oraz grupy laktozoceramidów LacCer(d18:1/16:0) i LacCer(d18:1/24:1), jako związków o największej sile dyskryminacyjnej w kierunku diagnostyki zapalenia błon płodowych. W przypadku istniejących powikłań neurologicznych związkiem takim okazał się LPC(18:2). Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład nie tylko w poznanie zaburzeń metabolicznych do jakich prowadzi zapalenie błon płodowych, ale pozwalają na jednoczesne wyznaczenie nowych kierunków badań nad markerami postaci subklinicznej zapalenia błon płodowych w ciąży i markerami wczesnej predykcji powikłań neurologicznych.

O5 Hernandes VV, Barbas C, **Dudzik D***. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. Electrophoresis. 2017 Sep;38(18):2232-2241.

O6 **Dudzik D**, Barbas-Bernardos C, García A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. A review. J Pharm Biomed Anal. 2018 Jan 5;147:149-173.

Prace zaprezentowane jako osiągnięcie **O5** oraz **O6** stanowią swoistą kondensację blisko dziesięcioletniego doświadczenia własnego, zdobytego na podstawie wykonania wielu projektów badawczych opartych na niecelowanych analizach metabolomicznych. Obserwacja światowych trendów oraz bezpośrednie zaangażowanie w zrozumienie natury i specyfiki wielkoskalowych metod analizy próbek biologicznych oraz zastosowania klasycznych i nieklasycznych zaawansowanych metod przetwarzania danych pozwoliło na kompleksowe omówienie newralgicznych aspektów związanych z poprawnym wykonaniem badań metabolomicznych. Aby to było możliwe niezbędne było gruntowne poznanie poszczególnych etapów pracy oraz wyzwań związanych z poprawnym przeprowadzeniem procedur, począwszy od zaplanowania eksperymentu aż do uzyskania wyników końcowych. Przedstawione opracowania dostarczają szczegółowych informacji o fazie przed-analitycznej,

analitycznej oraz post-analitycznej, które stanowią ważny element w utrzymaniu wysokiej jakości prowadzonych badań. Okazuje się, iż faza przed-analityczna jest utożsamiana z największą ilością błędów, które wprowadzają zakłócenia w przebieg całego procesu analitycznego oraz bezpośrednio kształtują jakość uzyskanych informacji i wiarygodność wyników. Etap ten związany jest między innymi z poprawnym zaplanowaniem eksperymentu, wyznaczeniem jego celu oraz obrania adekwatnych strategii badawczych. Wiąże się to z doborem badanej populacji (uwzględnienie czynników takich jak np. wiek, płeć, dieta) oraz ustaleniem liczebności i rodzaju materiału biologicznego (np. osocze, mocz), jak też sposobu jego pobrania (np. rodzaj zastosowanego antykoagulanta), procesowania (np. parametry wirowania) i zabezpieczenia (np. temperatura przechowywania). Faza przed-analityczna obejmuje wszystkie procedury, które mają miejsce przed analizą, włączając w to również przygotowanie próbki i procesy ekstrakcji metabolitów. Szczegółowe zalecenia dotyczące standardów procesowania próbek uzyskanych z krwi - osocza, surowicy oraz tzw. suchej kropli krwi, DBS (ang. *dried blood spot*), wraz z omówieniem wszystkich krytycznych czynników zostały wyczerpująco opisane w publikacji **O5**. Z kolei ostatnia zaprezentowana praca **O6** stanowi kontynuację podjętej tematyki i syntetyczny opis wszystkich czynników zakłócających poszczególne fazy eksperymentu, a co więcej podaje szczegółowe zalecenia w zakresie ich kontroli i zapewnienia wysokiej jakości całego procesu badawczego, QC/QA (ang. *quality control/quality assurance*). Z punktu widzenia badacza, posiadającego wiedzę zarówno o ogromnym potencjale metod niecelowanych, ale również o ich ograniczeniach i wrażliwych aspektach pracy wymagających zrozumienia i uważnej kontroli, szczególnie istotnym i zasadnym jest podejmowane działań służących stworzeniu standardów postępowania i rekomendacji w zakresie procedur QC/QA dla niecelowanych analiz metabolomicznych.

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Najnowsze odkrycia i innowacje technologiczne dostarczają wyspecjalizowanych narzędzi umożliwiających udoskonalenie metod analitycznych. Metabolomika stanowi nowatorskie podejście badawcze zapewniające niespotykane dotąd możliwości poszerzenia wiedzy na temat funkcjonowania organizmu na poziomie molekularnym. Wdrożenie wielkoskalowych analiz niecelowanych do badań biomedycznych i ich interdyscyplinarny charakter stanowi istotny element medycyny translacyjnej, która wykorzystuje wyniki badań podstawowych i szuka możliwości zastosowania zdobytej wiedzy w praktyce klinicznej. W tym ujęciu badania stanowiące cykl przedłożonych prac pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Implementacja niecelowanych analiz metabolomicznych w dziedzinie perinatologii wniosła istotny wkład w poznanie patomechanizmów ciąży wysokiego ryzyka, związanych z rozwojem cukrzycy ciążowej oraz z wystąpieniem zakażenia błon płodowych i łożyska.
2. Wybór metod i strategii badawczych umożliwił stworzenie charakterystycznego profilu metabolicznego, określanego jako tzw. metaboliczny odcisk palca, znamiennego dla badanych powikłań ciążowych (ciąża wysokiego ryzyka związana z wystąpieniem cukrzycy ciążowej oraz zapalenia błon płodowych i łożyska).
3. Prowadzone badania metabolomiczne nad patogenezą zaburzeń gospodarki węglowodanowej w przebiegu cukrzycy ciążowej, nad ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2 oraz nad mechanizmami powikłań neurologicznych związanych z zapaleniem błon płodowych i łożyska w ciąży miały szczególne funkcje poznawcze, gdyż pozwoliły na wyselekcjonowanie metabolitów mogących w przyszłości spełniać funkcję biomarkerów o właściwościach prognostycznych bądź diagnostycznych w tych zaburzeniach.
4. Wykazano, iż kwas 2-hydroksymasłowy oraz 3-hydroksymasłowy mogą odgrywać szczególną rolę we wczesnej predykcji cukrzycy ciążowej jak i w rozwoju cukrzycy typu 2 w późniejszym okresie.
5. Wskazano związki, które mogą okazać się pomocne we wczesnym rozpoznaniu subklinicznej postaci zapalenia błon płodowych i łożyska u kobiet w ciąży jak i wskazujące na rozwijające się zaburzenia neurologiczne u płodu.
6. Analiza D-aminokwasów pozwoliła na uzyskanie komplementarnych informacji dotyczących patomechanizmów związanych z cukrzycą ciążową.
7. Uzyskane wyniki pozwoliły na precyzyjną eksplorację tematu badawczego, wyznaczając nowe hipotezy i kierunki przyszłych badań.
8. Wnikliwe omówienie specyfiki przeprowadzania niecelowanych analiz metabolomicznych, oparte w głównej mierze na wieloletnim doświadczeniu własnym oraz na obserwacjach współpracowników i na doniesieniach literaturowych, stanowi istotny wkład w opracowanie

zaleceń i rekomendacji pozwalających na kontrolę jakości procesu badawczego wykorzystującego metabolomikę jako narzędzie badawcze.

5. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BMI – wskaźnik masy ciała

BSTFA z TMCS – (N,O-bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid z trimetylochlorosilanem),

CE, elektroforeza kapilarna

CE-MS – elektroforeza kapilarna połączona ze spektrometrią mas

CE-TOF-MS – elektroforeza kapilarna sprzężona z analizatorem czasu przelotu i spektrometrią mas

cPLA2 – cytozolowa fosfolipaza A2

CRP – białko ostrej fazy, białko C reaktywne

D-AA – D-aminokwasy

DBS – sucha kropla krwi

D-Ser – D- seryna

EI – jonizacja elektronami

ESI – jonizacja metodą rozpylania w polu elektrycznym

FDR – frakcja fałszywych odkryć

FIRS – płodowy zespół odpowiedzi zapalnej

GC – chromatografia gazowa

GC-MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

GDM – cukrzyca ciążowa

HbA1c – hemoglobina glikowana

HILIC – chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych

HMDB – baza charakteryzująca ludzki metabolom

HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

IGT – nieprawidłowa tolerancja glukozy

IL – interleukina

IVH – krwawienia około i dokomorowe

LC – chromatografia cieczowa

LC-ESI-QTOF-MS – chromatografia cieczowa sprzężona z jonizacją przez elektrorozpylanie i zastosowanie spektrometru masowego z kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu

LC-MS – chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas

LC-PUFA – długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe

LC-Q-TOF-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem masowym z kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu

LPC – lizofosfatydylocholina

LPE – lizofosfatydyloetanoloamina

MRM – monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji

MS – spektrometria mas

NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

OGTT – doustny test obciążenia glukozą

OPLS-DA – ortogonalna analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną

PC – fosfatydylocholina

PC – czynniki główne

PCA – analiza składowych głównych

PLS-DA – analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną

PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe

PVL – leukomalacje okołokomorowe

QC/QA – kontrola i zapewnienie wysokiej jakości procesu badawczego

Q-TOF – kwadrupol z analizatorem czasu przelotu

QUICKI – wskaźnik insulinooporności

ROC – krzywa efektywności modelu predykcyjnego

RPLC – chromatografia w odwróconym układzie faz

SIM – monitorowanie wybranych jonów

SPE – ekstrakcja do fazy stałej

TNF-α – czynnik martwicy nowotworów α

UHPLC – ultrasprawna chromatografia cieczowa

6. PIŚMIENNICTWO

1. Fiehn, O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **48,** 155–171 (2002).
2. Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B. & Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* **16,** 373–8 (1998).
3. Nicholson, J. K., Lindon, J. C. & Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* **29,** 1181–1189 (1999).
4. Wishart, D. S. *et al.* HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* **35,** D521-6 (2007).
5. Dunn, W. B., Broadhurst, D. I., Atherton, H. J., Goodacre, R. & Griffin, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **40,** 387–426 (2011).
6. Wishart, D. S. *et al.* HMDB 4.0: The Human Metabolome Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **46,** D608–D617 (2018).
7. Wishart, D. S. Proteomics and the Human Metabolome Project. *Expert Rev. Proteomics* **4,** 333–335 (2007).
8. Nicholson, J. K. & Lindon, J. C. Systems biology: Metabonomics. *Nature* **455,** 1054–1056 (2008).
9. Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E. & Clish, C. B. Targeted metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **30,** 1–24 (2012).
10. Ellis, D. I., Dunn, W. B., Griffin, J. L., Allwood, J. W. & Goodacre, R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* **8,** 1243–1266 (2007).
11. Barderas, M. G. *et al.* Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011,** 790132 (2011).
12. Dettmer, K. & Hammock, B. D. Metabolomics--a new exciting field within the "omics" sciences. *Environ. Health Perspect.* **112,** A396-7 (2004).
13. Gowda, G. A. N. & Djukovic, D. Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Methods Mol. Biol.* **1198,** 3–12 (2014).
14. Yanes, O., Tautenhahn, R., Patti, G. J. & Siuzdak, G. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal. Chem.* **83,** 2152–2161 (2011).
15. Alonso, A., Marsal, S. & Julià, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3,** 23 (2015).
16. Lei, Z., Huhman, D. V. & Sumner, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J. Biol. Chem.* **286,** 25435–25442 (2011).
17. Wojtowicz, W. *et al.* Serum NMR metabolomics to differentiate haematologic malignancies. *Oncotarget* **9,** 24414–24427 (2018).
18. Griffiths, W. J. & Wang, Y. Mass Spectrometry in Metabolomics. *Mol. Anal. Genome Discov. Second Ed.* 271–298 (2011). doi:10.1002/9781119977438.ch12
19. Ortmayr, K., Causon, T. J., Hann, S. & Koellensperger, G. Increasing selectivity and coverage in LC-MS based metabolome analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **82,** 358–366 (2016).
20. Majchrzak, T. *et al.* PTR-MS and GC-MS as complementary techniques for analysis of volatiles:

A tutorial review. *Anal. Chim. Acta* **1035,** 1–13 (2018).

21. Garcia, A. & Barbas, C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)-Based Metabolomics. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **708,** 191–204 (2011).

22. Johnson, C. H., Ivanisevic, J. & Siuzdak, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17,** 451–459 (2016).

23. Kell, D. B. & Oliver, S. G. Here is the evidence, now what is the hypothesis? The complementary roles of inductive and hypothesis-driven science in the post-genomic era. *BioEssays* **26,** 99–105 (2004).

24. Xia, J., Broadhurst, D. I., Wilson, M. & Wishart, D. S. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics : an introductory tutorial. 280–299 (2013). doi:10.1007/s11306-012-0482-9

25. Guijas, C., Montenegro-Burke, J. R., Warth, B., Spilker, M. E. & Siuzdak, G. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nat. Biotechnol.* **36,** 316–320 (2018).

26. Mastrangelo, A., Armitage, E. G., García, A. & Barbas, C. Metabolomics as a tool for drug discovery and personalised medicine. A review. *Curr. Top. Med. Chem.* **14,** 2627–36 (2014).

27. Wishart, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15,** 473–484 (2016).

28. Barker, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* **261,** 412–417 (2007).

29. Padmanabhan, V., Cardoso, R. C. & Puttabyatappa, M. Developmental programming , a pathway to disease. 1–14 (2016). doi:10.1210/en.2016-1003

30. Ciborowski, M. *et al.* Potential first trimester metabolomic biomarkers of abnormal birth weight in healthy pregnancies. *Prenat. Diagn.* **34,** 870–877 (2014).

31. Dessì, A., Marincola, F. C. & Fanos, V. Metabolomics and the great obstetrical syndromes - GDM, PET, and IUGR. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **29,** 156–164 (2015).

32. Romero, R. *et al.* Metabolomics in premature labor : a novel approach to identify patients at risk for preterm delivery. **23,** 1344–1359 (2010).

33. International Diabetes Federation. *Idf Diabetes Atlas*. *Idf Diabetes Atlas* (2015). doi:2-930229-80-2

34. Dennedy, M. C. & Dunne, F. The maternal and fetal impacts of obesity and gestational diabetes on pregnancy outcome. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **24,** 573–89 (2010).

35. Buckley, B. S. *et al.* Gestational diabetes mellitus in Europe: Prevalence, current screening practice and barriers to screening. A review. *Diabet. Med.* **29,** 844–854 (2012).

36. Koning, S. H. *et al.* New diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus and their impact on the number of diagnoses and pregnancy outcomes. *Diabetologia* **61,** 800–809 (2018).

37. Hod, M. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Study: Neonatal Glycemia. *Pediatrics* **127,** peds.2009-2257d-peds.2009–2257d (2011).

38. Catalano, P. M. *et al.* The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: Associations of GDM and obesity with pregnancy outcomes. *Diabetes Care* **35,** 780–786 (2012).

39. HAPO Study Cooperative Research Group *et al.* Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N. Engl. J. Med.* **358,** 1991–2002 (2008).

40. Alberti, K. G. & Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **15,** 539–53 (1998).

41. Tita, A. T. N. & Andrews, W. W. Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. *Clin. Perinatol.* **37,** 339–54 (2010).

42. Cornette, L. Fetal and neonatal inflammatory response and adverse outcome. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **9,** 459–470 (2004).

43. Chau, V., McFadden, D. E., Poskitt, K. J. & Miller, S. P. Chorioamnionitis in the Pathogenesis of Brain Injury in Preterm Infants. *Clin. Perinatol.* **41,** 83–103 (2014).

44. Hagberg, H. *et al.* The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat. Rev. Neurol.* **11,** 192–208 (2015).

45. Anblagan, D. *et al.* Association between preterm brain injury and exposure to chorioamnionitis during fetal life. *Sci. Rep.* **6,** 37932 (2016).

46. Suhre, K. *et al.* Metabolic footprint of diabetes: A multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS One* **5,** (2010).

47. Floegel, A. *et al.* Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* **62,** 639–648 (2013).

48. Ferrannini, E. *et al.* Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance. *Diabetes* **62,** 1730–1737 (2013).

49. Wang-Sattler, R. *et al.* Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Mol. Syst. Biol.* **8,** 615 (2012).

50. Soga, T. *et al.* Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326,** 744–751 (2005).

51. Metz, S. A. Ether-linked lysophospholipids initiate insulin secretion. Lysophospholipids may mediate effects of phospholipase A2 activation on hormone release. *Diabetes* **35,** 808–17 (1986).

52. Kröger, J. *et al.* Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids , desaturase activity , and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **93,** 127–42 (2011).

53. Wallner, S. & Schmitz, G. Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem. Phys. Lipids* **164,** 573–589 (2011).

54. Gao, J. *et al.* Association between serum bile acid profiles and gestational diabetes mellitus: A targeted metabolomics study. *Clin. Chim. Acta* **459,** 63–72 (2016).

55. Maghsoodi, N. *et al.* Bile acid metabolism is altered in those with insulin resistance after gestational diabetes mellitus. *Clin. Biochem.* **64,** 12–17 (2019).

56. Adams, S. H. *et al.* Plasma Acylcarnitine Profiles Suggest Incomplete Long-Chain Fatty Acid β-Oxidation and Altered Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Type 2 Diabetic African-American Women. *J. Nutr.* **139,** 1073–1081 (2009).

57. Poorabbas, A. *et al.* Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. *Eur. J. Clin. Nutr.* **61,** 892–5 (2007).

58. Wurtz, P. *et al.* Metabolic Signatures of Insulin Resistance in 7,098 Young Adults. *Diabetes* **61,** 1372–1380 (2012).

59. Sekhar, R. V. *et al.* Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care* **34,** 162–167

(2011).

60. Cobb, J. *et al.* α-Hydroxybutyric acid is a selective metabolite biomarker of impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* **39,** 988–995 (2016).

61. Friedman, M. & Levin, C. E. Nutritional and medicinal aspects of d-amino acids. *Amino Acids* **42,** 1553–1582 (2012).

62. Khoronenkova, S. V & Tishkov, V. I. D-amino acid oxidase: physiological role and applications. *Biochemistry. (Mosc).* **73,** 1511–8 (2008).

63. Fisher, G. H. *et al.* Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain. *Brain Res. Bull.* **26,** 983–5 (1991).

64. MacDonald, A. W. & Chafee, M. V. Translational and developmental perspective on N-methyl-D-aspartate synaptic deficits in schizophrenia. *Dev. Psychopathol.* **18,** 853–76 (2006).

65. Padberg, I. *et al.* A new metabolomic signature in type-2 diabetes mellitus and its pathophysiology. *PLoS One* **9,** (2014).

66. Ma, W. *et al.* Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: the Cardiovascular Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **101,** 153–63 (2015).

67. Orczyk-Pawilowicz, M. *et al.* Metabolomics of human amniotic fluid and maternal plasma during normal pregnancy. *PLoS One* **11,** 1–13 (2016).

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pełny opis osiągnięć naukowo-dydaktycznych znajduje się w załączniku nr 3, który stanowi wykaz opublikowanych prac naukowych, informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki.

1. Przed uzyskaniem stopnia doktora

Dorobek naukowy uzyskany przed nadaniem stopnia doktora składa się z 16 prac oryginalnych (IF=4,829 / MNiSW: 115), 5 prac poglądowych (MNiSW: 8), 39 streszczeń zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Pracę naukową rozpoczęłam w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (UMB), będąc na III roku studiów farmaceutycznych. Pierwszym projektem, w którym wzięłam udział było badanie szybkości rozpadu glikozydów α-tokoferolu w ramach współpracy naukowej prowadzonej pomiędzy Zakładem Biochemii Farmaceutycznej a Instytutem Chemii i Zakładem Chemii Produktów Naturalnych Uniwersytetu w Białymstoku. Założeniem projektu było uzyskanie pochodnych witaminy E charakteryzujących się zwiększoną rozpuszczalnością w płynach ustrojowych oraz większym stopniem ich przenikalności. Zsyntetyzowane glikozydowe pochodne α-tokoferolu badano pod kątem ich trwałości w wybranych homogenatach tkanek szczura, gdzie stwierdzono stabilność badanych glukozydów oraz galaktozydydów α-tokoferolu.

Kolejnym etapem pracy naukowej było wzięcie udziału w szeregu projektach poświęconych biochemii enzymów lizosomalnych, a w szczególności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy. Temat ten stanowił główny nurt badawczy Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UMB oraz był podstawą współpracy z Instytutem Biochemii, Narodowej Akademii Nauk w Grodnie na Białorusi. Aktywność enzymów lizosomalnych była badana w przebiegu różnych stanów chorobowych włączając w to między innymi cukrzycę, reumatoidalne zapalenie stawów oraz zaburzenia funkcji wątroby. W nawiązaniu do wspomnianej tematyki badawczej powstała moja praca magisterska dotycząca określenia aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy wraz z jej izoenzymami w mleku ludzkim oraz praca doktorska której przedmiotem było badanie aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy lizosomalnej oraz cytoplazmatyczno-jądrowej w surowicy krwi i w łożysku w cukrzycy ciążowej. Wynikiem prowadzonych badań było powstanie cyklu prac eksperymentalnych oraz prezentacji konferencyjnych.

2. Po uzyskaniu stopnia doktora

Dorobek naukowy uzyskany po uzyskaniu stopnia doktora składa się z 13 prac oryginalnych (IF=34,836 / MNiSW: 360), 4 prac poglądowych (MNiSW: 104), 1 rozdziału w podręczniku, 1 pracy popularnonaukowej, 15 streszczeń zjazdowych prezentowanych na zagranicznych oraz 6 wystąpień na konferencjach międzynarodowych i zagranicznych, spośród których 5 stanowiły zaproszenia organizatorów.

Istotnym zwrotem, który przyczynił się do zasadniczego rozwoju oraz ukierunkowania moich zainteresowań naukowych była możliwość wyjazdu stypendialnego do Centrum Metabolomiki i Bioanaliz (CEMBIO), mieszczącego się na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu San Pablo CEU w Madrycie. Praca naukowa w renomowanym laboratorium, stanowiącym ośrodek referencyjny w zakresie niecelowanych analiz metabolomicznych pozwoliła mi na rozwój umiejętności w zakresie technik separacyjnych oraz spektrometrii mas oraz doskonalenie warsztatu badawczego związanego z niecelowanymi analizami metabolomicznymi. Biorąc pod uwagę interdyscyplinarny charakter dziedziny zdobyte kompetencje i doświadczenie dotyczą zarówno technik analitycznych, chemometrycznych jak i ciągłego pogłębiania wiedzy w zakresie biologii molekularnej i wiedzy klinicznej. Efektem mojej pracy jest cykl publikacji dotyczący wdrożenia analiz metabolomicznych do projektów klinicznych. Ze względu na moje szczególne zainteresowanie mechanizmami prowadzącymi do powikłań występujących w ciąży, jedne z moich pierwszych prowadzonych projektów opierały się na zastosowaniu metabolomiki niecelowanej w perinatologii. Ponadto, praca w CEMBIO dała mi szansę na rozwój współpracy naukowej z innymi renomowanymi jednostkami badawczymi takimi jak np.

- w zakresie perinatologii: Klinika Perinatologii uniwersyteckiego szpitala La Paz w Madrycie, spełniającym funkcję ośrodka referencyjnego zarówno w dziedzinie perinatologii jak i wielu innych; Klinika Neonatologii, Uniwersyteckiego Szpitala Pediatrycznego Sant Joan de Déu w Barcelonie. Jestem głównym wykonawcą projektów naukowych wynikających z wymienionej współpracy.
- w zakresie badań nad nowotworami: Laboratorium Badań Klinicznych, Narodowy Instytut Zdrowia, Baltimore, USA. Jestem głównym wykonawcą projektu dotyczącego poznania mechanizmu działania (R,S')-, (R,R')-4-metoksy-1-nafylfenoterolu w nowotworach trzustki oraz guzach okrężnicy.
- w zakresie lipidomiki: Zakład Chemii Fizjologicznej, Instytut Karolinska, Sztokholm, Szwecja
- w zakresie biochemii: Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet San Pablo CEU, Madryt, Hiszpania
- w zakresie badań nad żywnością funkcjonalną: Instytut Nauki o Żywności, Technologii i Żywienia (ICTAN), Hiszpańskie Narodowe Centrum Badań, Madryt, Hiszpania

Efektem podjętych prac są prowadzone wspólnie projekty naukowe oraz przedstawianie rezultatów prowadzonych badań w formie publikacji naukowych oraz streszczeń konferencyjnych.

Kolejnym podjętym działaniem jest udział w pracach badawczych związanych z identyfikacją nowych biomarkerów stanów patofizjologicznych na podstawie oznaczanych profili metabolomicznych i bioinformatycznie zintegrowanego podejścia systemowego, w ramach współpracy z Katedrą Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Przygotowanie merytoryczne oraz wypracowane procedury pozwalają mi na wykonywanie złożonych projektów badawczych wymagających zarówno zastosowania skutecznych narzędzi jak i dokładnego zrozumienia zarówno założeń jak i specyfiki wielkoskalowych niecelowanych analiz metabolomicznych.

3. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

- Ukończenie kursu w zakresie pedagogiki i dydaktyki, Pracownia Studium Filozofii i Psychologii Człowieka, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku (2010)
- Prowadzenie zajęć dla studentów III roku farmacji w zakresie biochemii farmaceutycznej (ćwiczenia laboratoryjne, zajęcia fakultatywne) w ramach studium doktoranckiego
- Prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów III oraz IV roku kierunku lekarskiego, III roku lekarsko-dentystycznego oraz III roku kierunku lekarskiego *English Division* w zakresie farmakologii w trakcie pracy na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku
- Prowadzenie specjalistycznych kursów z zakresu metabolomiki niecelowanej dla stypendystów programu w ramach umowy offsetowej z EADS-CASA, Centrum Metabolomiki i Bioanaliz, Uniwersytet San Pablo CEU, Madryt, Hiszpania
- Nadzór projektów z zakresu metabolomiki niecelowanej będących przedmiotem badań wykonywanych w ramach studium doktoranckiego oraz stanowiących końcową pracę badawczą studentów Uniwersytetu San Pablo CEU w Madrycie
- Udział w projekcie edukacyjno-naukowym pt. *Wykorzystanie zaawansowanej chemii analitycznej w naukach badaniach biomedycznych i farmaceutycznych (ACCLifeSci).* Projekt ten był koordynowany przez prof. dr hab. Elżbietę Skrzydlewską z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w ramach programu Erasmus+ współfinansowanego przez Komisję Unii Europejskiej i realizowany dzięki partnerskiej współpracy trzech uniwersytetów: (1) Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Zakład Chemii Analitycznej; (2) Uniwersytetu w Aveiro, Wydział Chemii, Centrum Spektrometrii Masowej, Aveiro, Portugalia; (3) Uniwersytetu San Pablo CEU, Centrum Metabolomiki i Bioanaliz (CEMBIO, Madryt, Hiszpania. Celem projektu było dostosowanie programów studiów doktoranckich do postępu wiedzy w zakresie zaawansowanych technik analitycznych. Założeniem projektu było przygotowanie kadry akademickiej do kształcenia doktorantów w zakresie metabolomiki, lipidomiki oraz proteomiki. W ramach podjętych działań wprowadzono modyfikację programów nauczania. Wymiernym efektem było opracowanie e-materiałów, w tym podręcznika wydanego w wersji polskiej, angielskiej oraz hiszpańskiej. W ramach współredagowania wspomnianych materiałów odpowiedzialna byłam za przygotowanie wersji anglojęzycznej Modułu 2 pt. Metabolomika, a w szczególności opisanych zajęć praktycznych z zakresu metabolomiki poprzez opracowanie szczegółowego instruktarzu korzystania z ogólnodostępnej platformy *Workflow4Metabolomics (W4M)* dedykowanej do przetwarzania danych metabolomicznych http://workflow4metabolomics.org/. Ponadto przygotowałam projekt strony tytułowej podręcznika oraz brałam udział w przygotowaniu rycin do wersji anglojęzycznej oraz hiszpańskojęzycznej. W ramach projektu odbyłam również dwa staże naukowo-dydaktyczne (Instytut Pasteura w Paryżu oraz Centrum Spektrometrii Mas Uniwersytetu w Aveiro).

- Udział w organizowaniu międzynarodowej konferencji naukowej *28th Pharmaceutical and Biomedical Analysis Conference*, Madryt, Hiszpania (2017)

3. Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda Rektora Akademii Medycznej w Białymstoku za osiągnięcia naukowe w roku 2006 i 2007
- 4 stypendia wyjazdowe na pokrycie kosztów uczestniczenia w międzynarodowych konferencjach naukowych, przyznane przez *Society for Glycobiology* oraz *FEBS* (*The Federation of European Biochemical Societies) Organization*
- Stypendium Naukowej Fundacji Polpharmy na rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny za najlepszą pracę doktorską (2009)
- 2 nagrody przyznane za najlepszą pracę posterową (*International Symposium of Chromatography*, Toruń, (2012) oraz DPSG (*Diabetic Pregnancy Study Group*) Meeting, Malaga, Hiszpania (2015)
- Stypendium przyznane przez *European Foundation for the Study of Diabetes* (EFSD), umożliwiające wykonanie badań w Zakładzie Chemii Fizjologicznej II, w Instytucie Karolinska w Sztokholmie (2015)
- Nagroda zespołowa Ángel Herrera przyznana przez Uniwersytet San Pablo CEU w Madrycie za szczególne osiągnięcia w dziedzinie rozwoju innowacyjności programu nauczania za projekt *Wykorzystanie zaawansowanej chemii analitycznej w naukach badaniach biomedycznych i farmaceutycznych*, *AALifeSci* (*Advanced Analytical Chemistry for Life Sciences*).

4. Podsumowanie dorobku naukowego

Wyniki moich badań zostały opublikowane w czasopismach naukowych oraz były prezentowane (w formie doniesień konferencyjnych i wystąpień ustnych) na krajowych i międzynarodowych tematycznych konferencjach naukowych.

1. Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora:
   - Prace oryginalne: **16** (**IF=4,829** / **MNiSW: 115**)
   - Prace poglądowe: **5** (**MNiSW: 8**)
   - Streszczenia zjazdowe: ze zjazdów zagranicznych: **8**; ze zjazdów krajowych: **30**
   - Wystąpienia zjazdowe: ze zjazdów zagranicznych: 0; za zjazdów krajowych: **1**

2. Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora:
   - Prace oryginalne: **13** (**IF=34,836** / **MNiSW: 360**)
   - Prace poglądowe: **4** (**IF=12,526** / **MNiSW: 104**)
   - Rozdziały w monografiach i podręcznikach: **1**
   - Prace popularnonaukowe: **1**
   - Streszczenia zjazdowe: ze zjazdów zagranicznych: **15**; ze zjazdów krajowych: 0

- Wystąpienia zjazdowe: ze zjazdów zagranicznych: **3**; za zjazdów krajowych: **3**

Całkowity dorobek: **29** prac oryginalnych, **9** prac poglądowych, **1** rozdział w podręczniku, **1** praca popularnonaukowa, **53** streszczenia zjazdowe, **7** wystąpień zjazdowych
(IF=52,191/ MNiSW: 587)

Liczba cytowań wg bazy *Scopus*: **230**

Liczba cytowań wg bazy *Web of Science Core Collection*: **198**

Indeks Hirscha wg bazy *Web of Science Core Collection*: **9**

Indeks Hirscha wg bazy *Scopus*: **10**