



AUTOREFERAT

Natalia Miękus-Purwin

**Nowe podejścia analityczne do oznaczania wybranych amin
biogennych w próbkach biologicznych jako biomarkerów wytypowanych
jednostek chorobowych**

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2020

Spis treści

1. Imię i Nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2. Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe.....	4
4.3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników	6
4.3.1. Wprowadzenie w tematykę badawczą – biomarkery biochemiczne	6
4.3.2. Cel badań.....	15
4.3.3. Strategie analityczne do izolacji amin z próbek moczu i ich aplikacje kliniczne.....	16
4.3.4. Mikroekstrakcja do fazy stałej i cieczy jonowe podczas izolacji amin biogennych z moczu	23
4.3.5. Ekstrakcja i wzbogacanie metabolitów amin biogennych w moczu	30
4.3.6. Metody prekoncentracyjne wybranych analitów w złożonych matrycach biologicznych ..	32
4.4. Podsumowanie wyników badań stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawionej do oceny rozprawy habilitacyjnej	34
4.5. Piśmiennictwo	38
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	43
5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych	43
5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych.....	46
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	50
6.1. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.....	50
6.2. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	50
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.	51

1. Imię i Nazwisko

Natalia Miękus-Purwin

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2011 – Dyplom magistra farmacji; Akademia Medyczna w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny), Wydział Farmaceutyczny. Praca magisterska pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Nasala, wykonywana we Włoszech, w Perugii, w ramach wymiany Socrates/Erasmus na Università degli studi di Perugia, Departament Medycyny Eksperymentalnej i Biochemii, pt.: *“Generation of antibodies specific for the phosphorylated form of indoleamine 2,3-dioxygenase, a master regulator of the immune system”*.

2012 – Prawo wykonywania zawodu farmaceuty wydane przez Gdańską Okręgową Izbę Aptekarską.

2015 – Dyplom doktora nauk farmaceutycznych nadany uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt. *„Optymalizacja metod bioanalitycznych podczas oceny potencjalnych biomarkerów nowotworów pochodzenia neuroendokrynnego”*, wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotor pracy: prof. dr hab. Tomasz Bączek, Recenzenci: dr hab. Michał J. Markuszewski, prof. nadzw. GUMed, prof. dr hab. Zenon J. Kokot.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

11.2015 – 09.2016 – Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, stanowisko: specjalista;

10.2016 – 02.2020 – Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, stanowisko: adiunkt (cały etat);

01.2016 – 02.2020 – Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, stanowisko: adiunkt (1/4 etatu);

02.2020 – do dnia dzisiejszego – Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, stanowisko: adiunkt (cały etat).

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Nowe podejścia analityczne do oznaczania wybranych amin biogennych w próbkach biologicznych jako biomarkerów wytypowanych jednostek chorobowych

4.2. Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe

H1. N. Miękus, P. Kowalski, I. Olędzka, A. Plenis, E. Bień, A. Miękus, M. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek, Determination of urinary biogenic amines' biomarker profile in neuroblastoma and pheochromocytoma patients by MEKC method with preceding dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography B*, 2016; 1036-1037, 114-123.

IF = 2.603 Punkty MNiSW = 30

Wkład merytoryczny: *Opracowanie hipotezy i koncepcji badawczej, współpraca z lekarzami i personelem medycznym podczas poboru próbek, prowadzenie analiz w laboratorium, opracowywanie surowych danych eksperymentalnych, opracowanie manuskrytu i udział w pisaniu publikacji i redagowaniu odpowiedzi na recenzje.*

H2. N. Miękus, I. Olędzka, P. Kowalski, P. Miękus, T. Bączek, Practical application of biogenic amine profiles for the diagnosis of patients with ischemic stroke, *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 2018, 27(4), 945-950.

IF = 1.646 Punkty MNiSW = 20

Wkład merytoryczny: *Opracowanie hipotezy badawczej, współpraca z lekarzami i personelem medycznym podczas poboru próbek, prowadzenie analiz w laboratorium, opracowywanie surowych danych eksperymentalnych, opracowanie manuskrytu i udział w pisaniu publikacji i redagowaniu odpowiedzi na recenzje.*

H3. N. Miękus, I. Olędzka, N. Kossakowska, A. Plenis, P. Kowalski, A. Prahl, T. Bączek. Ionic liquids as signal amplifiers for the simultaneous extraction of several neurotransmitters determined by micellar electrokinetic chromatography, *Talanta*, 2018, 186, 119-123.

IF = 4.916 Punkty MNiSW = 40

Wkład merytoryczny: Opracowanie hipotezy badawczej, wytypowanie nowych, potencjalnych rozpuszczalników do procedur ekstrakcyjnych oraz współudział w prowadzeniu analiz w laboratorium, opracowywanie surowych danych eksperymentalnych, opracowanie manuskrytu i udział w pisaniu publikacji i redagowaniu odpowiedzi na recenzje, współuczestnictwo w korespondencji z edytorem.

H4. N. Miękus*, I. Olędzka, D. Harshkova, I. Liakh, A. Plenis, P. Kowalski, T. Bączek. Comparison of three extraction approaches for the isolation of neurotransmitters from rat brain samples, *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19, 1-11.

IF = 4.183 Punkty MNiSW = 30

Wkład merytoryczny: Opracowanie hipotezy badawczej, zaprojektowanie prac badawczych i współpraca z biologami, prowadzenie i nadzorowanie analiz w laboratorium, opracowywanie surowych danych eksperymentalnych, opracowanie manuskrytu i udział w pisaniu publikacji i redagowaniu odpowiedzi na recenzje, autor korespondencyjny.

H5. N. Miękus*, A. Plenis, M. Rudnicka, N. Kossakowska, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Extraction and preconcentration of compounds from the L-tyrosine metabolic pathway prior to their micellar electrokinetic chromatography separation, *Journal of Chromatography A*, 2020, 1-9.

IF = 3.858, Punkty MniSW = 100

Wkład merytoryczny: Opracowanie hipotezy badawczej, zaprojektowanie prac badawczych, opracowywanie surowych danych eksperymentalnych, opracowanie manuskrytu i udział w pisaniu publikacji oraz redagowaniu odpowiedzi na recenzje, autor korespondencyjny.

H6. G. Harvas, A. Guttman, N. Miękus, T. Bączek, S. Jeong, D.S. Chung, V. Pätoprstý, M. Masár, M. Hutta, V. Datinská, F. Foret, Practical sample pretreatment techniques coupled with capillary electrophoresis for real samples in complex matrices, *Trac – Trends in Analytical Chemistry*, 122, 2020, 1-9.

IF = 8.428, Punkty MNiSW = 140

Wkład merytoryczny: Napisanie części publikacji poglądowej dotyczącej prekoncentracji próbki przed analizą elektroforetyczną off line oraz on line, koordynacja międzynarodowej współpracy, czynny udział w pisaniu pracy przeglądowej, udział w ostatecznej redakcji tekstu i spisu bibliografii.

* prace, w których byłam autorem korespondencyjnym.

Osiągnięcie naukowe przedstawione w ramach postępowania habilitacyjnego stanowi cykl 5 prac oryginalnych i 1 pracy poglądowej, opublikowanych w latach 2016-2020. W pięciu pracach jestem pierwszym autorem, w tym w dwóch publikacjach również autorem

korespondencyjnym. Wszystkie prace zostały zamieszczone w bazie Journal Citation Reports (JCR) o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) z roku ukazania się publikacji równym 25,634 i łącznej wartości punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) wynoszącej 360.

Sumaryczny IF = 25,634/ MniSW = 360

IF/publikację = 4,272

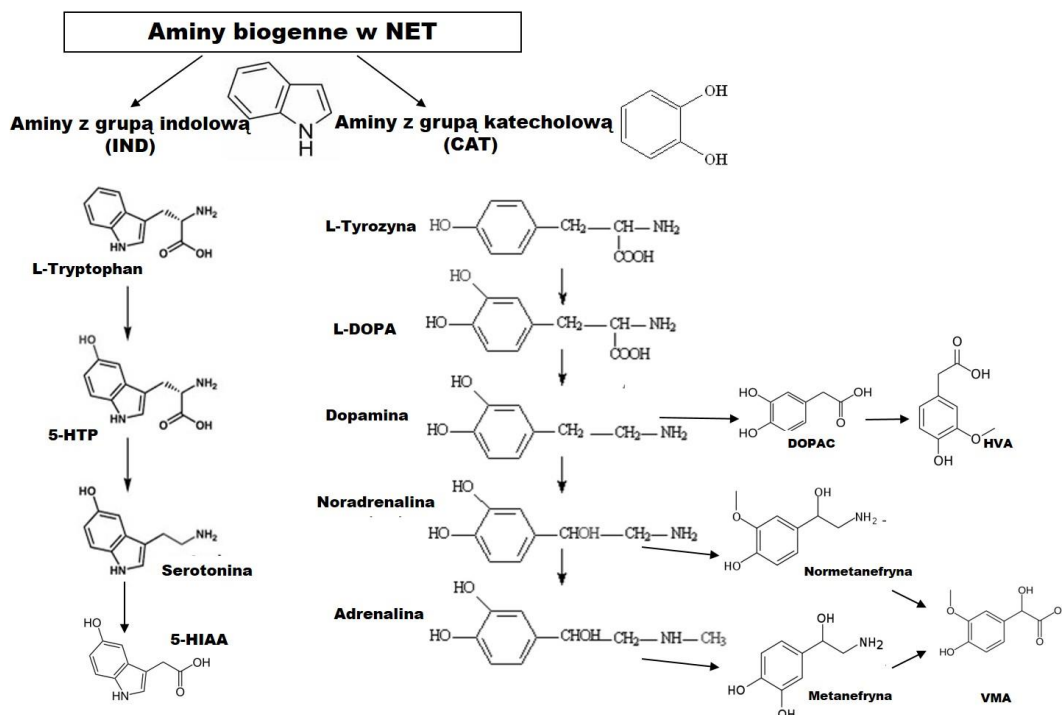
4.3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników

4.3.1. Wprowadzenie w tematykę badawczą – biomarkery biochemiczne

W ostatniej dekadzie unowocześnienie metod diagnostycznych i terapeutycznych nabrało tempa, dzięki – między innymi – rozwojowi technologicznemu. W ostatnich latach obserwuje się znaczący postęp w opracowywaniu nowych metod, *in silico*, *in vitro* oraz *in vivo*, pomocnych w opisie i interpretacji systemów biologicznych, w kontekście pojedynczych komórek, jak i całościowego spojrzenia na organizm (biologia systemów). Niemniej, często zastosowanie nawet najbardziej zaawansowanych algorytmów matematycznych i narzędzi bioinformatycznych podczas analizy surowych danych eksperymentalnych sprawia wiele trudności. Dopiero wielokierunkowa interpretacja tych danych przez ekspertów z różnych dziedzin nauki, takich jak bioinformatyka, analityka, medycyna, farmacja i nauki pokrewne, umożliwia poprawne wytypowanie wyników istotnych dla procesów diagnostycznych i/lub terapeutycznych [1]. Właśnie dzięki interdyscyplinarnej pracy możliwe jest usprawnianie rozwoju nowych metod diagnostycznych, projektowania nowych, potencjalnych cząsteczek o działaniu terapeutycznym, czy też nowych punktów uchwytu dla leków, co prowadzi do poprawy rokowań i/lub jakości życia pacjentów cierpiących na ciężkie schorzenia. Istotną rolę w tym procesie pełnią naukowcy, którzy, zajmując się opracowywaniem nowych procedur analitycznych, dostarczają narzędzi pozwalających na odpowiednio czułe i precyzyjne oznaczanie ważnych biologicznych cząsteczek (potencjalnych biomarkerów) w skomplikowanych (pod względem składu chemicznego) próbkach, jakimi są matryce biologiczne. Bez tych badań – szczególnie wspomnianych powyżej biomarkerów – często nie jest możliwe właściwe i szybkie rozpoznanie i, co najważniejsze, odpowiednie celowane leczenie pacjenta i wdrożenie terapii spersonalizowanej. Biomarkery biochemiczne stanowią kluczowe uzupełnienie diagnostyczne dla badania fizykalnego i wywiadu pacjenta,

szczególnie dla chorych cierpiących na trudne do zdiagnozowania we wczesnym stadium schorzenia, takie jak nowotwory neuroendokrynne (ang. *neuroendocrine tumors*, NET). W tej heterogenicznej grupie nowotworów możemy wyróżnić te, które zdolne są do wydzielania hormonów i/lub amin biogennych, a więc między innymi: rakowiaka (najczęściej występującego guza żołądkowo-jelitowo-trzustkowego), gastrinoma, insulinoma, zwojaka zarodkowego współczulnego (łac. *neuroblastoma*, NBL) czy guza chromochłonnego nadnerczy [2,3]. W procesie diagnostycznym pacjentów z NET ważne jest oznaczanie w próbkach biologicznych biomarkerów o budowie białkowej (np. chromograniny A, swoistej enolazy neuronowej, ferrytyny), ale również małowcząsteczkowej (np. związków z grupy amin biogennych, pochodnych indoloamin i katecholamin), które – według Narodowego Instytutu Zdrowia (ang. *National Institute of Health*, NIH) – są pomocne jako biomarkery na każdym etapie opieki nad pacjentem nowotworowym [4,5].

Wśród potencjalnych biomarkerów z grupy amin biogennych możemy wytypować powstającą z L-tryptofanu (ang. *L-tryptophan*, L-Tryp) serotoninę (ang. *5-hydroxytryptamine*, 5-HT) i jej główny metabolit: kwas 5-hydroksyindoloctowy (ang. *5-hydroxyindoleacetic acid*, 5-HIAA) oraz katecholaminy (pochodne L-tyrozyny (ang. *L-tyrosine*, L-Tyr): adrenalinę (ang. *adrenaline*, A), noradrenalinę (ang. *noradrenaline*, NA), dopaminę (ang. *dopamine*, DA), lewodopę (ang. *levodopum*, L-DOPA) i ich metabolity: kwas 3,4-dihydroksyfenyloctowy (ang. *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*, DOPAC), kwas homowanilinowy (ang. *homovanillic acid*, HVA) kwas wanilinomigdałowy (ang. *vanillylmandelic acid*, VMA), metanefrynę (ang. *metanephrine*, M) i normetanefrynę (ang. *normetanephrine*, NM) (Rycina 1). Dane literaturowe potwierdzają, że związki te dostarczają znaczących, biochemicznych danych o pacjentach z guzami NET [4,6–8].



Rycina 1. Skrócony szlak przemian amin biogennych.

Legenda: NET – guzy neuroendokryne; 5-HTP – 5-hydrokсыtryptofan; 5-HIAA – kwas 5-hydrokсыindolooctowy; DOPAC – kwas 3,4-dihydrokсыfenylooctowy; HVA – kwas homowanilinowy; VMA – kwas wanilinomigdałowy (na podstawie [4]).

Należy zwrócić uwagę, że w szerokiej praktyce klinicznej nieprawidłowy poziom biomarkerów może często mieć inne źródło chorobowe niż to, które jest przyjmowane w trakcie diagnozowania pacjenta. Przydatność oznaczania stężenia danej substancji ograniczają jej czułość, swoistość i wartość predykcyjną, przy czym często pojedynczy biomarker nie spełnia wszystkich wymaganych kryteriów [9]. W przypadku guzów NET, nawet tych zdolnych do wydzielania związków biologicznie aktywnych, manifestacja objawów charakterystycznych dla choroby obserwowana jest często dopiero w stadium przerzutowym nowotworu. Dodatkowo, na poziom niektórych biomarkerów wpływ mają: dieta pacjenta, choroby towarzyszące oraz przyjmowane leki. Przykładowo, oznaczanie tylko niespecyficznego biomarkera NET – chromograniny A – prowadzić może do uzyskania wyników fałszywie dodatnich, podczas, gdy pacjent cierpi na nowotwory o podłożu innym od neuroendokrynnego, zażywa inhibitory pompy protonowej lub leki o budowie steroidowej. Ponadto, analiza w krwi czy w moczu specyficznych biomarkerów NET, takich jak 5-HT lub jej metabolit 5-HIAA, także nie może stanowić źródła informacji diagnostycznej w sytuacji, gdy pacjent cierpi na zaburzenia wchłaniania, celiakię, jak również gdy przyjmuje leki modyfikujące poziom tryptofanu w organizmie (takie jak np. diazepam, efedryna,

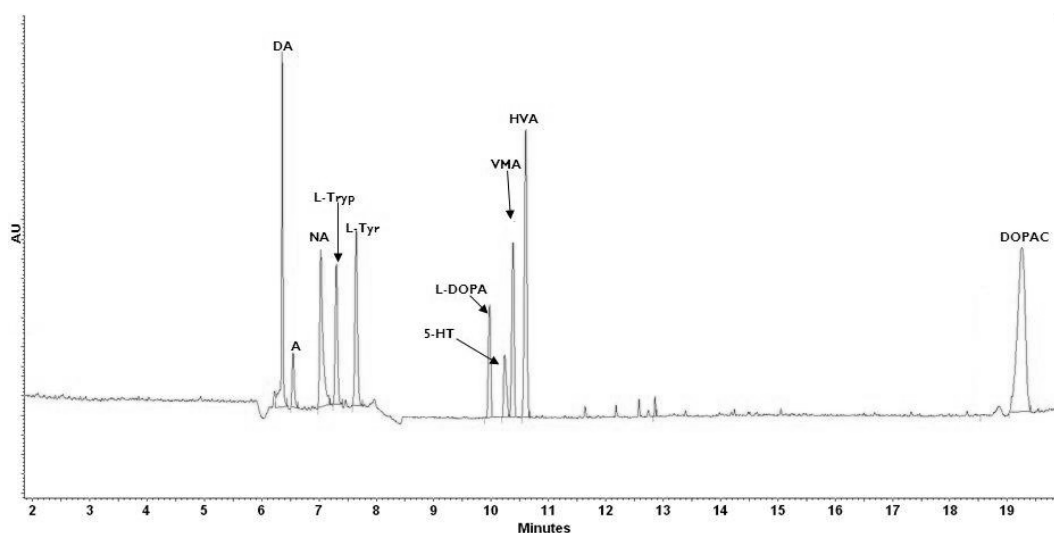
fenobarbital), a jego dieta zawiera produkty bogate w tryptofan (np. orzeszki ziemne, banany, awokado, kawę i herbatę). Wytyczne Europejskiej Organizacji Guzów NET (ang. *European Neuroendocrine Tumor Society Consensus Guidelines*) sugerują oznaczanie stężenia 5-HIAA w moczu jednocześnie ze stężeniem chromograniny A w surowicy krwi u wszystkich pacjentów z NET podczas diagnozy oraz monitorowania choroby [10]. Z kolei oznaczenia stężeń A i NA w krwi przez wiele lat stanowiły podstawę biochemicznej diagnozy NET wydzielających katecholaminy (np. guzów chromochłonnych nadnerczy). Dalsze badania pokazały, że przyjmowane leki, dieta pacjenta (bogata w produkty zawierające tyrozyne), jak również charakter niektórych guzów NET (fizjologiczne poziomy A i NA, którym towarzyszy wzrost stężenia DA) mogą prowadzić do zafałszowania wyników oznaczeń. Badania przeprowadzone w 2005 roku przez Dubois i współpracowników podkreśliły istotność oznaczania A, NA oraz DA jednocześnie dla poprawienia specyficzności testu biochemicznego [11]. Ostatnio zwrócono również uwagę na dwa metabolity L-Tyr z grupy metanefryn (M i NM), które jako biomarkery cechują się wyższą czułością podczas diagnozy guzów chromochłonnych nadnerczy, niż A, NA lub DA [12]. Większość dostępnych obecnie testów nie umożliwia prawidłowej oceny charakteru guza czy rokowania pacjenta, właśnie z powodu stosowania pojedynczych biomarkerów lub nieuwzględnienia różnic w stosowanych metodach analitycznych w różnych laboratoriach [13]. Dlatego tak ważne jest opracowywanie nowych metod analitycznych, które pozwalają jednoczesne oznaczanie kilku, czasem kilkunastu związków, by zaproponować test biochemiczny o odpowiedniej czułości i specyficzności. Taki test powinien uwzględniać możliwości sprzętowe laboratoriów farmaceutycznych i klinicznych, a jednocześnie gwarantować znaczące obniżenie granic: wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD) i oznaczalności (ang. *limit of quantification*, LOQ) metody analitycznej. Można to osiągnąć poprzez zastosowanie detektora o dużo wyższej czułości, jak spektrometr masowy (ang. *mass spectrometry*, MS) albo detektor z laserowo indukowaną fluorescencją (ang. *laser-induced fluorescence*, LIF), albo poprzez optymalizację procedur ekstrakcyjnych i separacyjnych. To wymaga doboru optymalnych warunków ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej, a następnie rozdzielania mieszaniny związków na pojedyncze jej składniki za pomocą np. technik chromatograficznych i – coraz częściej – elektromigracyjnych wspartych zastosowaniem metod *off line*, *on line* i *in line* wzbogacających anality w próbkach. Opracowując metody analityczne należy także uwzględnić względy finansowe i dostępność aparatury (detektory spektrofotometryczne są znacznie tańsze niż MS i LIF, zwykle laboratoria są w nie wyposażone). Ponadto, dla

większości oznaczanych związków, zastosowanie detektorów UV-VIS (lub z matrycą diodową (ang. *diode array detector*, DAD) nie wymaga dokonywania ich konwersji chemicznej, podczas gdy taka sytuacja jest często spotykana w przypadku aplikacji detektora LIF. Większość odczynników niezbędnych do konwersji analitów cechuje stosunkowo duża toksyczność, a koszty deuterowanych standardów analitycznych (np. powszechnie stosowanych w spektrometrii mas) są znaczne. Istotnym mankamentem metod opartych na chromatografii cieczowej (LC) jest także stosunkowo duże zużycie rozpuszczalników organicznych do przygotowania faz ruchomych, których toksyczność może być poważnym problemem dla środowiska naturalnego. I tak, rozpatrując względy finansowe, ekologiczne i rozwojowe, uwagę warto skierować na rozwój metod opartych o elektroforezę kapilarną (ang. *capillary electrophoresis*, CE) podczas analizy małowcząsteczkowych biomarkerów z grupy amin biogennych z matryc biologicznych [14,15].

Elektroforeza kapilarna jako narzędzie bioanalityczne

CE należy do grupy technik elektromigracyjnych i jest prężnie rozwijającą się techniką od czasu jej opracowania w latach 60-tych ubiegłego stulecia. Doskonale wpisuje się w postulat „zielonej chemii”, gdyż umożliwia znaczącą redukcję często toksycznych odczynników, objętości próbki potrzebnej do przeprowadzenia analizy, cechuje się dużą sprawnością i mniejszą wrażliwością na składniki matrycy próbki, w porównaniu do LC. W laboratorium analitycznym wciąż nie zyskała takiej popularności jak komplementarna do niej LC, jednak dzięki postępowi technologicznemu zaczyna zajmować należne jej miejsce [16,17]. W podstawowym schemacie rozdzielania z zastosowaniem CE możemy opisać jako strefową elektroforezę kapilarną (ang. *capillary zone electrophoresis*, CZE), w której silny przepływ elektroosmotyczny wymusza migrację wszystkich analitów w stronę katody, co spowodowane jest przez ujemnie naładowaną wewnętrzną ścianę niemodyfikowanej krzemionki (taka sytuacja występuje, pod wpływem przyłożonego wysokiego napięcia, gdy bufor separacyjny (ang. *background electrolyte*, BGE) wykazuje wartość pH powyżej 2). W takich warunkach szybkość migracji cząsteczki jest uwarunkowana przez stosunek jej ładunku do wielkości. Niemniej anality, które nie posiadają ładunku, nie mogą zostać rozdzielone w tak prostym układzie. Naprzeciw temu problemowi wyszedł w latach 80-tych japoński naukowiec profesor Terabe, który wykazał, że zastosowanie jonowych miceli w BGE pozwala na rozdzielanie również związków nieposiadających ładunku [18–20]. Ta odmiana CE została nazwana micelarną elektrokinetyczną chromatografią kapilarną (ang.

micellar electrokinetic chromatography, MEKC). Migracja uwarunkowana jest tutaj głównie hydrofobowością analitów i stopniem powinowactwa do miceli. Zastosowanie metod opartych o MEKC pozwala nie tylko na analizę związków nieobdarzonych ładunkiem, ale też na jednoczesną analizę anionów, kationów i związków neutralnych, po zoptymalizowaniu wszystkich parametrów krytycznych metody separacyjnej. Do takich parametrów należą między innymi: skład oraz pH zarówno BGE, jak i buforu do próbek, dodatek surfaktantów oraz ewentualnie modyfikatorów organicznych, związków optycznie czynnych, typ i parametry dozowania próbki do kapilary, temperatura procesu rozdzielania, przykładane napięcie. W pracy doktorskiej skupiłam się właśnie na zoptymalizowaniu metody MEKC-DAD, która umożliwiła rozdzielenie 10 analitów ze szlaku metabolicznego L-Tryp i L-Tyr jednocześnie (Rycina 2) [21].



Rycina 2. Elektroferogram uzyskany dla mieszaniny dziesięciu substancji wzorcowych (każda w stężeniu 5 $\mu\text{g/mL}$), podczas gdy do rozdzielania użyto zoptymalizowanego BGE: 30 mM SDS, 10 mM Borax, 15% (v/v) MeOH, 25 mM α -CD, pH 9.36.

Warunki rozdzielania: przykładane napięcie – 25 kV, kapilara – 60,2 cm, i.d. 75 μm , $\lambda = 200 \text{ nm}$, czas nastrzyku – 5 s (0.5 psi). Legenda: DA – dopamina; A – adrenalina; NA – noradrenalina; L-Tryp – L-tryptofan; L-Tyr – L-tyrozyna; L-DOPA – lewodopa; 5-HT – serotonina; VMA – kwas wanilinomigdałowy; HVA – kwas homowanilinowy; DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy (na podstawie [21]).

Następnie metoda została zastosowana do analizy dwóch kwaśnych metabolitów katecholamin: HVA i VMA w próbkach pacjentów ze zdiagnozowanymi wydzielającymi nowotworami NET (np. NBL). Grupę kontrolną w badaniach stanowili pacjenci ze zdiagnozowanymi nowotworami niewydzielającymi, takimi jak: barwnikowy neuroektodermalny nowotwór wieku dziecięcego i nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego. Wyniki badań pozwoliły na przyporządkowanie uczestników badania do grupy badanej (stężenia HVA i VMA w moczu oznaczono w przedziale 19 – 202 $\mu\text{g/ml}$) lub

kontrolnej (w której poziomy analitów mieściły się w zakresie 2 – 6 $\mu\text{g/ml}$). Dane te wykazały spójność z danymi literaturowymi, które wskazują na podwyższonych stężeniach metabolitów katecholamin w moczu pacjentów z NBL.

Przygotowanie próbek biologicznych do analizy

Rozpatrując analizę próbek biologicznych pod kątem wykrywania i oznaczania poziomu stężeń potencjalnych biomarkerów z wykorzystaniem CE czy LC, najprostszym sposobem jest bezpośrednio poddanie próbek analizie separacyjnej. Jednakże, pomimo faktu, że CE cechuje się niższą wrażliwością na interferencje z matrycy próbki niż LC, to w większości przypadków, dysponując detektorem UV/VIS lub DAD, należy wzbogacić strategię analityczną o wprowadzenie etapu przygotowania próbki do analizy. To pozwala wzbogacić anality w próbce, a także oddzielić od związków balastowych obecnych w matrycy [22]. Jest to szczególnie istotne w sytuacji, gdy dysponujemy małymi objętościami prób i stężenia oznaczanych związków są bardzo niskie [23]. Procedura ekstrakcyjna jest szczególnie istotna dla technik elektromigracyjnych, które są tanie w eksploatacji i przyjazne środowisku, ale ze względu na niską wykrywalność wymagają zastosowania efektywnych metod ekstrakcji analitów z próbek biologicznych. Wspomniana niska wykrywalność CE wynika z faktu, że długość drogi optycznej jest równa przekrojowi kapilary (najczęściej stosowane są kapilary o przekroju 50 lub 75 μm), co znacząco ogranicza możliwości detekcyjne metod elektromigracyjnych [24]. Dla większości matryc biologicznych, złożoność ich składu, występowanie związków istotnych klinicznie w stężeniu często poniżej granicy wykrywalności obecnie stosowanych metod, duża wrażliwość tych związków na czynniki zewnętrzne takie jak światło, temperatura, związki redukujące i utleniające, dodatkowo przemawiają za zastosowaniem procedur przygotowania próbki, gdyż ten etap może rzutować na ostateczne wyniki eksperymentu medycznego. Pozwala bowiem zapewnić stabilność fizykochemiczną analitów, a także usuwać substancje balastowe, w tym sole, białka i inne związki, które mogą interferować z sygnałami wybranych analitów [25–27]. Najchętniej stosowane materiały biologiczne podczas analiz biomedycznych to płyny ustrojowe i tkanki człowieka (mocz, surowica, osocze, ślina, tkanki pobrane podczas operacji/zabiegów i inne) oraz tkanki małych zwierząt laboratoryjnych (tkanka nerwowa szczurów, myszy, wycinki nowotworów uzyskanych ze zwierzęcych modeli chorób nowotworowych). Wybór odpowiedniego źródła próbki musi być starannie przemyślany, gdyż powinien gwarantować

uzyskanie wiarygodnych danych klinicznych, a jednocześnie pozwalać na jak najmniej inwazyjne, względnie mało kosztowne, powtarzalne i nieskomplikowane pozyskanie próbek.

Wśród technik, którymi dysponuje chemia analityczna, służących do wyodrębniania związków, znajdują się techniki ekstrakcji do fazy ciekłej (ang. *liquid-phase extraction*, LLE) lub do fazy stałej (ang. *solid-phase extraction*, SPE). Zastosowanie metod opartych o LLE, również podczas izolacji amin biogennych i ich metabolitów, jest chętnie stosowanym podejściem, co potwierdzają dane literaturowe [28,29]. Przykładowo, Sadilkova i współpracownicy zastosowali LLE podczas analizy HVA i VMA w surowicy krwi pacjentów z NBL [28]. Powyższa procedura w połączeniu z LC-MS umożliwiła uzyskanie wartości LOD dla analitów – 20 ng/ml dla VMA oraz 30 ng/ml dla HVA. Jednoczesne oznaczanie amin biogennych i metanefryn zostało także przeprowadzone techniką LLE w połączeniu z LC i tandemową spektrometrią mas (MS/MS) [29]. Przy zastosowaniu tego podejścia analitycznego uzyskano wartości LOD dla analitów w przedziale 3 – 24 ng/ml. Przeprowadzono także ekstrakcję metabolitów katecholamin o charakterze kwaśnym (HVA, VMA) z próbek moczu pacjentów z użyciem LLE, co pozwoliło na efektywną izolację analitów z próbek klinicznych w obecności innych składników matrycy [21]. Niemniej technika LLE posiada także szereg niekwestionowanych wad: jest czaso- i pracochłonna, wymaga użycia dużych objętości zarówno materiału biologicznego, jak i – często toksycznych – odczynników organicznych, oraz jest trudna do automatyzacji [26]. Odmianą LLE w skali mikro jest tzw. mikroekstrakcja ciecz-ciecz (ang. *liquid-phase microextraction*, LPME), która ma przewagę nad konwencjonalną techniką LLE w zakresie zmniejszenia zużycia odczynników i próbki poddawanej analizie, możliwości jednoczesnej ekstrakcji i wzbogacania analitów w próbce, jak również możliwości aplikacji w trybie *on line*. Istnieją liczne warianty LPME, w tym na przykład dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz (ang. *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME). DLLME znajduje zastosowanie podczas izolacji szeregu istotnych klinicznie biomarkerów [26,30], niemniej dopiero w ostatnim czasie zyskała na popularności również w kontekście oznaczania amin biogennych w próbkach biologicznych [31,32]. Wcześniejsze badania skupione były na izolacji katecholamin i indoloamin z próbek biologicznych poprzez zastosowanie magnetycznych nanocząstek [33,34], odbiaćzanie próbki biologicznej odczynnikami organicznymi [35], albo adsorpcję amin na tlenku glinu [36]. Zwykle analizy te wymagały zastosowania detektora MS [33,37], albo detekcji elektrochemicznej [36]. Również metody oparte o ekstrakcję do fazy stałej SPE są często stosowane w analizie amin biogennych. Ich zaletą jest nie tylko selektywna izolacja,

ale również jednoczesne zateżenie badanych związków na złożu i oczyszczenie matrycy próbki z soli, detergentów i innych zanieczyszczeń. Rozwój coraz to nowszych, bardziej selektywnych sorbentów do SPE (takich jak na przykład polimery z tzw. nadrukiem cząsteczkowym, kombinacje złożów jonowymiennych), możliwość automatyzacji procesu, szybkość ekstrakcji, sprawiają, że jest to technika umożliwiająca zredukowanie ilości odczynników oraz zapewniająca wysoką powtarzalność analiz, jak i szeroki zakres zastosowań [33,38]. Przykładowo, SPE z kolumnkami o właściwościach wymiennicy kationowych w połączeniu z LC-MS/MS zastosowano do izolacji wybranych amin biogennych z próbek krwi [38]. Opracowana metodyka umożliwiła uzyskanie LOD dla analitów na poziomie 0,03 ng/ml, a ponadto jej użyteczność została potwierdzona w praktyce klinicznej. Odmianą SPE jest mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. *solid-phase microextraction*, SPME), w której używane są sorbenty naniesione na cienkie włókno szklane lub kwarcowe. SPME zostało opracowane przez zespół naukowców pod kierownictwem prof. Pawliszyna w 1987 roku i od tego czasu możemy zaobserwować znaczący rozwój tej metody ekstrakcji. SPME pozwala na dostosowanie etapu przygotowania próbki do analizy do wymogów „zielonej chemii”, poprzez redukcję zużycia toksycznych dla środowiska i operatorów odczynników. Do technik SPME należą procedury realizowane w układzie ekstrakcji do fazy nadpowierzchniowej dla lotnych analitów (ang. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME), albo poprzez bezpośredni kontakt z płynną próbką lub tkanką (ang. *direct-immersion solid-phase microextraction*, DI-SPME)). Krokiem milowym w SPME, oprócz tworzenia nowszych złożów ekstrakcyjnych (pozwalających na ekstrakcję szerokiej gamy związków ze skomplikowanych matryc biologicznych), jest zastosowanie SPME w formie 96: 96 blaszek metalowych, na które naniesione są odpowiednie złoża ekstrakcyjne połączonych jest w jeden ciąg tak, że jednocześnie można przeprowadzić ekstrakcję do 96 próbek. Wpływa to znacząco na zwiększenie przepustowości metody, a odpowiednia konserwacja złożów umożliwia ich kilkukrotną aplikację [25,39]. Tak jak w przypadku techniki SPE, ekstrakcja następuje w wyniku podziału analitu pomiędzy fazą ciekłą (matryca próbki) a fazą stacjonarną (adsorbent) [40]. Przykładowo, Zhang i współpracownicy w 2012 roku opracowali nowe złoża SPME polimerowe ze śladem molekularnym (ang. *molecularly imprinted polymers*, MIPs), które użyto do analizy trzech katecholamin (A, NA, DA) w krwi i moczu [41]. Złoże to charakteryzowało się wysoką stabilnością i pozwalało na efektywną ekstrakcję wszystkich związków na poziomie 85 – 103%. Dalsza analiza CE-UV/VIS umożliwiła oznaczanie śladowych ilości amin w próbkach

biologicznych z LOD, które mieściło się w przedziale 4,8 – 7,4 nmol/l. SPME umożliwiło również izolację z próbek biologicznych nie tylko katecholamin, ale również indoloaminy – 5-HT – po uprzednim upochodnieniu analitów, niezbędnym podczas połączenia SPME z analizą z zastosowaniem chromatografii gazowej (ang. *gas chromatography*, GC) sprzężonej z detekcją MS/MS [37]. Opracowana metodyka pozwoliła na oznaczanie DA, 5-HT i NA na poziomie LOD odpowiednio: 0,587, 0,381 i 1,23 µg/l.

4.3.2. Cel badań

Optymalizacja strategii analitycznych, związanych z ekstrakcją i prekoncentracją biomarkerów małowcząsteczkowych z grupy amin biogennych z próbek biologicznych przed ich analizą elektroforetyczną, stanowiła główny cel prac wchodzących do cyklu przedstawianego osiągnięcia [H1-H5]. W celu realizacji tego zadania badawczego optymalizowałam strategię:

a) oparte o techniki ekstrakcji LLE, DLLME, SPE i SPME podczas jednoczesnej izolacji i wzbogacenia *off line* DA, A, NA, 5-HT, L-DOPA, L-Tyr i L-Tryp oraz metabolitów takich jak HVA, VMA, M, NM, DOPAC, DHPG, MHPG w próbkach moczu przed ich analizą elektroforetyczną,

b) łączące zastosowanie jednocześnie cieczy jonowych oraz SPME podczas izolacji i wzbogacania wybranych amin biogennych oraz L-Tyr i L-Tryp przed ich dalszą analizą elektroforetyczną z próbek ludzkiego moczu i zwierzęcej tkanki nerwowej,

c) pozwalające na wzbogacenie panelu ważnych biologicznie neuroprzekaźników w próbkach biologicznych metodami *on line* w przebiegu rozdzielania elektroforetycznego.

Kolejnym ważnym etapem badań było zastosowanie zoptymalizowanych metod ekstrakcyjnych w połączeniu z MEKC-DAD do śledzenia zmian w poziomie amin biogennych, ich metabolitów oraz aminokwasów w rzeczywistych próbkach biologicznych otrzymanych od pacjentów ze zdiagnozowanymi nowotworami NET lub u których wystąpił udar krwotoczny lub niedokrwienność. Wyniki tych badań pilotażowych stały się podstawą do wytypowania panelu potencjalnych, nowych biomarkerów biochemicznych, pomocnych w opisie, diagnostyce lub monitorowaniu przebiegu leczenia pacjentów z trudnymi do diagnozy i monitorowania, wytypowanymi jednostkami chorobowymi. Podsumowanie różnorodnych strategii przygotowania próbek biologicznych do dalszej analizy separacyjnej CE w oparciu o

techniki wzbogacania analitów w próbkach *off line*, jak i *on line* stały się tematem przewodnim pracy poglądowej, która także została włączona do prezentowanego osiągnięcia naukowego [H6]. Praca ta umożliwiła wskazanie potencjalnie nowych metod *on line* do jednoczesnej izolacji, wzbogacania i separacji analitów w różnorodnych matrycach, także w aspekcie oznaczania biomarkerów, jak i innych, aktywnych biologicznie substancji chemicznych w próbkach o zróżnicowanym pochodzeniu.

Należy podkreślić, że wybór strategii badawczej, warunkujący jednoczesne oznaczanie szeregu analitów w toku jednej analizy, wynikał z faktu, że dopiero informacja o kilku biomarkerach, a nie pojedynczych cząsteczkach, jest preferowana podczas diagnozy, monitorowania przebiegu leczenia czy zastosowanej terapii, w kontekście trudnych do wykrycia nowotworów, jakimi są guzy NET, jak również złożonych stanów patofizjologicznych, którym towarzyszą zmiany w poziomach ważnych biologicznie, endogennych związków (jak udar mózgu). Analiza całego panelu amin biogennych, ich prekursorów i metabolitów pozwala bowiem uzyskać pełny obraz przemian na poziomie molekularnym i szerzej przyjrzeć się procesom biochemicznym, zachodzącym w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych.

4.3.3. Strategie analityczne do izolacji amin z próbek moczu i ich aplikacje kliniczne

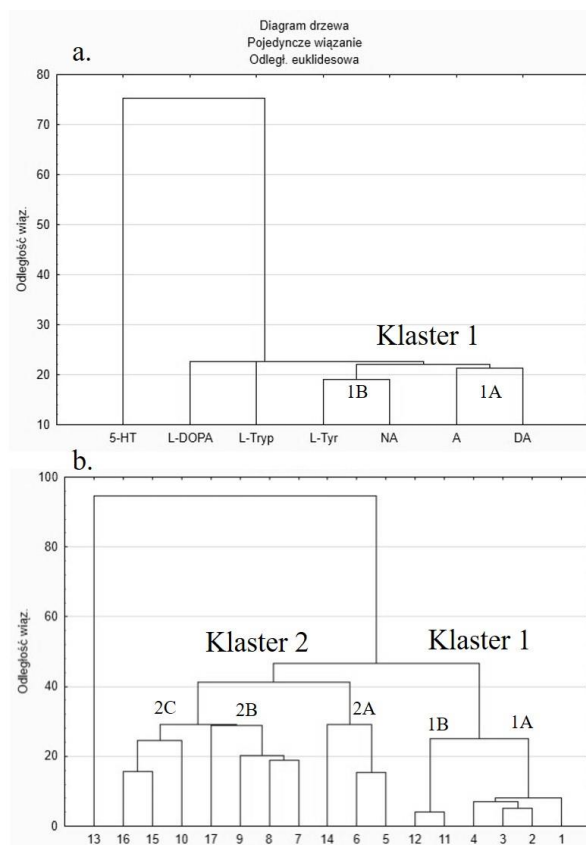
H1. N. Miękus, P. Kowalski, I. Olędzka, A. Plenis, E. Bień, A. Miękus, M. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek, Determination of urinary biogenic amines' biomarker profile in neuroblastoma and pheochromocytoma patients by MEKC method with preceding dispersive liquid-liquid microextraction, **Journal of Chromatography B**, 2016; 1036-1037, 114-123.

H2. N. Miękus, I. Olędzka, P. Kowalski, P. Miękus, T. Bączek, Practical application of biogenic amine profiles for the diagnosis of patients with ischemic stroke, **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, 2018, 27(4), 945-950.

Celem badań opisanych w pracach **H1** oraz **H2** było zaproponowanie rozszerzenia biochemicznej oceny stanu patofizjologicznego organizmu u pacjentów z NET [**H1**] lub po przebytych udarze [**H2**] o inne związki z grupy amin biogennych (nie tylko ich kwaśne metabolity, ale również zasadowe indolo- i katecholaminy), co mogłoby przyczynić się do poprawy czułości i specyficzności testów diagnostycznych, jak również wspomóc monitorowanie przebiegu choroby dla tych pacjentów. Istotnym elementem badań było opracowanie takiej strategii analitycznej, która pozwoliłaby zapewnić stabilność analitów w

próbce moczu (ze względu na ich szybki rozkład pod wpływem temperatury, światła i związków utleniających), a następnie ich wydajną ekstrakcję i wzbogacenie analitów w materiale biologicznym. Ważnym czynnikiem było również usunięcie związków balastowych, mogących zakłócać sygnały zarejestrowane przez detektor spektrofotometryczny dla wytypowanych związków. Dodatkowo, istotne było pominięcie procesu konwersji chemicznej, która jest zwykle stosowana podczas detekcji amin biogennych z użyciem innych detektorów niż detektor spektrofotometryczny. W pracach **H1** i **H2** optymalizowałam metodę ekstrakcji amin biogennych z moczu pacjentów. Do oceny stopnia wzbogacenia analitów (współczynnika wzmocnienia – EF) w próbce zastosowałam jeden z popularnych sposobów oceny wzmocnienia sygnału (obok porównywania pola powierzchni pod krzywą), czyli porównanie wysokości sygnału analitu oznaczonego z zastosowaniem MEKC-DAD (zoptymalizowanej we wcześniejszych pracach, opisanej na stronie 11 prezentowanego Autoreferatu) poprzedzone ekstrakcją analitów z zastosowaniem jednej z metod (LLE, LPME, SPE) z wysokością sygnału analitu oznaczonego bez wstępnego przygotowania próbki, z zastosowaniem tej samej metody MEKC-DAD. Jednoczesna izolacja z próbki moczu siedmiu analitów (biomarkerów) stanowiła duże wyzwanie analityczne, ze względu na różnice właściwości fizykochemicznych poszczególnych analitów należących do badanego panelu. Ponadto, należy zwrócić uwagę na fakt, iż badane anality występują w realnych próbkach w różnych poziomach stężeń fizjologicznych i patofizjologicznych i są wrażliwe na światło oraz temperaturę [42]. Ostateczna decyzja o wyborze moczu pacjentów jako próbki do badań w pracach **H1** oraz **H2** podyktowana była faktem, że aminy biogenne charakteryzują się dłuższym biologicznym okresem półtrwania w moczu niż we krwi, co gwarantuje bardziej wiarygodną analizę jakościową i ilościową oraz tym, że próbka moczu może być pobrana w sposób bezinwazyjny, dzięki czemu jej pobranie jest bardziej akceptowalne przez pacjentów [43]. W badaniach uwzględniono także wpływ na wynik analiz czynników zewnętrznych takich jak: dieta pacjenta (przed pobraniem próbki do badań niezbędne jest 3-dniowe wykluczenie z diety wielu składników bogatych w tryptofan i tyrozynę), choroby towarzyszące, jak również stosowana farmakoterapia oraz zabiegi medyczne. Aby zapobiec rozkładowi amin biogennych, do próbek moczu zebranych od pacjentów dodawałam kwas solny (100 µl 6 M HCl na każde 10 ml moczu), a następnie próbka w ciemnym pojemniku była transportowana w temperaturze -20°C do laboratorium analitycznego oraz przechowywana w temperaturze -80°C do czasu analizy. Takie postępowanie efektywniej chroniło anality przed rozkładem niż – testowany również –

dodatek popularnych związków przeciwutleniających (witamina C lub wersenian disodowy). Jak wcześniej wspominałam, poważnym ograniczeniem metod elektromigracyjnych jest stosunkowo niska wykrywalność związków z porównaniu do LC, które może uniemożliwiać wyznaczenia fizjologicznych i patologicznych poziomów stężeń tych analitów w realnych próbach klinicznych. Z tego powodu, w celu izolacji i zatężenia analitów w próbkach moczu, testowałam różne strategie oparte zarówno o techniki ekstrakcji LLE, LPME jak i SPE [H1]. Procedury te poprzedzone były etapem strącania białek z moczu z zastosowaniem zimnego acetonu (130 μ l). Jak wykazały przeprowadzone eksperymenty, strącanie białek, nawet z tak ubogiej w białka matrycy jak mocz, jest nieodzownym etapem dla zwiększenia czułości i specyficzności zastosowanej procedury analitycznej, a uzyskane wyniki były zgodne z danymi literaturowymi [6,44]. Po etapie odbiałczania, próbki poddałam ekstrakcji z zastosowaniem czterech różnych procedur opartych o LLE, pięciu procedur opartych o DLLME oraz ośmiu procedur opartych o SPE. Aby właściwie zinterpretować uzyskane wyniki badań, dla uzyskanego zbioru danych eksperymentalnych została wykonana hierarchiczna analiza skupień (ang. *hierarchical cluster analysis*, HCA). HCA należy do metod wielowymiarowych [45], a opiera się na grupowaniu obiektów i zmiennych w klasteru generowane na podstawie podobieństw i różnic pomiędzy danymi. Zatem obiekty bądź zmienne włączone do tego samego klasteru wykazują wysokie podobieństwo, a wyznaczona odległość pomiędzy klasterami obrazuje skalę zróżnicowania pomiędzy danymi zgromadzonymi w tych klasterach. Graficzną prezentację wyników analiz LLE, DLLME i SPE przeprowadzonych w trakcie realizacji badań opisanych w [H1], a uzyskanych za pomocą HCA ilustruje Rycina 3.



Rycina 3. Dendrogramy uzyskane dla obiektów (a) oraz zmiennych (b) dzięki analizie chemometrycznej efektów wzmocnienia sygnałów badanych analitów z zastosowaniem 17 różnych strategii ekstrakcyjnych.

Legenda: anality – tak jak na Rycinie 2; pozostałe: ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE); ekstrakcja ciecz-ciało stałe (SPE), dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz (DLLME) wraz z odczynnikami stanowiącym fazę organiczną (LLE), roztwór do elucji (SPE) oraz roztwory dyspergujący i ekstrahujący (DLLME): 1 – LLE-n-heksan, 2 – LLE-dichlorometan, 3 – LLE-eter dietylowy, 4 – LLE-octan etylu: n-heksan (8:2, *v/v*), 5 – SPE SCX – 1% roztwór metanolowy wodorotlenku amonu, 6 – SPE SCX – 2,5% roztwór metanolowy wodorotlenku amonu. 7 – SPE SCX-2% roztwór metanolowy kwasu octowego; 8 – SPE SCX-metanol; 9 – SPE HLB-1% roztwór metanolowy wodorotlenku amonu; 10 – SPE HLB-2,5% roztwór metanolowy wodorotlenku amonu; 11 – SPE HLB-2% roztwór metanolowy kwasu octowego; 12 – SPE HLB-metanol; 13 – DLLME-aceton:dichlorometan; 14 – DLLME-aceton:chloroform; 15 – DLLME-acetonitryl:dichlorometan; 16 – DLLME-acetonitryl-chloroform; 17 – DLLME-aceton:dichlorometan (dodatkowo hydroliza enzymatyczna) (na podstawie **H1**).

W strategiach opartych o ekstrakcję LLE testowałam odczynniki o różnej mocy elucyjnej, takie jak: n-heksan, dichlorometan, octan etylu i eter dietylowy, ale żadna z tych procedur nie była odpowiednia do jednoczesnej izolacji siedmiu analitów. Udało się jedynie uzyskać efektywną ekstrakcję tylko 5-HT (EF w zakresie od 0,2 do 0,4), której struktura chemiczna (indolowa) odbiega od struktury pozostałych oznaczanych związków katecholowych (A, NA, DA, L-DOPA, L-Tyr).

Dane literaturowe wskazywały ponadto, że w przypadku ekstrakcji amin biogennych z matryc biologicznych z użyciem SPE stosowano kolumnienki ekstrakcyjne o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych [46,47]. Jednakże w badaniach opisanych w [**H1**] skupiałam się na użyciu kolumn polimerowych, działających na zasadzie równowagi

hydrofilowo-lipofilowej (ang. *hydrophilic-lipophilic balance*, HLB), a także kolumn o właściwościach wymiennicy kationowych (ang. *strong cation exchange*, SCX), gdyż oba typy wypełnień są w stanie zaadsorbować analizowane cząsteczki z polarnych matryc. Aby ocenić efekt rozpuszczalnika ekstrakcyjnego na wydajność procesów SPE, wytypowałam różnorodne rozpuszczalniki organiczne z/lub bez dodatku modyfikatorów nieorganicznych, bądź organicznych. Zastosowałam 2,5% metanолоwый roztwór wodorotlenku amonu (v/v), 2% roztwór kwasu octowego w metanolu (v/v) oraz czysty metanol. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że metanol z dodatkiem wodorotlenku amonu jako odczynnik ekstrahujący dla kolumn SCX i HLB zwiększyły efektywność izolacji wybranych związków względem tych odnotowanych po użyciu metod LLE. Potwierdziły to wyższe wartości EF, które mieściły się w przedziale od 0,2 do 0,7, ale nadal wydajność ekstrakcji nie była zadawalająca. Biorąc pod uwagę dane chemometryczne, większość procedur SPE uplasowała się w klasterze 2 (Rycina 3b). Ostatnim testowanym wariantem ekstrakcyjnym opisanym w pracy **H1** było podejście oparte o technikę DLLME. Jest to technika, która pozwala na uzyskanie wysokiego odzysku i wysokich współczynników wzbogacenia, dzięki możliwości zastosowania niskich objętości roztworu do ekstrakcji. Odczynnik ekstrahujący zwykle ma wyższą gęstość niż gęstość wody i powinien być tak dobrany, by umożliwić selektywną ekstrakcję analitów. Natomiast dodatek odczynnika dyspergującego wpływa na tworzenie się mikro kropeł ekstrahenta w wodzie, przez co wzrasta powierzchnia kontaktu między ekstrahentem a próbką wodną. Od jego objętości zależy stopień dyspersji, a więc również pośrednio wydajność ekstrakcji. Istnieje niewielka gama odczynników, które mogłyby służyć jako dyspergujące (np. aceton, acetonitryl, etanol lub metanol) i ekstrahujące (chloroform, dichlorometan). W pracy **H1** jako odczynników dyspergujących używałam acetonu lub acetonitrylu, zaś jako odczynników do ekstrakcji: dichlorometanu i chloroformu. Zastosowanie połączenia acetonu, jako odczynnika dyspergującego (i dodatkowo umożliwiającego strącenie białek) i 500 µl dichlorometanu jako odczynnika ekstrahującego, umożliwiło znaczącą redukcję rozpuszczalników niezbędnych do przeprowadzenia tego procesu. Metoda DLLME tak zoptymalizowana, umożliwiła uzyskanie wartości EF dla analitów w zakresie od 0,92 do 1,1, a po poddaniu analizie chemometrycznej, ułokowana została na dendrogramie w dużej odległości od metod z klasterów 1 i 2. Zatem, analiza chemometryczna potwierdziła dużo wyższą efektywność metody DLLME względem wcześniej omawianych strategii LLE i SPE, jak również względem innych faz ekstrahujących i dyspergujących użytych w trakcie optymalizacji tej techniki. Ostatecznie, opracowana

metoda DLLME-MEKC-DAD została poddana walidacji, a uzyskane dane potwierdziły, że spełniła wszystkie wymogi stawiane metodom analitycznym. Przykładowo, wyniki opisujące wartości odzysków wynosiły odpowiednio: 95,3 ($\pm 3,1$) dla DA, 108,3 ($\pm 4,2$) dla A, 96,3 ($\pm 1,2$) dla NA, 93,7 ($\pm 2,8$) dla L-Tryp, 92,5 ($\pm 1,4$) dla L-Tyr, 105,6 ($\pm 3,3$) dla 5-HT, oraz 92,8% ($\pm 5,5$) dla L-DOPA, a granica wykrywalności i oznaczalności została obniżona do poziomu odpowiednio 0.15 $\mu\text{g/ml}$ i 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

Zoptymalizowana metoda została zastosowana podczas pilotażowej analizy biomarkerów z próbek moczu 6 pacjentów onkologicznych. U pacjenta 1, u którego zdiagnozowano *neuroblastoma* w IV stadium zaawansowania, który przeszedł 5 cykli intensywnej chemioterapii i który był w fazie częściowej remisji, podczas pobierania próbki moczu oznaczono podwyższone stężenia A, NA oraz 5-HT (odpowiednio: 4,6, 2,8, 280-krotnie), podczas gdy stężenie DA było obniżone 4,4-krotnie w porównaniu z próbkami kontrolnymi (od zdrowych osób). Założono, że znacząco podwyższony poziom 5-HT mógł wynikać z zastosowanej terapii farmakologicznej, a wartości stężeń pozostałych amin biogennych stanowiły podstawę dla wskazania czynnika prognostycznego o cofnięciu się rozwoju nowotworu. Ostatecznie pacjent ten osiągnął całkowitą remisję choroby. U pacjentów 2 i 3 (niepoddanych chemioterapii) również stwierdzono wyższy poziom 5-HT; w pierwszym przypadku poziom ten mógł jedynie wynikać z wydzielania tej aminy przez komórki guza. W drugim zaś, przeprowadzono u pacjenta całkowitą resekcję guza, a co za tym idzie, mogło zostać w ten sposób spowodowane wydzielanie 5-HT do krążenia. Dla pozostałych uczestników badania (4-6) poziomy 5-HT były nieznacznie różne od grupy kontrolnej. Pacjenci ci dawno temu przeszli leczenie onkologiczne (chemioterapię lub interwencję chirurgiczną). U pacjentów 3 i 6, u których zdiagnozowano guzy chromochłonne nadnerczy, spodziewano się uzyskać wyższe stężenie katecholamin, szczególnie A i NA, co zwykle jest traktowane jako marker tych nowotworów. Niemniej tylko dla pacjenta 6 uzyskano 20-krotnie wyższy poziom A, w porównaniu z grupą kontrolną. Jednakże, dla pacjenta 6, jak i pacjenta 3, wykazano podwyższone stężenie L-DOPA, co mogło wskazywać na wzrost złośliwości guza u tych pacjentów. Ponad trzykrotnie podwyższony poziom L-DOPY obserwowano również u pacjenta 2 i 5. W pierwszym przypadku mogło mieć to związek z aktywnym, związanym ze złośliwą chorobą nowotworową wydzielaniem tego markera, podczas gdy u pacjenta 5 wysokie wartości L-DOPA prawdopodobnie wynikały z niewystarczającego przestrzegania diety przed dobową zbiórką moczu u matki dziecka, jako że dziecko było w czasie zbiórki częściowo karmione piersią. U tych pacjentów poziomy A i

NA nie wykazywały znaczących statystycznie różnic w porównaniu z grupą kontrolną. Przeprowadzone analizy wskazały, że dopiero jednoczesne oznaczanie A, NA i L-DOPA jest bardziej wiarygodne, dla celów diagnostycznych niż oznaczanie pojedynczych biomarkerów tj. A, NA lub L-DOPA. Z drugiej strony, ze względu na wpływ leczenia, diety lub zabiegów operacyjnych na stężenie 5-HT, ta amina nie powinna być stosowana jako biomarker dla poddanych analizie guzów NET u dzieci.

W kolejnym etapie [H2], postanowiłam przeprowadzić pilotażowe analizy stężeń DA, A, NA, 5-HT, L-DOPA, L-Tyr i L-Tryp w moczu pacjentów, u których wystąpił udar krwotoczny (1 pacjent) lub niedokrwienny (9 pacjentów). Doniesienia literaturowe wskazują, że istnieje – wciąż nie w pełni zbadany – związek między udarem i spowodowanymi nim zaburzeniami w głównych szlakach neuroprzekaźnikowych, takich jak dopaminergiczny, serotoninergeryczny czy adrenergiczny [48]. Podczas ekstrakcji analitów z próbek moczu od pacjentów zastosowałam metodę ekstrakcji DLLME (dla amin biogennych i ich prekursorów), a do zarejestrowania sygnałów tych badanych związków użyłam zoptymalizowanej wcześniej metody MEKC-DAD [21]. U pacjentów, u których włączono terapię β -blokerami, oznaczono – zgodnie z przewidywaniami – znaczący spadek poziomu A (od 2-u do 9-krotnego) w porównaniu z grupą kontrolną. Dla pacjenta z udarem krwotocznym zaobserwować można było znaczący wzrost (6-krotny) stężenia A w moczu w porównaniu do stężeń A dla grupy kontrolnej. Również dla pacjentów z udarem niedokrwiennym lewej półkuli mózgu, których próbki moczu pobrane zostały nie później niż po 3 dniach od wystąpienia udaru i którzy nie przyjmowali leków z grupy β -blokerów, oznaczono podwyższony poziom A w odniesieniu do poziomów rejestrowanych dla zdrowych osób. Dodatkowo, dla pacjentów 9 i 10 (z udarem niedokrwiennym prawej półkuli mózgu) wartości stężenia L-Tryp były 10-krotnie niższe niż dla grupy kontrolnej, osobników zdrowych. U tych pacjentów spadek stężenia tego aminokwasu związany był z wystąpieniem zakażenia bakteryjnego, który to stan predysponuje do szybszej degradacji L-Tryp. Ponadto, dla pacjentów 2 i 6 oznaczono niższy poziom DA; w tym wypadku związane to było z terapią zaleconą tym pacjentom: przyjmowali oni bowiem furosemid, który mógł doprowadzić do zmniejszenia stężenia DA. Wyniki pilotażowych badań potwierdziły, że dzięki oznaczaniu wybranych związków z grupy biomarkerów, możliwa jest bardziej rzetelna diagnostyka i monitorowanie leczenia pacjentów po udarze mózgu. To pozwala zapobiegać występowaniu poważnych powikłań sercowo-naczyniowych oraz ze strony ośrodkowego układu nerwowego, które są związane z długo utrzymującymi się patologicznymi stężeniami

neuroprzebiegów z grupy amin biogennych oraz aminokwasów prekursorowych w organizmie.

Badania opisane w pracach **H1** oraz **H2** pozwoliły porównać efektywność metod izolacji i prekoncentracji analitów w próbkach moczu opartych na technikach LLE, DLLME oraz SPE, a następnie wytypować najbardziej optymalną procedurę DLLME do przygotowania prób przed analizą MEKC-DAD. Wybrana metoda została poddana walidacji i zastosowana podczas analizy panelu potencjalnych biomarkerów z grupy amin biogennych u pacjentów ze zdiagnozowanymi, wytypowanymi jednostkami chorobowymi. Efektem badań pilotażowych próbek moczu pacjentów z guzami NET i po udarze było zaproponowanie wybranych analitów jako dodatkowych biologicznych wskaźników stanu patofizjologicznego organizmu.

4.3.4. Mikroekstrakcja do fazy stałej i cieczy jonowe podczas izolacji amin biogennych z moczu

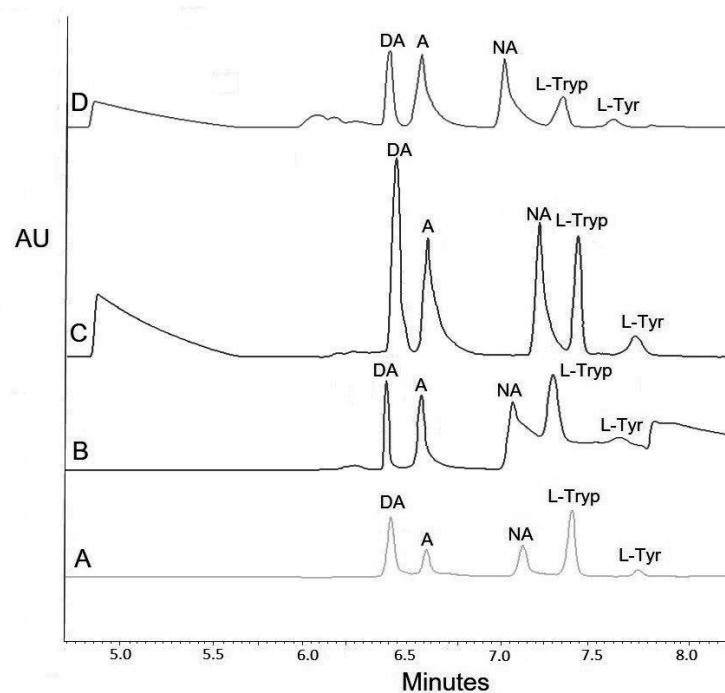
H3. N. Miękus, I. Olędzka, N. Kossakowska, A. Plenis, P. Kowalski, A. Prahl, T. Bączek. Ionic liquids as signal amplifiers for the simultaneous extraction of several neurotransmitters determined by micellar electrokinetic chromatography, *Talanta*, **2018**, 186, 119-123.

H4. N. Miękus*, I. Olędzka, D. Harshkova, I. Liakh, A. Plenis, P. Kowalski, T. Bączek. Comparison of three extraction approaches for the isolation of neurotransmitters from rat brain samples, *International Journal of Molecular Sciences*, **2018**, 19, 1-11.

Należy podkreślić systematyczny wzrost znaczenia SPME w badaniach biomedycznych podczas izolacji i prekoncentracji amin biogennych z moczu. Z drugiej strony, istnieje znacznie uboższa niż w przypadku SPE gama ziół SPME dostępnych komercyjnie na rynku i możliwych do zastosowania podczas ekstrakcji tych ważnych biologicznie związków oraz ich aminokwasów prekursorowych. Skłoniło mnie to do opracowania nowych rozwiązań analitycznych opartych na SPME. Powyższa technika działa na zasadzie podobnej do SPE, ale cechuje się niższym zużyciem odczynników, dzięki czemu wpisuje się doskonale w postulaty „zielonej chemii”. Sorbent naniesiony jest w SPME na cienkie włókna, a nie upakowany w kolumnę, jak w przypadku SPE, na które zaadsorbowane zostają anality z próbki. Następnie, dzięki zastosowaniu odpowiedniego odczynnika do desorpcji, związki badane zostają uwolnione z włókna do roztworu desorbującego; następuje ich ekstrakcja. W moich badaniach, zastosowałam bardzo wybiórcze dodatki do roztworu do desorpcji, jakimi są cieczy jonowe (ang. *ionic liquids*, ILs). ILs, od czasu ich opracowania w 1914 roku, zyskały na znaczeniu. Jedną z ich szczególnie istotnych zalet jest zdolność do zwiększania rozpuszczalności cząsteczek różniących się strukturą chemiczną i właściwościami fizykochemicznymi, jak również możliwość wielokierunkowej modyfikacji

właściwości fizykochemicznych ILs, poprzez odpowiedni dobór anionu (organicznego lub nieorganicznego) i kationu organicznego budującego daną ciecz (to one definiują klasę IL). Z tego powodu ciecze jonowe zyskały miano „rozpuszczalników projektowalnych” [49]. Zmiana długości łańcucha alifatycznego, grup funkcyjnych, rozmiaru kationu lub typu anionu wpływa na lepkość, ciężar, rozpuszczalność i temperaturę topnienia cieczy, podczas gdy charakter kwasowo-zasadowy zależy od typu anionu. ILs są chętnie używane jako „zielone rozpuszczalniki”, gdyż umożliwiają znaczące ograniczenie skażenia środowiska (stanowią grupę związków generalnie nielotnych, niepalnych, charakteryzujących się doskonałą stabilnością chemiczną i termiczną), w porównaniu z najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami organicznymi. Dodatkowo, ILs mogą być z powodzeniem stosowane w chemii analitycznej. Ich znaczący wkład w bardziej efektywne oczyszczenie próbki z substancji balastowych, ekstrakcji, rozdzielania i oznaczania został wykazany podczas analizy wielu ważnych klinicznie związków, również tych występujących w śladowych ilościach w wielu złożonych matrycach biologicznych [22,50,51]. Mogą być również użyteczne podczas izolacji analitów z zastosowaniem zarówno technik LLE, LPME, jak i SPE oraz SPME. Rozpatrując badaną grupę analitów, można znaleźć doniesienia literaturowe odnośnie do użyteczności cieczy jonowych na różnych etapach opracowanych metodyk analitycznych. Dla przykładu, kompozyt złożony z cieczy jonowej heksafluorofosforanu butylometylopiperidynowego oraz cyklodekstryny zastosowany został do modyfikacji powierzchni elektrod węglowych podczas detekcji DA, A, NA, 5-HT i L-DOPA [52]. Ta modyfikacja umożliwiła zwiększenie czułości metody, jak również umożliwiła oznaczanie A w moczu. Zespół badawczy Seduramana i in. potwierdził wyższą skuteczność procedur opartych na dodatku hydrofobowych, niemieszających się z wodą cieczy jonowych o budowie imidazoliowej, podczas ekstrakcji ciecz-ciecz L-Tryp [53]. Inne badania także potwierdziły zasadność stosowania cieczy jonowych do modyfikacji złożeń SPE. Zhou i współpracownicy (2015) używali nowego złoża ekstrakcyjnego opartego o polimerowe ILs podczas ekstrakcji A, NA, DA z próbek krwi szczurzej [54]. Dzięki kombinacji sposobu pobrania próbki (mikrodializa) z ekstrakcją opartą o SPE z kolumną modyfikowaną cieczą jonową i detekcją elektrochemiczną, uzyskano zadawalającą wydajność ekstrakcji, powtarzalność metody i znaczną redukcję objętości próbki niezbędnej do analizy. W ekstrakcji typu HS-SPME również użyto nowo zsyntetyzowane złoża oparte o ciecze jonowe w celu ekstrakcji analitów polarnych [55].

Biorąc powyższe dane pod uwagę, w eksperymentach opisanych w pracy **H3** zdecydowałam się opracować nową procedurę analityczną związaną z aplikacją ILs w procesie mikroekstrakcji i prekoncentracji SPME amin biogennych z próbek moczu. W dostępnej literaturze brak jest doniesień na temat zastosowania cieczy jonowych jako dodatków do fazy desorbującej aminy biogenne zaadsorbowane na złożach SPME, dlatego obrałam tę analityczną drogę. W pierwszym etapie wytypowałam ciecze jonowe, które ze względu na właściwości fizykochemiczne mogłyby być odpowiednie podczas ekstrakcji amin biogennych z moczu. Powyższe ciecze były oparte o pierścień imidazoliowy, różniące się długością łańcucha bocznego (etylowy lub butylowy) z anionem tetrafluoroborowym lub bistrifluorometanosulfonimidowym. Szczegółowo były to ciecze: tetrafluoroboran 1-butylo-3-metyloimidazoliowy (IL1), tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowy (IL2) oraz bistrifluorometanosulfonimid 1-etylo-3-metyloimidazoliowy (IL3). Wstępne prace związane z optymalizacją metody omówionej w **H3**, wymagały testowania parametrów krytycznych ekstrakcji SPME w odniesieniu do wybranej grupy związków. W następnym etapie testowałam dwa najczęściej używane rodzaje adsorbentów pokrywających blaszki szczotek ekstrakcyjnych SPME. Były to: krzemionka związana z grupami oktadecylowymi (C18) działająca na zasadzie fazy odwróconej oraz polistyrenowo-diwinylbenzenowa (PS-DVB) działająca na zasadzie równowagi hydrofilowo-lipofilowej (odpowiednik złoża HLB w SPE) [56]. Przeprowadzone w pracy **H3** badania wskazały na zasadność stosowania złoża typu PS-DVB, z uwagi na polarność badanych amin biogennych (A, NA, DA) oraz aminokwasów prekursorowych (L-Tryp, L-Tyr). Kolejnym krytycznym parametrem ekstrakcji była długość etapu adsorpcji i desorpcji amin biogennych. Wykazałam, że dla większości badanych analitów równowaga pomiędzy stężeniem w fazie ekstrahującej, a roztworem próbki, została osiągnięta po 90 minutach ekstrakcji. W dalszej części wytypowałam najbardziej odpowiedni odczynnik do elucji. W porównaniu z dichlorometanem, acetonitrylem i acetonem korzystniejsze wyniki uzyskałam przy zastosowaniu metanolu jako eluentu. W następnym kroku zastosowałam innowacyjne podejście z użyciem metanolu wzbogaconego o ILs, jako odczynnika do desorpcji analitów ze złoż PS-DVB SPME. Porównałam zastosowanie trzech ILs (wszystkie w stężeniach 10 ng/ml w metanolu (v/v)) różniących się hydrofobowością, długością łańcucha bocznego albo typem anionu. Analiza elektroferogramów otrzymanych dla próbek amin i aminokwasów po ekstrakcji SPME z użyciem czystego metanolu oraz metanolu wzbogaconego o IL1, IL2 lub IL3, wskazała, że dodatek każdej z cieczy umożliwił wzrost wydajności ekstrakcji wybranych amin biogennych (Rycina 4).



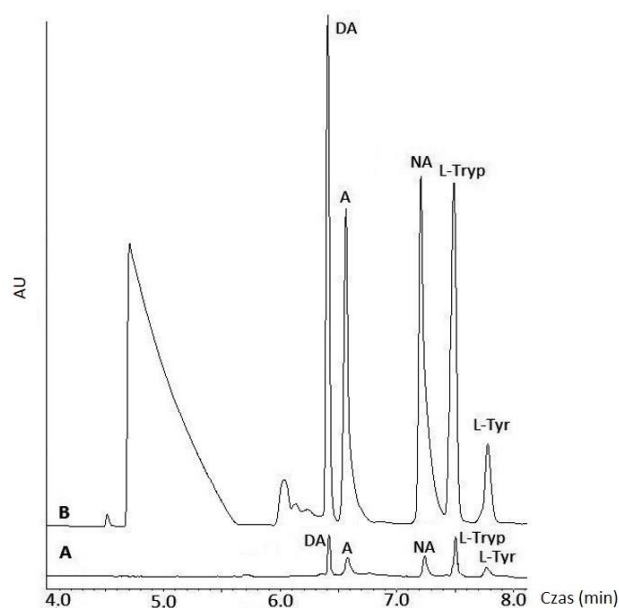
Rycina 4. Porównanie elektroferogramów otrzymanych dla próbek neuroprzekaźników objętych badaniem (każdy z analitów w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$) po ich ekstrakcji z użyciem SPME i różnych odczynników do desorpcji: A) czystego metanolu, B) IL1 w metanolu, C) IL 2 w metanolu, D) IL3 w metanolu (każda IL w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$).

Legenda analitów: jak w przypadku Ryciny 2.

Warunki ekstrakcji: złoża SPME: PS-DVB, czas ekstrakcji i desorpcji: każdy 90 minut, przy zastosowaniu wstrząsania 850 rpm w temperaturze pokojowej, w warunkach zapewniających ochronę próbek przed światłem (na podstawie **H3**).

W wyniku zastosowania IL1 jako dodatku do metanolu, zarejestrowane wysokości pików DA i A były wyższe niż dla ekstrakcji z samym metanolem (odpowiednio: 1,6 i 3 razy wyższe), ale dla pozostałych analitów sygnał pochodzący od cieczy jonowej zaburzał linię podstawową elektroferogramu, co uniemożliwiało prawidłową interpretację wyników. Następnie, zarówno dodatek IL2, jak i IL3 pozwolił na uzyskanie wzrostu wydajności ekstrakcji dla DA, A i NA i L-Tyr (od 1,6 do 5,5 razy), niemniej w przypadku IL3 ekstrakcja L-Tryp uległa pogorszeniu, w porównaniu do ekstrakcji z użyciem samego metanolu. Dzięki przeprowadzonym analizom udowodniłam, że dodatek IL2 i IL3, a więc cieczy z krótkim (etylowym) łańcuchem bocznym w pierścieniu imidazoliowym do metanolu jako fazy desorbującej w SPME, pozwala zwiększyć wydajność ekstrakcji amin biogennych z próbek moczu. Dodatkowo, używane cieczy z anionem tetrafluoroboranowym, ze względu na lepszą rozpuszczalność w roztworach organicznych, okazały się bardziej efektywne od cieczy z anionem o bardziej złożonej budowie (bistrifluorometanosulfonimidowym). Takie zależności odnośnie anionu wykazano we wcześniejszych pracach również dla innych grup związków np. fenoli, alkaloidów czy wodorowęglanów [51]. Ostatecznie, najbardziej hydrofobowa IL2

wykazała najwyższą użyteczność w tego typu analizach. Dodatkowo, oceniłam wpływ dodatku IL2 w stężeniach od 10 do 500 ng/ml do metanolu na wydajność ekstrakcji wszystkich badanych analitów. Wyniki analiz potwierdziły, że optymalne stężenie IL2 w metanolu to 20 ng/ml (Rycina 5), przy którym znacząco poprawiła się wydajność ekstrakcji wszystkich testowanych związków z próbek biologicznych. Na elektroferogramie sygnał pochodzący od cieczy nie interferował z sygnałami analitów, ale modyfikował ich czasy migracji: im wyższe stężenie cieczy w desorbencie, tym większe były przesunięcia czasów migracji. Dodatkowo, wyższe stężenia generowały zakłócenia linii podstawowej elektrolitu podstawowego, a także znacząco zwiększały natężenie prądu, co negatywnie wpływało na żywotność kapilary, jak również powtarzalność wyników. Wynikało to z faktu, że podwyższanie stężenia cieczy w desorbencie, przy zachowanym stałym przykładanym napięciu, powoduje zmniejszenie przepływu elektroosmotycznego w kapilarze. Jest to prawdopodobnie wynik blokowania interakcji grup silanolowych i tworzeniem kompleksów jonowych kationów imidazoliowych z ujemnie naładowanymi grupami na powierzchni kapilary krzemionkowej. Ostatecznie, zastosowanie metanolu wzbogaconego o IL2 (w stężeniu 20 ng/ml) pozwoliło uzyskać wzrost wydajności ekstrakcji dla amin biogennych i aminokwasów prekursorowych od 9-krotnego dla L-Tryp, aż do 21-krotnego dla A. W tym badaniu, współczynniki wzmocnienia (EF) zostały obliczone poprzez porównanie wartości wysokości sygnału analitu uzyskanego po przeprowadzeniu ekstrakcji SPME z metanolem i dodatkiem 20 ng/ml IL2 z wysokością sygnału tego analitu, uzyskanego po przeprowadzeniu ekstrakcji SPME z metanolem. Metoda ta została zgłoszona do opatentowania i uzyskała ochronę patentową na terenie RP (nr zgłoszenia P.422788; tytuł: „Sposób izolacji amin biogennych z moczu”). Obecnie rozpatrywany jest również wniosek o ochronę na terenie Unii Europejskiej.



Rycina 5. Elektroferogram zarejestrowany dla analitów po ich ekstrakcji SPME z zastosowaniem samego metanolu jako desorbenta (A) oraz elektroferogram zarejestrowany dla analitów po ich ekstrakcji SPME z zastosowaniem metanolu z dodatkiem IL2, jako fazy desorbującej (IL2 w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$).
Legenda analitów: jak w przypadku Ryciny 2.
(na podstawie **H3**).

Sprawdzenie efektywności i przydatności nowego podejścia IL-SPME-MEKC-DAD, również dla innego rodzaju próbek biologicznych – tkanki zwierzęcej – było tematem kolejnej pracy [**H4**]. Wynikało to z faktu, że oprócz płynów ustrojowych człowieka, jednym z fundamentalnych źródeł próbek biologicznych dla badań podstawowych, jak również klinicznych, są modele zwierzęce [57]. W podjętych badaniach skupiałam się na aplikacji strategii analitycznej niezbędnej do izolacji i prekoncentracji wybranych amin biogennych (z grupy katecholamin i indoloamin) oraz ich związków prekursorowych oraz metabolitów (HVA, VMA) z mózgu szczurów, która byłaby alternatywą dla powszechnie stosowanych i stosunkowo drogich testów immunoenzymatycznych. Dodatkowo, testy immunoenzymatyczne pozwalają na analizę stężeń tylko jednego biomarkera, a często, jak wcześniej wspominałam, dopiero informacja na temat kilku biomarkerów jest ważna klinicznie. Pod względem analitycznym mózg jest trudną do badania, wysoce skomplikowaną matrycą biologiczną. Związane jest to z faktem, że niemal połowa suchej masy próbki tkanki nerwowej złożona jest z substancji tłuszczowych, takich jak fosfolipidy, sterole i sfingolipidy. Z uwagi na niepolarny charakter estrów fosfatydylowych, długie łańcuchy alkilowe tłuszczy są silnie hydrofobowe i mogą ulegać ekstrakcji razem z biomarkerami małocząsteczkowymi będącymi przedmiotem badań. Dodatkowo, wysoka zawartość soli, cukrów i białek w matrycy próbki, może wpływać na późniejszą detekcję amin biogennych. Dlatego też

procedury opisane w pracy **H4** zakładały przeprowadzenie optymalizacji etapu homogenizacji tkanki na wstępie badań dotyczących wytypowania najodpowiedniejszego protokołu ekstrakcyjnego. Dwa często stosowane do homogenizacji roztwory: 0,1% metanolowy roztwór kwasu mrówkowego (*v/v*) oraz 3% metanolowy roztwór kwasu nadchlorowego (*v/v*) zostały przetestowane. Procedura wykonywana była w ręcznie zaprojektowanej łaźni lodowej i przeprowadzana w miejscu z ograniczonym dostępem światła, w celu stabilizacji analitów w próbkach mózgu ze względu na ich łatwą dekompozycję pod wpływem temperatury i światła. Wykonane eksperymenty wskazały, że metanol z kwasem mrówkowym jest najskuteczniejszym roztworem do homogenizacji, gdyż udało się otrzymać próbkę homogenatu wolną od związków tłuszczowych (również dzięki efektywnemu odwirowaniu homogenatu i pobraniu czystego roztworu z nad osadu do dalszych analiz). Podczas izolacji amin z próbek tkanki nerwowej zastosowałam metodę opracowaną w pracy [**H1**] opartą o DLLME. Wytypowane dla moczu w pracy **H1** warunki, sprawdziły się również w pracy **H3**, podczas izolacji DA, A, NA, 5-HT oraz L-Tyr, niemniej dla L-Tryp nie były optymalne. Ważnym argumentem przemawiającym za dalszą modyfikacją procedury ekstrakcyjnej był fakt, że L-Tryp jako związek amfoteryczny jest pod względem charakteru fizykochemicznego różny od większości poddawanych analizie związków (A, NA, DA, 5-HT). Dlatego też, postanowiłam wprowadzić izolację analitów SPME (z parametrami zoptymalizowanymi w pracy **H3**) jako technikę prekoncentracyjną i ekstrakcyjną. Zastosowałam, podobnie jak w pracy **H4**, technikę SPME z wykorzystaniem złoża PS-DVB, a do fazy desorbującej dodałam ciecz jonową IL2. Na podstawie uzyskanych elektroferogramów wykazałam, że wzbogacenie analitów w próbce z zastosowaniem IL-SPME, pozwala na 1,8-krotny przyrost wartości EF dla DA w porównaniu z wartością uzyskaną po użyciu DLLME, dla A i L-Tyr wartości te były również wyższe (odpowiednio: 1,3 i 1,1). Jedynie dla 5-HT ta metodyka nie pozwoliła na bardziej efektywną ekstrakcję 5-HT względem uzyskanej z zastosowaniem DLLME (0,6). Powyższa procedura IL-SPME pozwoliła wyizolować z matrycy także L-Tryp, co nie było możliwe w przypadku większości stosowanych wcześniej procedur. Ponadto, oczyszczenie matrycy próbki substancji balastowych, było znacznie efektywniejsze podczas stosowania SPME niż DLLME. Ostatecznie, w pracy **H4** wykazałam, że podczas jednoczesnej ekstrakcji wybranych amin biogennych, ich metabolitów i aminokwasów prekursorowych z matrycy, jaką jest tkanka nerwowa, odpowiednią strategią analityczną jest IL-SPME-MEKC-DAD. Metoda ta z powodzeniem stanowić może alternatywę dla innych metod, które często wymagają zastosowania konwersji chemicznej analitów, droższych i mniej dostępnych

detektorów (LIF, MS), większej ilości toksycznych odczynników i objętości tkanki, z której wykonywana jest analiza (uzyskałam w pracy ekstrakcję amin z 200 mg tkanki). Dodatkowo, uzyskane wzbogacenie *off line* analitów w materiale biologicznym, przy udziale selektywnych rozpuszczalników, jakimi są ciecze jonowe, pozwala na rozszerzenie aplikacji metod mikroekstrakcyjnych angażujących „rozpuszczalniki projektowalne” w nowe obszary nauk podstawowych i w praktyce klinicznej, które są związane z oznaczaniem poziomu stężenia amin biogennych w tkankach zwierzęcych.

4.3.5. Ekstrakcja i wzbogacanie metabolitów amin biogennych w moczu

H5. N. Miękus*, A. Plenis, M. Rudnicka, N. Kossakowska, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Extraction and preconcentration of compounds from the L-tyrosine metabolic pathway prior to their micellar electrokinetic chromatography separation, *Journal of Chromatography A*, 2020, 1-9.

Wyniki badań uzyskane podczas analizy amin biogennych w moczu [**H1-H3**] oraz w tkance mózgowej [**H4**] zainspirowały mnie do rozszerzenia panelu analitów o inne, ważne metabolity szlaku przemian L-Tyr. Praca **H5** jest kolejnym krokiem w poszerzeniu zakresu zastosowania opracowywanych strategii przedstawionych w pracach **H1-H4**. Analizie poddałam istotne diagnostycznie biomarkery małowcząsteczkowe: glikol dihydroksyfenylowy (ang. *dihydroxyphenyl glycol*, DHPG), glikol 3-metoksy-4-hydroksyfenylowy (ang. *3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol*, MHPG), VMA, HVA, NM, M i DOPAC. Ostatnie badania wskazują bowiem, że oznaczanie również metanefryn (M, NM) w próbkach krwi i moczu pacjentów, ma wyższą czułość diagnostyczną NBL i guza chromochłonnego nadnerczy, niż oznaczanie katecholamin lub kwasów HVA i VMA [58,59]. Natomiast oznaczanie MHPG, który jest jednym z metabolitów A oraz M, a także DHPG – jednego z metabolitów NA, pozwala na uzyskanie dodatkowych, pomocnych diagnostycznie i terapeutycznie danych odnośnie funkcjonowania enzymów biorących udział w przemianach metabolicznych pochodnych L-Tyr (monoaminooksydazy i katecholo-O-metylotransferazy). Szerokie spektrum zastosowań każdej z wymienionych par (grup) biomarkerów, skłoniło mnie do zaproponowania nowych strategii ekstrakcyjnych i prekoncentracyjnych podczas jednoczesnej analizy tak dużego, różniącego się fizykochemicznie zbioru biomarkerów. Wybrałam, spośród już testowanych przeze mnie w toku prac **H1-H4**, 25 różnych podejść ekstrakcyjnych, które wykonałam doświadczalnie i oceniłam w pracy **H5**. Zweryfikowałam przydatność metod opartych o DLLME (1 metoda), SPE (13 metod) oraz SPME (11 metod) dla izolacji metabolitów amin biogennych z próbek moczu. Dla porównywania wydajności ekstrakcji poszczególnych procedur użyłam elektroferogramów uzyskanych ze

zoptymalizowanej dla tej grupy analitów metody MEKC-DAD (kapilara krzemionkowa 75 μm (50/60,2 cm), detekcja przy długości fali 200 nm, nastrzyk hydrodynamiczny (15 s, 0,5 psi), napięcie 22 kV, normalna polaryzacja, bufor złożony z 5 mM tetraboranu sodu, 150 mM kwasu bornego, 50 mM SDS oraz 15% (v/v) metanolu (szacunkowe pH 7,3)), na podstawie której wyznaczyłam wartości współczynnika wzmocnienia (EF) dla poszczególnych analitów. Ponadto, wartości EF poddałam analizie chemometrycznej z użyciem HCA. Analiza HCA zaszeregowała metodę DLLME jako mało efektywna do jednoczesnej izolacji wszystkich analitów z próbek moczu (EF w zakresie od 0,1 do 0,8). W przypadku metod opartych o SPE, biorąc pod uwagę fizykochemiczne właściwości grupy analitów, testowałam złoża HLB, cyjanowe (CN) oraz C18. W toku badań wytypowałam następujące zależności pomiędzy rodzajem wypełnienia kolumnek SPE, a efektywnością odczynników ekstrahujących w odniesieniu do wszystkich analitów:

HLB-SPE: metanol > dichlorometan > aceton > heksan

C18-SPE: metanol > metanol:acetonitryl (1:1, v/v) > aceton > heksan > dichlorometan

CN-SPE: aceton > metanol > heksan > dichlorometan

Wyniki badań wykazały, że dla procedur SPE i metanolu jako eluentu, najbardziej korzystnym typem złoża do izolacji analitów jest niepolarne złoże C18, następnie HLB, zaś CN wykazało słabą retencję analitów. W przypadku C18 mamy do czynienia głównie z oddziaływaniami hydrofobowymi z analitami, co dla badanych związków okazało się kluczowe. Złoża CN cechują się niższą hydrofobowością niż C18, zaś oddziaływania między analitami a wypełnieniami typu HLB polegają na bardziej złożonych hydrofilowo-hydrofobowych zależnościach. Dodatkowo, duży wpływ na oddziaływania mają roztwory do kondycjonowania oraz elucji. Dla złoża CN najlepszym eluentem okazał się aceton, szczególnie podczas izolacji DHPG (EF 1,6), niemniej zważywszy na cel główny założony w pracy **H5**, czyli jednoczesna izolacja wszystkich badanych związków, najbardziej obiecująca okazała się metoda oparta o złoże C18 i metanol jako eluent. Tylko dla M, wynik nie był zadowalający i dopiero zmiana eluentu na mieszaninę metanolu z acetonitrylem (50/50, v/v), pozwoliła zwiększyć prekoncentrację M w próbce moczu (EF 1,7). Wyniki uzyskane przy użyciu złoża typu HLB, wskazują, że również metanol jest najlepszym eluentem dla badanych związków (EF od 0,2 do 1,8), niemniej wydajności ekstrakcji były niższe niż dla C18-SPE (EF od 0,6 do 5,6). Następnie, zastosowanie SPME w konfiguracji PS-DVB-SPME oraz metanolu jako odczynnika desorbującego metabolity katecholamin z próbek moczu umożliwiło podwyższenie EF w zakresie od 1,8 dla VMA do 5,2 dla M. Najwyższy wzrost

parametru EF dla M otrzymałam podczas zastosowania cieczy jonowej bistrifluorometanosulfonimidu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego (IL3) (EF 6,2).

Podsumowując, istnieje zależność pomiędzy rodzajem wypełnienia SPME a efektywnością odczynników ekstrahujących, gdy pod uwagę bierzemy jednoczesną analizę wszystkich analitów:

C18-SPME: metanol:acetonitryl (1:1, v/v) > metanol > aceton > dichlorometan,

PS-DVB-SPME: metanol > metanol z dodatkiem IL3 > metanol z dodatkiem IL2 > metanol z dodatkiem IL1 > aceton > metanol:acetonitryl (1:1, v/v) > dichlorometan

Ponadto, badania wskazały, że zarówno typ złoża SPE/SPME, jak i rodzaj odczynników do elucji (SPE), jak i desorpcji (SPME) odpowiadają za ostateczny wynik analiz. Istotność tych parametrów w procesie ekstrakcyjnym potwierdziła HCA, która ostatecznie wskazała, że C18-SPE z metanolem jako eluentem jest najbardziej efektywną procedurą do jednoczesnej ekstrakcji DHPG, HVA, DOPAC i NM, podczas gdy PS-DVB-SPME z metanolem jako odczynnikiem desorbującym, to najlepsza metoda podczas izolacji M i MHPG. Dodatkowo, dodatek cieczy jonowej (IL3) do roztworu desorbującego pozwala zwiększyć efekt wzbogacenia M w próbce moczu. Niemniej dodatek trzech testowanych cieczy jonowych, powinien być unikany podczas izolacji VMA, MHPG, HVA i DOPAC.

4.3.6. Metody prekoncentracyjne wybranych analitów w złożonych matrycach biologicznych

H6. G. Harvas, A. Guttman, N. Miękus, T. Bączek, S. Jeong, D.S. Chung, V. Pätöprstý, M. Masár, M. Hutta, V. Datinská, F. Foret, Practical sample pretreatment techniques coupled with capillary electrophoresis for real samples in complex matrices, **Trends in Analytical Chemistry**, 122, 2020, 1-9.

W pracach omawianych w przedstawionym cyklu, oprócz opracowywania strategii izolacji i wzbogacania *off line* analitów w próbkach, oceniłam podejścia prekoncentracyjne *on line*. Najprostsze z nich – spiętrzanie – zostało z powodzeniem stosowane we wszystkich pracach wchodzących w skład przedstawionego cyklu [H1-H5]. Metoda ta polega na przygotowaniu próbki zawierającej anality, przed ich rozdzielaniem metodą CE, w buforze o niskim przewodnictwie. Najczęściej osiąga się to przez 100- lub 1000- krotne rozcieńczenie BGE, oraz przyłożenie wysokiego napięcia. W takich warunkach anality znajdujące się w strefie próbki o niskim przewodnictwie migrują szybciej do momentu osiągnięcia granicy buforu podstawowego, gdzie przewodnictwo jest wyższe. Zatem na granicy strefy próbki i

BGE następuje spiętrzenie analitów. Dodatkowo, zaprogramowałam w każdej z metod CE użytych w analizie próbek w pracach **H1-H5**, etap wprowadzenia do kapilary (bezpośrednio przed wprowadzeniem do kapilary próbki) niewielkiej strefy wodnej (o niskiej przewodności), dzięki czemu uzyskałam dodatkowe wzmocnienie sygnału. Również, włączenie podejść prekoncentracji *on line* (takich jak ekstrakcja do jednej kropli rozpuszczalnika, ang. *single drop microextraction*, SDME) umożliwiającą uzyskanie ponad 100-krotnego wzrostu wartości LOD. Ten model sposobu prekoncentracji testowałam we współpracy z międzynarodowym zespołem biorącym udział w programie V4-Korea Joint Research realizowanym – ze strony polskiej – w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GUMed (kierownik projektu: prof. dr hab. Tomasz Bączek, akronim projektu: V4-Korea/4/2018). W ramach tego projektu analizowałam także różnorodne podejścia analityczne zmierzających do wzbogacenia analitów w różnorodnych matrycach, szczególnie matrycach biologicznych, z zastosowaniem technik prekoncentracji *on line*, *in line* oraz *off line*, przed ich dalszą analizą CE. Zebranie w formie pracy przeglądowej **H6** strategiczne osiągnięcia pozwalające na zwiększenie efektywności analizy związków występujących na niskich poziomach w matrycach o złożonym składzie, stanowiło ważne podsumowanie moich badań składających się na cykl habilitacyjny. Stanowi również cenne źródło usystematyzowanej wiedzy dla osób pracujących z technikami elektromigracyjnymi, których celem jest analiza ważnych klinicznie cząsteczek w skomplikowanych matrycach biologicznych. Dodatkowo, opisywana w pracy **H6** technika SDME, która z powodzeniem może być połączona *on line* z CE, stanowić będzie główny cel badań wykonywanych przeze mnie w następnym etapie działalności naukowej. SDME to technika, którą z powodzeniem używałam podczas izolacji i prekoncentracji wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych z matryc biologicznych podczas stażu naukowego wykonywanego w Katedrze Chemii, w Seulu, pod kierownictwem profesora Doo Soo Chunga. Dzięki metodzie SDME możliwe jest przeprowadzanie ekstrakcji i oczyszczania próbki z soli w trybie *on line*, dzięki czemu zyskujemy znaczące przyspieszenie procesu przygotowania próbki do analizy, zmniejszenie nakładów finansowych, a także możliwość znaczącej redukcji (do wartości nanolitrowych) objętości próbki oraz odczynników niezbędnych do przeprowadzenia izolacji i analizy [60,61]. Praca **H6** uwzględniała również opis ważnych metod, które umożliwiają prekoncentrację analitów w kapilarze podczas rozdzielania elektroforetycznego i po nastrzyku próbki do kapilary. Szczególną uwagę zwróciłam na techniki, które mogą być stosowane podczas analiz próbek o wysokiej przewodności elektrycznej (np. matryc biologicznych)

poprzez ogniskowanie zawartych w nich analitów w wyniku rozpadu miceli (ang. *analyte focusing by micelle collapse*, AFMC), spiętrzanie analitów na drodze przeniesienia z miceli do rozpuszczalnika organicznego (ang. *micelle to solvent stacking*, MSS), czy też dynamiczne krzyżowanie pH (ang. *dynamic pH junction*). Techniki te pozwalają uzyskać nawet 1000-krotnego EF dla badanych związków. Techniki te z powodzeniem mogą być sprzężone z prekoncentracją *off line*, dzięki czemu uzyskać można zwielokrotnienie EF dla wybranej grupy analitów, które analizowałam w pracach **H1-H5**.

4.4. Podsumowanie wyników badań stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawionej do oceny rozprawy habilitacyjnej

Celem przedstawionych badań, stanowiących przedmiot mojej rozprawy habilitacyjnej, było opracowanie nowych podejść analitycznych pomocnych w izolacji i analizie ilościowej wybranych, ważnych biologicznie związków z grupy amin biogennych, ich metabolitów i aminokwasów prekursorowych w próbkach biologicznych różnorodnego pochodzenia. Zastosowałam zoptymalizowane metody podczas analizy biomarkerów małowcząsteczkowych w próbkach biologicznych (ludzki mocz, tkanki szczerzego mózgu), podkreślając istotność jednoczesnej analizy biomarkerów w kontekście uzyskania bardziej miarodajnych i specyficznych narzędzi biochemicznej oceny stanu patofizjologicznego organizmu.

Najważniejsze wnioski płynące z przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego tworzącego cykl publikacji pozwoliły na wykazanie, że:

1. Zoptymalizowana procedura eksperymentalna, uwzględniająca zastosowanie nowoczesnych metod izolacji i wzbogacania analitów oraz wybór najlepszego dla danego problemu analitycznego rodzaju matrycy próbki i metody rozdzielania i detekcji, umożliwia uzyskanie rzetelnych wyników analitycznych [**H1-H5**].
2. Kompleksowa informacja o kilku biomarkerach, a nie pojedynczych cząsteczkach, jest preferowana podczas diagnozy, monitorowania przebiegu choroby bądź oceny efektywności zastosowanej terapii, w kontekście trudnych do wykrycia nowotworów jakimi są guzy NET, jak również w przebiegu innych, groźnych chorób, w tym udaru mózgu [**H1, H2**].
3. Zoptymalizowana i zwalidowana metoda *off line* oparta o DLLME w połączeniu z MEKC-DAD została z powodzeniem zastosowana do jednoczesnej izolacji i oznaczania

siedmiu związków z grupy amin biogennych: DA, A, NA, 5-HT, L-DOPA, L-Tyr i L-Tryp w moczu pacjentów onkologicznych ze zdiagnozowanymi nowotworami z grupy NET [H1].

4. Pilotażowe analizy, które zakładały oznaczanie DA, A, NA, 5-HT, L-DOPA, L-Tyr i L-Tryp w moczu pacjentów, u których wystąpił udar krwotoczny (1 pacjent) lub niedokrwienny (9 pacjentów), z zastosowaniem metody DLLME-MEKC-DAD, pozwoliły na dogłębną ocenę studium przypadku dla poszczególnych pacjentów po udarze. Zaproponowany panel biomarkerów może stanowić uzupełnienie badań biochemicznych w czasie monitorowania pacjentów po udarze oraz monitorowania efektywności stosowanej terapii. Tym samym, może stać się cennym, pomocniczym wskaźnikiem w przypadku konieczności modyfikacji terapii i/lub procedur medycznych, jeśli poziomy amin biogennych będą utrzymywały się na niefizjologicznym poziomie [H2].

5. Zastosowanie metanolu wzbogaconego o IL2 (w stężeniu 20 ng/ml) pozwoliło uzyskać wzrost wydajności ekstrakcji dla amin biogennych i aminokwasów prekursorowych od 9-krotnego dla L-Tryp, aż do 21-krotnego dla A. Wzrost wydajności ekstrakcji został potwierdzony poprzez porównanie wysokości pików analitów zarejestrowanych na elektroferogramach próbek podlegających procedurom ekstrakcji z użyciem metanolu lub metanolu wzbogaconego IL2 (jako odczynników do desorpcji), dzięki zastosowaniu zoptymalizowanej metody MEKC-DAD [H3].

6. Protokół przygotowania prób i wyniki badań uzyskane w pracy H3 były podstawą do wystąpienia i uzyskania ochrony patentowej sposobu izolacji amin biogennych w próbkach moczu (nr zgłoszenia P.422788).

7. Ciecze jonowe mogą z powodzeniem być stosowane w celu prekoncentracji ważnych klinicznie cząsteczek (takich jak aminy biogenne) w próbkach biologicznych, zarówno w moczu, jak i w tkankach zwierzęcych [H3, H4].

8. Podczas jednoczesnej analizy związków z grupy amin biogennych i aminokwasów z matrycy, jaką jest tkanka nerwowa, odpowiednie jest rozważenie strategii IL-SPME-MEKC-DAD jako alternatywnej względem innych metod analitycznych, które często wymagają zastosowania konwersji chemicznej analitów, droższych i mniej dostępnych detektorów (LIF, MS), większej ilości toksycznych odczynników i objętości tkanki, z której wykonywana jest analiza (jedynie 200 mg tkanki było wymagane w opracowanym protokole analitycznym) [H4].

9. Zoptymalizowanie metody MEKC-DAD wymagało doboru parametrów krytycznych metody, w tym składu BGE (bufor złożony był z tetraboranu sodu (5 mM), kwasu borowego

(150 mM), SDSu (50 mM) oraz metanolu (15%, *v/v*) (szacunkowe pH 7,3)). Powyższe warunki analizy elektroforetycznej pozwoliły na selektywne rozdzielanie i oznaczenie 7 analitów – metabolitów amin biogennych (DHPG, MHPG, VMA, HVA, NM, M, DOPAC). Na podstawie uzyskanych elektroferogramów określono wartości współczynników wzmocnienia EF dla badanych analitów, co pozwoliło przeprowadzić analizę porównawczą wydajności 25 różnych strategii ekstrakcyjnych i prekoncentracyjnych (opartych o DLLME (1 metoda), SPE (13 metod) lub SPME (11 metod)) tych związków w próbkach moczu [H5].

10. Surowe dane eksperymentalne (EF) uzyskane w toku prac H5 zostały poddane analizie chemometrycznej (HCA), która określiła podobieństwa i różnice pomiędzy efektywnością procedur dla poszczególnych analitów, jak i wyróżniła najbardziej optymalną procedurę dla jednoczesnej ich izolacji z materiału biologicznego przed analizą MEKC-DAD.

11. Ostatecznie, analiza HCA wskazała, że C18-SPE z metanolem jako eluentem pozwala uzyskać najbardziej efektywną, jednoczesną ekstrakcję i prekoncentrację DHPG, HVA, DOPAC i NM, podczas gdy SPME-PS-DVB z metanolem jako odczynnikiem desorbującym, to metoda z wyboru podczas izolacji M i MHPG. Dodatkowo, dodatek cieczy jonowej do roztworu desorbującego pozwala zwiększyć stopień wzbogacenia M w próbce moczu [H5].

12. Oprócz zastosowania zoptymalizowanych strategii izolacji i wzbogacania *off line* analitów z grupy amin biogennych w próbkach biologicznych, zasadne jest zastosowanie również podejść prekoncentracyjnych *on line*. Najprostsze z nich, spiętrzanie ze wzmocnieniem pola elektrycznego, może z powodzeniem być połączone, zarówno z metodami opartymi o LPME, jak i o SPME.

13. Cennym źródłem usystematyzowanej wiedzy o technikach prekoncentracyjnych, szczególnie w kontekście analiz śladowych stężeń biomarkerów w próbkach biologicznych, dla osób pracujących z technikami elektromigracyjnymi, jest praca przeglądowa [H6], która przedstawia szereg nowatorskich strategii analitycznych w zakresie metod *on line* oraz *in line*, pozwalających na rzetelne analizy związków występujących w niskich stężeniach w materiałach o złożonym składzie [H6].

14. Wprowadzenie nowych strategii izolacyjnych i prekoncentracyjnych poprzez obniżenie granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) zwiększa możliwości aplikacyjne CE dla analiz amin biogennych, ich metabolitów i prekursorowych aminokwasów w różnorodnych próbkach klinicznych [H1-H5].

15. Wykonana w opisanym osiągnięciu optymalizacja strategii prekoncentracyjnych *off line* oraz *on line* przyczynić się może do zaproponowania nowych, obdarzonych większą

czułością i specyficnością, testów diagnostycznych, pozwalających monitorować przebieg terapii pacjenta i progresję choroby, dzięki czemu wpisuje się idealnie w zadania medycyny „szytej na miarę”, jak również spełnia wymogi zielonej chemii (zmierzącej do redukcji zużycia toksycznych odczynników, zmniejszeniu narażenia analityka oraz środowiska) [**H1-H6**].

4.5. Piśmiennictwo

- [1] B.H. Foy, B.P. Gonçalves, J.M. Higgins, Unraveling disease pathophysiology with mathematical modeling, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15 (2020) 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032557>.
- [2] M.J. Whiting, M.P. Doogue, Advances in biochemical screening for pheochromocytoma using biogenic amines, *Clin. Biochem. Rev.* 30 (2009) 3–17.
- [3] I. Fragkandrea, J.A. Nixon, P. Panagopoulou, Signs and symptoms of childhood cancer: a guide for early recognition, *Am. Fam. Physician.* 88 (2013) 185–92.
- [4] N. Miękus, T. Bączek, Non-invasive screening for neuroendocrine tumors—Biogenic amines as neoplasm biomarkers and the potential improvement of gold standards, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.013>.
- [5] I.M. Modlin, K. Oberg, A. Taylor, I. Drozdov, L. Bodei, M. Kidd, Neuroendocrine tumor biomarkers: current status and perspectives, *Neuroendocrinology.* 100 (2014) 265–77. <https://doi.org/10.1159/000368363>.
- [6] A. Plenis, I. Ołędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, Recent trends in the quantification of biogenic amines in biofluids as biomarkers of various disorders: A review, *J. Clin. Med.* 8 (2019) 1–55. <https://doi.org/10.3390/jcm8050640>.
- [7] M.R. Tellez, G. Mamikunian, T.M. O’Dorisio, A.I. Vinik, E.A. Woltering, A single fasting plasma 5-HIAA value correlates with 24-hour urinary 5-HIAA values and other biomarkers in midgut neuroendocrine tumors (NETs), *Pancreas.* 42 (2013) 405–10. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318271c0d5>.
- [8] N. Tohmola, O. Itkonen, T. Sane, H. Markkanen, S. Joenväärä, R. Renkonen, E. Hämäläinen, Analytical and preanalytical validation of a new mass spectrometric serum 5-hydroxyindoleacetic acid assay as neuroendocrine tumor marker, *Clin. Chim. Acta.* 428 (2014) 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.025>.
- [9] A. Soborczyk, A., Deptała, Markery nowotworowe w praktyce klinicznej, *Chor. Serca i Naczyń.* 4 (2007) 184–189.
- [10] A. Sansone, R. Lauretta, S. Vottari, A. Chiefari, A. Barnabei, F. Romanelli, M. Appetecchia, Specific and non-specific biomarkers in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors, *Cancers (Basel).* 11 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.3390/cancers11081113>.
- [11] L. a Dubois, D.K. Gray, Dopamine-secreting pheochromocytomas: in search of a syndrome, *World J. Surg.* 29 (2005) 909–13. <https://doi.org/10.1007/s00268-005-7860-7>.
- [12] S.A. Lagerstedt, D.J. O’Kane, R.J. Singh, Measurement of plasma free metanephrine and normetanephrine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma, *Clin. Chem.* 50 (2004) 603–11. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.024703>.
- [13] V. Aluri, J.S. Dillon, Biochemical Testing in Neuroendocrine Tumors, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 46 (2017) 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2017.04.004>.
- [14] M.M. Hsieh, E.P. Lin, S.W. Huang, On-line concentration and separation of cationic and anionic neurochemicals by capillary electrophoresis with UV absorption detection, *Talanta.* 88 (2012) 638–45. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.050>.
- [15] A. Bacaloni, S. Insogna, A. Sancini, M. Ciarrocca, F. Sinibaldi, Sensitive profiling of biogenic amines in human urine by capillary electrophoresis with field amplified sample injection, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 987–93.

- <https://doi.org/10.1002/bmc.2891>.
- [16] M.C. Breadmore, Capillary and microchip electrophoresis: Challenging the common conceptions, *J. Chromatogr. A.* 1221 (2012) 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.062>.
- [17] H. Wätzig, M. Degenhardt, A. Kunkel, Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications, *Electrophoresis.* 19 (1998) 2695–2752. <https://doi.org/10.1002/elps.1150191603>.
- [18] S. Terabe, Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2 (2009) 99–120. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.113005>.
- [19] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111–113. <https://doi.org/10.1021/ac00265a031>.
- [20] S. El Deeb, M.A. Iriban, R. Gust, MEKC as a powerful growing analytical technique, *Electrophoresis.* 32 (2011) 166–183. <https://doi.org/10.1002/elps.201000398>.
- [21] N. Miękus, P. Kowalski, I. Oledzka, A. Plenis, E. Bień, A. Miękus, M. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek, Cyclodextrin-modified MEKC method for quantification of selected acidic metabolites of catecholamines in the presence of various biogenic amines. Application to diagnosis of neuroblastoma, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1003 (2015) 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.003>.
- [22] Z. Wang, L. Feng, D. Xiao, N. Li, Y. Li, D. Cao, Z. Shi, Z. Cui, N. Lu, A silver nanoislands on silica spheres platform: Enriching trace amounts of analytes for ultrasensitive and reproducible SERS detection, *Nanoscale.* 9 (2017) 16749–16754. <https://doi.org/10.1039/c7nr06987a>.
- [23] M. Dehghani Mohammad Abadi, N. Ashraf, M. Chamsaz, F. Shemirani, An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry, *Talanta.* 99 (2012) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.027>.
- [24] G. de Jong, Detection in Capillary Electrophoresis - An Introduction, in: *Capill. Electrophor. Spectrom. Princ. Appl.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2016: pp. 1–5. <https://doi.org/10.1002/9783527693801.ch1>.
- [25] A. Roszkowska, N. Miękus, T. Bączek, Application of solid-phase microextraction in current biomedical research, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 285–302. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800785>.
- [26] S. Hamidi, N. Alipour-Ghorbani, Liquid-phase microextraction of biomarkers: A review on current methods, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 40 (2017) 853–861. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1374291>.
- [27] G. Jarvas, A. Guttman, N. Miękus, T. Bączek, S. Jeong, D.S. Chung, V. Pätoprstý, M. Masár, M. Hutta, V. Datinská, F. Foret, Practical sample pretreatment techniques coupled with capillary electrophoresis for real samples in complex matrices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 122 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115702>.
- [28] K. Sadilkova, K. Dugaw, D. Benjamin, R.M. Jack, Analysis of vanillylmandelic acid and homovanillic acid by UPLC-MS/MS in serum for diagnostic testing for neuroblastoma, *Clin. Chim. Acta.* 424 (2013) 253–7. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.06.024>.
- [29] M.E.R. Diniz, L.S. Vilhena, B.P. Paulo, T.C.C. Barbosa, E.C. Mateo, Simultaneous Determination of Catecholamines and Metanephrines in Urine by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry: Successful Clinical Application, *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 1684–1691.

- <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150142>.
- [30] L. Lili, H. Xu, D. Song, Y. Cui, S. Hu, G. Zhang, Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2365–2370. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.081>.
- [31] Y. He, X.E. Zhao, S. Zhu, N. Wei, J. Sun, Y. Zhou, S. Liu, Z. Liu, G. Chen, Y. Suo, J. You, In situ derivatization-ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of neurotransmitters in Parkinson's rat brain microdialysates by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1458 (2016) 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.059>.
- [32] X.E.E. Zhao, Y. He, M. Li, G. Chen, N. Wei, X. Wang, J. Sun, S. Zhu, J. You, Analysis of amino acid and monoamine neurotransmitters and their metabolites in rat urine of Alzheimer's disease using in situ ultrasound-assisted derivatization dispersive liquid-liquid microextraction with UHPLC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 135 (2017) 186–198. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.056>.
- [33] J.B. Ma, H.W. Qiu, Q.H. Rui, Y.F. Liao, Y.M. Chen, J. Xu, P.P. Zhan, Y.G. Zhao, Fast determination of catecholamines in human plasma using carboxyl-functionalized magnetic-carbon nanotube molecularly imprinted polymer followed by liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1429 (2016) 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.030>.
- [34] R. Baron, M. Zayats, I. Willner, Dopamine-, L-DOPA-, adrenaline-, and noradrenaline-induced growth of Au nanoparticles: Assays for the detection of neurotransmitters and of tyrosinase activity, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1566–1571. <https://doi.org/10.1021/ac048691v>.
- [35] Á. Korös, R. Hanczkó, A. Jámbo, Y. Qian, A. Perl, I. Molnár-Perl, Analysis of amino acids and biogenic amines in biological tissues as their o-phthalaldehyde/ethanethiol/fluorenylmethyl chloroformate derivatives by high-performance liquid chromatography. A deproteinization study, *J. Chromatogr. A.* 1149 (2007) 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.018>.
- [36] J. Guimarães, M.A. Vieira-Coelho, E. Moura, J. Afonso, M.J. Rosas, R. Vaz, C. Garrett, Urinary profile of catecholamines and metabolites in Parkinson patients with deep brain stimulation, *Eur. J. Neurol.* 21 (2014) 353–356. <https://doi.org/10.1111/ene.12161>.
- [37] A. Naccarato, E. Gionfriddo, G. Sindona, A. Tagarelli, Development of a simple and rapid solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method for the analysis of dopamine, serotonin and norepinephrine in human urine, *Anal. Chim. Acta.* 810 (2014) 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.058>.
- [38] M.A. Raggi, C. Sabbioni, G. Nicoletta, R. Mandrioli, G. Gerra, Analysis of plasma catecholamines by liquid chromatography with amperometric detection using a novel SPE ion-exchange procedure, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1141–1146. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301486>.
- [39] F.S. Mirnaghi, K. Goryński, A. Rodriguez-Lafuente, E. Boyaci, B. Bojko, J. Pawliszyn, Microextraction versus exhaustive extraction approaches for simultaneous analysis of compounds in wide range of polarity, *J. Chromatogr. A.* 1316 (2013) 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.084>.
- [40] J. Pawliszyn, *Handbook of solid phase microextraction*, 1st Edition, Elsevier, 2011.
- [41] X. Zhang, S. Xu, J.-M. Lim, Y.-I. Lee, *Molecularly imprinted solid phase*

- microextraction fiber for trace analysis of catecholamines in urine and serum samples by capillary electrophoresis, *Talanta*. 99 (2012) 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.050>.
- [42] D. Oppolzer, I. Moreno, B. da Fonseca, L. Passarinha, M. Barroso, S. Costa, J.A. Queiroz, E. Gallardo, Analytical approach to determine biogenic amines in urine using microextraction in packed syringe and liquid chromatography coupled to electrochemical detection, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 608–614. <https://doi.org/10.1002/bmc.2835>.
- [43] M. Czarnecka, J. Tilan, J. Kitlinsk, Sympathetic neurotransmitters in neuroblastoma – between physiology and pathology, in: *Neuroblastoma - Present Futur.*, InTech, 2012: pp. 138–152. <https://doi.org/10.5772/29847>.
- [44] J. Adachi, C. Kumar, Y. Zhang, J. V. Olsen, M. Mann, The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins, *Genome Biol.* 7 (2006) 1–16. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-r80>.
- [45] J. Hu, T. Li, H. Wang, H. Fujita, Hierarchical cluster ensemble model based on knowledge granulation, *Knowledge-Based Syst.* 91 (2016) 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.knosys.2015.10.006>.
- [46] X.S. Li, S. Li, P. Wynveen, K. Mork, G. Kellermann, Development and validation of a specific and sensitive LC-MS/MS method for quantification of urinary catecholamines and application in biological variation studies, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 7287–97. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8120-1>.
- [47] U. Karjalainen, H. Siren, K. Vurensola, K. Vuorensola, H. Sirén, U. Karjalainen, Determination of dopamine and methoxycatecholamines in patient urine by liquid chromatography with electrochemical detection and by capillary electrophoresis coupled with spectrophotometry and mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 788 (2003) 277–289. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)01037-1](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)01037-1).
- [48] A. Gower, M. Tiberi, The intersection of central dopamine system and stroke: potential avenues aiming at enhancement of motor recovery, *Front. Synaptic Neurosci.* 10 (2018) 1–28. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00018>.
- [49] R.L. Vekariya, A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations, *J. Mol. Liq.* 227 (2017) 1–58. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.11.123>.
- [50] N. Treder, T. Bączek, K. Wychodnik, J. Rogowska, L. Wolska, A. Plenis, The influence of ionic liquids on the effectiveness of analytical methods used in the monitoring of human and veterinary pharmaceuticals in biological and environmental samples—trends and perspectives, *Molecules*. 25 (2020) 1–57. <https://doi.org/10.3390/molecules25020286>.
- [51] A. Farran, C. Cai, M. Sandoval, Y. Xu, J. Liu, M.J. Hernandez, R.J. Linhardt, Green solvents in carbohydrate chemistry: from raw materials to fine chemicals, *Chem. Rev.* 115 (2015) 6811–6853. <https://doi.org/10.1021/cr500719h>.
- [52] N.F. Atta, A.H. Ibrahim, A. Galal, Nickel oxide nanoparticles/ionic liquid crystal modified carbon composite electrode for determination of neurotransmitters and paracetamol, *New J. Chem.* 40 (2016) 662–673. <https://doi.org/10.1039/c5nj01804h>.
- [53] A. Seduraman, P. Wu, M. Klähn, Extraction of tryptophan with ionic liquids studied with molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. A*. 116 (2012) 296–304. <https://doi.org/10.1021/jp206748z>.
- [54] X. Zhou, A. Zhu, G. Shi, Selective extraction and analysis of catecholamines in rat blood microdialysate by polymeric ionic liquid-diphenylboric acid-packed capillary

- column and fast separation in high-performance liquid chromatography-electrochemical detector, *J. Chromatogr. A.* 1409 (2015) 125–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.040>.
- [55] T.D. Ho, A.J. Canestraro, J.L. Anderson, Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review, *Anal. Chim. Acta.* 695 (2011) 18–43. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2011.03.034>.
- [56] A. Zwir-Ferenc, M. Biziuk, Solid phase extraction technique – trends , opportunities and applications, *Polish J. Environ. Stud.* 15 (2006) 677–690.
- [57] L. Zon, Modeling human diseases: An education in interactions and interdisciplinary approaches, *DMM Dis. Model. Mech.* 9 (2016) 597–600. <https://doi.org/10.1242/dmm.025882>.
- [58] D. Goldstein, E. Graeme, R. McCarty, Catecholamines: bridging basic science with clinical medicine, 1998.
- [59] G. Eisenhofer, M. Peitzsch, B.C. McWhinney, Impact of LC-MS/MS on the laboratory diagnosis of catecholamine-producing tumors, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.027>.
- [60] Y.K. Park, K. Choi, A.Y.B.H. Ahmed, Z.A. ALothman, D.S. Chung, Selective preconcentration of amino acids and peptides using single drop microextraction in-line coupled with capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3357–3361. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.029>.
- [61] J. Kim, K. Choi, D.S. Chung, Synergistic coupling of in-line single-drop microextraction and on-line large-volume sample stacking for capillary electrophoresis/mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 1067–1073. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1535-3>.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Od 2005 roku należałam do Studenckiego Koła Naukowego przy zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a od 2008 roku również do Studenckiego Koła Naukowego „Farmacja Przemysłowa”, działającego przy Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej GUM. Z końcem 2009 roku dołączyłam również do organizacji międzynarodowej: ISPE – Engineering Pharmaceutical Innovation. Następnie moja działalność naukowa związana była z realizacją pracy magisterskiej, w ramach której, w okresie od 03.2010 do 08.2010 r., wykonywałam badania eksperymentalne pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Nasala, przy czym analizy były prowadzone we Włoszech, w Perugii. Wyjazd odbył się w ramach programu „LLP-Erasmus” do Departamentu Medycyny Eksperymentalnej i Biochemii, Sekcja Farmakologii. Prace badawcze obejmowały analizę przeciwciał specyficznych dla fosforylowanego enzymu – dioksygenazy indoloaminy, który bierze udział w regulacji m.in. układu immunologicznego. Enzym ten katalizuje reakcję degradacji L-Tryp, a produktami tej reakcji są kynureniny. W toku badań stosowałam takie techniki jak test immunoenzymatyczny ELISA, Western blotting i immunoprecypitację, jak również oczyszczanie komórek dendrytycznych i reakcję polimerazy łańcuchowej PCR. W Perugii otrzymałam również certyfikat ukończenia kursu „Corretto Approccio All’Attiva’ Di Sperimentazione Animale” organizowanego przez Stabulario Centralizzato Universita Degli Studi Di Perugia, który daje prawo do prac badawczych angażujących małe zwierzęta laboratoryjne. Moja działalność naukowo-edukacyjna podczas studiów została doceniona, gdyż otrzymałam w 2011 r. nagrodę “*Primus inter Pares*” przyznawaną przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz nagrodę Profesora Janickiego dla najlepszego absolwenta Wydziału Farmaceutycznego 2011.

W pierwszym roku Studiów Doktoranckich (2011) pojechałam na trzymiesięczne stypendium w Halle, w Niemczech, na Martin-Luther-Universität, w ramach których prowadziłam badania związane z udoskonalaniem technik LC-MS, MALDI-MS w proteomice. Dzięki współpracy z ośrodkiem w Niemczech, udoskonalałam techniki analizujące stężenia produktów degradacji kolagenu przez metaloproteiny, enzymy proteolityczne produkowane przez poszczególne komórki tkanek i przez komórki biorące

udział w reakcji zapalnej. Ze względu na ważną rolę tych enzymów w degradacji elementów macierzy zewnątrzkomórkowej, typowane są jako ważne cząsteczki biorące udział w procesach wzrastania, tworzenia przerzutów i progresji nowotworów. Prace badawcze prowadzone w Niemczech opublikowałam w 2019 roku [zał. 5, II.II. 2.1.9]. Po roku otrzymałam roczne stypendium naukowe (w ramach umowy Offsetowej z Hiszpanią – EADS CASA (Eurocopter and Airbus Operations)) w Madrycie (05.2012-05.2013), gdzie w Hiszpańskim Narodowym Centrum Badań Nad Rakiem (CNIO, Spanish National Cancer Research Centre) zajmowałam się aplikacją proteomiki ilościowej w badaniach dotyczących chorób nowotworowych. Badania skupiały się na analizie biomarkerów proteomicznych z tkanek pozyskanych z modeli zwierzęcych raka piersi i raka trzustki. Wśród istotnie zmienionych w procesie nowotworowym, wytypowałam szereg fosforylowanych białek (w tym także w obrębie białek zależnych od kinazy białkowej aktywowanej mitogenami 1 (Mnk1), której najlepiej opisanym substratem jest eukariotyczny czynnik inicjujący translację 4E), których metody analiz optymalizowałam. Moim zadaniem była optymalizacja całego protokołu eksperymentalnego, od pobrania próbki, poprzez jej analizę, po analizę statystyczną otrzymanych danych eksperymentalnych. Zastosowałam technikę trawienia trypsyną białek w próbce (strategię „bottom-up”), następnie ich oczyszczanie z SPE, wzbogacanie frakcji fosfopeptydów korzystając z matryc chromatograficznych zdolnych do selektywnego wiązania reszt fosforanowych, złożów z unieruchomionymi jonami metali – IMAC oraz z tlenkiem tytanu (IV) – TiO₂, nanoLC-MS/MS do rozdzielania i detekcji peptydów, jak również znakowanie iTRAQ (ang. *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*) w celu ilościowej analizy fosfopeptydów. Przeprowadzona analiza LC-MS/MS próbek biologicznych pozwoliła na identyfikację 2355 peptydów, spośród których 657 było fosforylowanych oraz zaproponowanie 19 białek potencjalnie fosforylowanych przez kinazę Mnk1. Zoptymalizowana metodyka została na stałe wprowadzona podczas badań różnicujących zdrowe fosfoproteomy od tych patologicznie zmienionych w laboratorium proteomicznym Hiszpańskiego Narodowego Centrum Badań nad Rakiem (CNIO). Dzięki doświadczeniu naukowym zdobytym w Hiszpanii, opublikowałam dwie prace z zakresu fosfoproteomiki [zał. 5, II.I. 2.1.3., 2.1.4.].

W czasie Studiów Doktoranckich uczestniczyłam również w krajowych inicjatywach badawczo-rozwojowych; w 2013 roku w ramach Akademii Polpharmy odbyłam miesięczne praktyki w Dziale Formulacji Zakładów Farmaceutycznych Polpharma S.A., zaś w 2015 roku miesięczny staż w ramach Akademii Servier w dziale badań klinicznych i monitorowania

zdarzeń niepożądanych w firmie Servier, Warszawa. Dzięki stażom w tych firmach, pogłębiłam swoją wiedzę na temat formulacji leków, jak również badań klinicznych szczególnie fazy III i IV.

W tym okresie uczestniczyłam aktywnie w wielu sympozjach i konferencjach o zasięgu krajowym i zagranicznym. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych brałam udział w ośmiu konferencjach naukowych (krajowych oraz międzynarodowych), gdzie prezentowałam wyniki prac wygłaszając 1 referat w języku angielskim oraz 7 prac posterowych – dwóch, w których byłam autorem prezentującym i pięciu, w których byłam współautorem [zał. 5, II.I. 4]. Byłam również głównym autorem monografii naukowej pt. *The evaluation of serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid levels in serum and urine samples from patients with neuroendocrine tumors*, która ukazała się po konferencji w Oxfordzie w roku 2014 [zał. 5, II.I 1.]. Byłam autorem głównym [zał. 5, II.I 2.1.3., 2.1.4, 2.1.5., 2.1.6.] lub współautorem [zał. 5, II.I 2.1.1., 2.1.2.] sześciu prac naukowych w zagranicznych i polskich czasopismach naukowych takich jak: *Chromatographia* [zał. 5, II.I 2.1.1.], *Molecules* [zał. 5, II.I 2.1.2.], *Farmacja Polska* [zał. 5, II.I 2.1.3.], *Current Pharmaceutical Analysis* [zał. 5, II.I 2.1.4.], *Molecular Medicine Reports* [zał. 5, II.I 2.1.5.], *Journal of Chromatography B* [zał. 5, II.I 2.1.6.]. Uczestniczyłam również w pracach wykonywanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GUMed, związanych z realizacją projektu naukowego pod kierownictwem dr hab. Aliny Plenis (numer wniosku: N405 024340) pt. *‘Porównawcza analiza proteomiczna hormonalnie czynnych guzów neuroendokrynych wspomagana analizą QSRR’* [Zał. 5, II.I 5.]. Optymalizowałam metody oparte o elektroforezę żelową w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (1D-PAGE) sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (MS/MS), która posłużyła do porównawczej analizy proteomu pierwotnych linii komórkowych guzów NET. Zoptymalizowana procedura analizy proteomicznej pozwoliła na wyłonienie potencjalnych kandydatów na biomarkery guzów NET (m.in. rakowiaka, pierwotnego rakowiaka trzustki oraz atypowego rakowiaka płuc). Co więcej, przedstawiła nową możliwość związaną z określaniem fenotypu guza NET (odpowiednio wydzielającego i niewydzielającego) poprzez badanie profilu proteomicznego próbek biologicznych. Prowadzone przeze mnie prace badawcze zostały docenione, gdyż otrzymałam w 2014 r. stypendium naukowe w ramach szóstej edycji projektu "InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów", stypendium przyznawane w ramach Priorytetu VIII Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2, Poddziałanie 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, finansowanego ze środków

Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz budżetów samorządów województw [zał. 5, II.I. 3.1.2.], jak również środki MNiSW ze źródeł GUMed przyznane na prowadzenie badań naukowych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich (MN0153/506) [zał. 5, II.I. 3.1.1.].

5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

W grudniu 2015 ukończyłam Stacjonarne Studia Doktoranckie w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GUMed i zostałam zatrudniona w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego na stanowisku technicznym na cały etat. Następnie awansowałam na UG, poprzez stanowisko pracownika badawczego, na stanowisku adiunkta, które zajmowałam do lutego 2020 r. Jednocześnie pracowałam od stycznia 2016 r. na ¼ etatu w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GuMed, na stanowisku adiunkta. W tym czasie uczestniczyłam w 16 krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych, gdzie prezentowałam wyniki prac wygłaszając 1 referat w języku polskim [zał. 5, II.II. 4.2.], 1 referat w języku angielskim [zał. 5, II.II 4.1.] oraz pierwszy autor 7 prac posterowych [zał. 5, II.II. 4.4., 4.6., 4.7., 4.9. 4.10., 4.13., 4.14.] (jedna nagroda II stopnia za prezentację posterową) i współautor 20 prezentacji posterowych [zał. 5, II.II. 4.3., 4.5., 4.7., 4.8., 4.10, 4.11., 4.12., 4.14., 4.15., 4.16.]. W latach 2017/2018 uzyskałam finansowanie z Narodowego Centrum Nauki na prowadzenie badań naukowych (grant: Miniatura 1 2017/01/X/ST4/00225, funkcja: kierownik, temat: „Usprawnienie analizy śladowych ilości neuroprzekaźników w materiałach biologicznych z wykorzystaniem sprzężenia mikroekstrakcji wspomaganą cieczami jonowymi i elektroforezy kapilarnej z laserowo wzbudzaną fluorescencją”) [zał. 5, II.II 3.1.]. Celem projektu było pozyskanie szeregu informacji jakościowych oraz ilościowych na temat poszczególnych neuroprzekaźników takich jak adrenalina (A), noradrenalina (NA), dopamina (DA) i serotonina (5-HT), ich aminokwasów prekursorowych (tryptofan, tyrozyna, L-DOPA) w materiałach biologicznych poprzez optymalizację platformy technologicznej opartej o techniki: mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) wspomaganą cieczami jonowymi (ILs) i elektroforezy kapilarnej (CE) z detektorem z laserowo wzbudzaną fluorescencją (LIF), podczas jednoczesnej izolacji i oznaczania analitów. Wyniki prac zostały opublikowane w renomowanych czasopismach (N. Miękus i współp., International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19, 1-11, N. Miękus i współp., Talanta, 2018, 186, 119-123). Tematyka poruszana w działaniu naukowym Miniatura I, składa się na część dorobku habilitacyjnego.

Ponadto, uzyskałam środki MNiSW ze źródeł GUMed przyznane na prowadzenie badań naukowych, służących rozwojowi młodych naukowców (MN01-0316/08/506, temat: „Wczesna diagnostyka różnicowa neuroblastoma z wykorzystaniem zaawansowanych technik mikroekstrakcyjnych”) [zał. 5, II.II 3.2.]. Optymalizowałam procedury służące polepszeniu odzysku podczas ekstrakcji związków małowcząsteczkowych z materiałów biologicznych, które mogłyby być stosowane w codziennej praktyce klinicznej. Prace eksperymentalne umożliwiły opracowanie nowych, wydajniejszych metod ekstrakcyjnych cechujących się powtarzalnością, niskim zużyciem toksycznych odczynników i niskimi wymaganiami odnośnie do objętości próbki. Porównawcza analiza i oznaczanie wybranych analitów przebiegała z zastosowaniem wcześniej zoptymalizowanej metody opartej o technikę elektroforezy kapilarnej (dokładnie: micelną elektrokinetyczną chromatografię) z detektorem DAD. Dane optymalizacyjne zostały przeanalizowane przy pomocy zaawansowanych narzędzi statystycznych i chemometrycznych, a następnie przedyskutowane pod kątem przydatności w diagnostyce neuroblastoma przy współdziałaniu klinicystów z Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMed, z którą współpracuję od 2015 roku. Byłam także w latach 2018-2019 kierownikiem grantu (grant badawczy finansowany poprzez Fundację GetResponse Cares (13-0028/03/506, temat: „Kombinacje substancji biologicznie aktywnych pochodzenia roślinnego jako nowa strategia farmakoterapeutyczna w ostrych białaczkach limfoblastycznych u dzieci”) [zał. 5, II.II 3.3.]. Dążenie do zaproponowania ulepszonych schematów terapeutycznych dla dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ang. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL) wysokiego ryzyka, to punkt wyjściowy badania podjętego w projekcie. Uwaga skierowana była na związkach naturalnych (m.in. kurkuminie, rezweratolu, kwercetynie, c-fikocyjaninie, indolo-3-karbinolu, genisteinie, jak również witaminach: A (transretinol) i E (alfa-tokoferol)) i weryfikacji ich potencjału przeciwnowotworowego u dzieci z ALL. Projekt umożliwił ocenę działania antyproliferacyjnego na liniach komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej pojedynczych substancji biologicznie aktywnych pochodzenia roślinnego lub ich mieszaniny oraz wytypowanie najlepszych kombinacji substancji czynnych do dalszych badań na pierwotnych liniach komórkowych pozyskanych od pacjentów pediatrycznych. Jako kierownik grantu, koordynowałam prace naukowców z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Oddział Dzienny (GUMed) oraz z Zakładu Biologii Komórki i Immunologii Instytutu Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed). Ponadto jestem współwykonawcą

(lata 2018-2021) projektów międzynarodowych realizowanych w Polsce (GUMed) we współpracy z Koreą Południową, Węgrami, Czechami i Słowacją (DZP/V4-Korea-I/20/2018, temat: Narzędzia mikroelektroforetyczne w bioanalityce) [zał. 5, II.II. 3.4.]. Współpraca z naukowcami z Korei Południowej, z Katedry Chemii na Uniwersytecie w Seoulu (pod kierownictwem Profesora Doo Soo Chunga), umożliwiła mi przeprowadzenie części zadań przewidzianych w Projekcie podczas stażu naukowego, w 2019 roku. W czasie stażu podjęłam się realizacji projektu cząstkowego, którego głównym celem była analiza wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (ang. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID) z zastosowaniem techniki mikroekstrakcji do jednej kropli, SDME, sprzężonej *on line* z elektroforezą kapilarną. Przeprowadzone prace pozwoliły na zaprezentowanie nowej metodyki izolacji, wzbogacania w próbce i oznaczania trzech leków z grupy NSAID (ibuprofenu, naproksenu i ketoprofenu) w próbkach wodnych oraz w matrycach biologicznych. Opracowana metoda została przetestowana podczas analizy wybranych leków w próbkach biologicznych (krew, mocza). Technika ekstrakcyjna, którą optymalizowałam we współpracy z Seoulem, jest wdrażana przeze mnie obecnie w laboratorium w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GUMed, jako „zielona technika”, które to miano można jej nadać dzięki jej charakterystycznym cechom takim jak: redukcja odczynników niezbędnych do prowadzenia ekstrakcji, jak również generowanie niskich ilości produktów ubocznych, oraz niskie zapotrzebowanie na próbkę biologiczną, zredukowana toksyczność, czas analizy oraz koszty. Prace już wykonane są obecnie przygotowywane do publikacji w renomowanym czasopiśmie analitycznym z Listy Filadelfijskiej, zaś wstępne badania zostały zaprezentowane podczas konferencji CECE2019 w Gdańsku w ubiegłym roku (moja praca posterowa dotycząca tej tematyki uzyskała II miejsce w konkursie posterowym). Prace związane z aplikacją tej metodologii podczas izolacji i oznaczania ważnych klinicznie analitów (z grupy metabolitów L-tryptofanu), są obecnie kontynuowane. Jestem również zaangażowana jako współbadacz w prace analityczne realizowane we współpracy z Uniwersytetem w Rostoku (University Medical Center Rostock, Institute for Biomedical Engineering, Niemcy, od 2017 - do chwili obecnej) [zał. II.II 11.1.]. Ta międzynarodowa współpraca naukowa dotyczy opracowania metod oznaczania stopnia uwalniania substancji aktywnych z systemów innowacyjnych implantów oraz systemów do małoinwazyjnej aplikacji do uwalniania leków stosowanych w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych (w niewydolności żylny), zaćmy, jaskry pierwotnej otwartego kąta, częściowej utraty słuchu i głuchoty. Ponadto, wraz ze współpracownikami z Katedry i

Zakładu Chemii Farmaceutycznej GUMed biorę udział w optymalizacji metod zmierzających do oznaczania innych, ważnych biologicznie cząsteczek takich jak hormony (hormony steroidowe, hormony tarczycy), leki (w tym na przykład mitotan), jak również ich zanieczyszczenia (takie jak parabeny) w matrycach biologicznych. Dzięki tym metodom opracowaliśmy doskonale alternatywne podejścia do izolacji, prekoncentracji (*off line* i *on line*) wielu ważnych związków, które mogą być traktowane jako biomarkery poważnych schorzeń, jak również metody te służą do oceny czystości i składu produktu leczniczego. Ścisłe współpracuję również z zespołem badawczym Zakładu Technologii Owoców i Warzyw, Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie (od grudnia 2017, obecnie kontynuowana). W ramach współpracy realizowane są: prace magisterskie, wspólne publikacje, praca nad projektowaniem nowych zgłoszeń krajowych i międzynarodowych projektów badawczych. Prace obejmują analizę związków przeciwutleniających w żywności funkcjonalnej. Jest to przede wszystkim grupa karotenoidów. Podjęłam się próby optymalizacji ekstrakcji karotenoidów z wyciągów soków marchwiowych z zastosowaniem metod przyjaznych środowisku takich jak ekstrakcja dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym. Analizy otrzymanych odzysków substancji badanych odbywa się przy użyciu techniki HPLC z detektorem spektrofotometrycznym. Dzięki współpracy z zespołem z Instytutu, udało się stworzyć dwie (jedną opublikowaną [zał. 5, II.II. 2.1.11.] i jedną w trakcie recenzji) prace poglądowe oraz przygotować materiał do pracy oryginalnej związanej z metodami ekstrakcji karotenoidów, jak również zaprezentować wyniki badań na dwóch konferencjach dla młodych naukowców i studentów [zał. 5, II.II. 4.15, 4.16.]. Współpracuję również ściśle ze szpitalami, klinikami i jednostkami badawczymi w trójmieście (Szpitalem Miejskim w Redłowie (oddziału rehabilitacji kardiologicznej), Szpitalem Miejskim im. Św. Wincentego a Paulo w Gdyni (oddział kardiologiczny i neurologiczny), Zakładem Biologii Komórki i Immunologii Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed oraz z zespołem Laboratoriów Specjalistycznych MWB UG i GUMed, Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMed, jak również z Katedrą Fizjologii i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego i Katedrą Chemii UG). Od roku 2020 jestem członkiem komisji opiniodawczej w czasopiśmie *Clinical Case Reports Journal* (ISSN: 2165-7920) oraz w czasopiśmie *Polymers* ((ISSN: 2073-4360) [zał. 5, II.II. 9.1., 9.2.], jak również recenzentem w renomowanych czasopismach analitycznych (w latach 2016-2020 byłam recenzentem 19 prac) [zał. 5, II.II. 10]. Recenzuję również prace (od 2018

roku) studentów kwalifikujących ich do udziału w konferencji „Młodzi Naukowcy” oraz manuskryptów przygotowywanych po wystąpieniach. Jestem współautorem patentu krajowego (P.422788) udzielonego GUMedowi pt. „Sposób izolacji amin biogennych z moczu” [zał. 5, III, 2.1.].

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

W latach 2014-2015 uzyskałam środki MNiSW ze środków GUMed przyznawane na prowadzenie badań naukowych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników Studiów Doktoranckich (N 0153/506). W marcu 2014 roku uzyskałam stypendium naukowe w ramach szóstej edycji projektu "InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów", stypendium przyznawane w ramach Priorytetu VIII Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2, Poddziałanie 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz budżetów samorządów województw. Od września 2013 byłam członkiem Komisji Rady Wydziału Farmaceutycznego z OML ds. Planów i Programów Studiów Doktoranckich na lata 2012-2016.

6.2. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Byłam członkiem komitetu organizacyjnego oraz koordynatorem grupy studentów zaangażowanych w pomoc przy organizacji międzynarodowej konferencji naukowej, która odbyła się w roku 2019 w Gdańsku 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis 2019 (CECE 2019). W latach 2016-2019 prowadziłam wykłady w szkołach podstawowych, gimnazjalnych i ponadgimnazjalnych w ramach organizowanej przez UG akcji „Zaproś naukowca do szkoły”, w ramach których wygłosiłam wykład dotyczący badania biomarkerów małowzrastkowych jako pomocnych w diagnostyce i monitorowaniu progresji chorób (w tym chorób nowotworowych i neurodegeneracyjnych). W latach 2017-2020 prowadziłam na UG na Wydziale Biologii wykłady otwarte w ramach Dni Mózgu, gdzie przedstawiałam zalety i wady nowoczesnych technik analitycznych w kontekście ich użyteczności klinicznej. Wykład był przeznaczony dla odbiorców zarówno w wieku gimnazjalnym, licealnym, jak i studentów i naukowców, co stanowiło dodatkową trudność. Od 2018 roku jestem opiekunem dwóch grup studentów Wydziału Farmaceutycznego, kierunek: Farmacja; realizujemy prace badawcze w ramach koła naukowego działającego

przy Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, GUMed. Prace studentów obejmują analizę związków małowcząsteczkowych (hormony tarczycy, parabeny, leki immunosupresyjne) w materiałach biologicznych z zastosowaniem metod opartych o techniki mikroekstrakcyjne (SPME) oraz elektroforezę kapilarną. Studenci są również przeze mnie prowadzeni podczas przygotowywania prezentacji posterowych na konferencje, jak również pracy pogładowej, która jest obecnie w recenzji (pt. *Ionic liquids, microextraction methods and capillary electrophoresis in biomedical research*). Prowadzę również zajęcia ćwiczeniowe i seminaryjne z przedmiotów: Chemia Leków (II i III rok farmacji) oraz fakultet pt. „Wpływ substancji psychoaktywnych na funkcjonowanie organizmu ludzkiego”. Na Wydziale Biologii prowadziłam wykłady z cyklu „Biologia systemów” (wykłady dla V roku Biologii Medycznej, Wydziału Biologii UG), jak również współprowadziłam wykłady obejmujące tematykę „Najnowsze osiągnięcia neurobiologii”, „Podstawy neurofarmakologii” oraz seminaria pt. *Pracowania Projektowa w zakresie „Nauczanie zgodne z Problem Based Learning”*. Od kilku lat jestem zaangażowana jako opiekunka studentów w ramach pracowni dyplomowej. Byłam promotorem 1 pracy magisterskiej i 6 prac licencjackich na kierunkach Biologia i Biologia Medyczna Wydziału Biologii, UG oraz pomagam w realizacji prac magisterskich w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GUMed.

Od kilku lat jestem również członkiem w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych takich jak: Gdańska Okręgowa Izba Aptekarska (członkostwo od 2015 roku), Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne i Cancer Epigenetics Society (od 2017 roku), Gdańska Okręgowa Komisja Rewizyjna (w latach 2015-2019 jako członek; na lata 2020-2024 jako przewodnicząca tej organizacji), a także delegatem na krajowe i okręgowe Zjazdy Aptekarzy (w latach 2016-2024).

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Od okresie od 2017 do 2020 roku uzyskałam szereg następujących naukowych nagród:

- w 2017 r Nagrodę Dziekana Wydziału Biologii za publikacje naukowe, oraz w tym samym roku Nagrodę zespołową 1. stopnia dla pracowników GUMed za „Rozwój nowoczesnych metod w analizie biomedycznej i farmaceutycznej”.

- W 2019 r Nagrodę Dziekana Wydziału Biologii za osiągnięcia naukowe (nagroda 1. Stopnia) oraz w tym samym roku Nagrodę Rektora GuMed II stopnia za „Opracowanie metod zmierzających do analizy neurotransmiterów i substancji leczniczych za pomocą technik elektromigracyjnych”.
- Zostałam doceniona za pracę, której jestem współautorem (A. Roszkowska, N. Miękus, T. Bączek. Application of solid phase microextraction in current biomedical research, Journal of Separation Science, 2019, 285-302), która znalazła się wśród 10% najczęściej cytowanych publikacji czasopisma Journal of Separation Science w latach 2018-2019.

•
Mój sumaryczny IF wynosi 69,567 punktów, całkowita ilość cytowani/ cytowania bez autocytowań według bazy Web of Science wynosi 99 / 68, indeks Hirscha według bazy Web of Science wynosi 6, a ilość punktów MNiSW wynosi 1281.

Natalia Miękus-Purwin