



**AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

Anna Roszkowska

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2020

- 1. Imię i nazwisko:** Anna Roszkowska
- 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

2009 – dyplom doktora nauk farmaceutycznych, Akademia Medyczna w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny), Wydział Farmaceutyczny. Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej. Tytuł rozprawy doktorskiej „*Wpływ zmian stężenia jonów wodorowych i potasowych na właściwości kinetyczno – regulacyjne deaminazy AMP z dojrzałego łożyska ludzkiego*” – promotor: prof. dr hab. Krystian Kaleta.

2006 – prawo wykonywania zawodu farmaceuty wydane przez Gdańską Okręgową Izbę Aptekarską

2003 – dyplom magistra farmacji, Akademia Medyczna w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny), Wydział Farmaceutyczny, kierunek Farmacja Apteczna. Praca magisterska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej. Tytuł pracy magisterskiej „*Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – wpływ zmian pH na aktywność i właściwości regulacyjne enzymu*” – promotor: prof. dr hab. Krystian Kaleta.

- 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

| | |
|------------------------|--|
| 2015 do chwili obecnej | Adiunkt, Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny |
| 2016 – 2017 | Postdoctoral fellow, Department of Chemistry, Prof. Pawliszyn Research Group, University of Waterloo, Canada |
| 2014 – 2015 | Asystent, Katedra i Zakład Farmakologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny |
| 2012 – 2014 | Wykładowca, Katedra i Zakład Farmakologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny; praca na umowę-zlecenie |

2003 – 2009

Słuchacz Dziennych Studiów Doktoranckich, Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Gdańsku

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Strategia analityczna w badaniach metabolomicznych, klinicznych i środowiskowych oparta na mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) w warunkach *in vivo*

b) Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe

Osiągnięcie naukowe przedstawione w ramach postępowania habilitacyjnego stanowi cykl 5 publikacji (prac oryginalnych), opublikowanych w latach 2018-2019. W czterech pracach jestem pierwszym autorem. Wszystkie publikacje zostały zamieszczone w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) z roku ukazania się publikacji równym **27,925** i łącznej wartości punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) wynoszącej **460**. Przedstawione prace są monotematyczne i dotyczą zastosowania nowoczesnej techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (ang. *solid-phase microextraction*, SPME) w badaniach na żywych organizmach (*in vivo*) w niecelowanych analizach metabolomicznych, badaniach środowiskowych oraz w terapeutycznym monitorowaniu leków, które wykonywałam podczas rocznego pobytu na stażu podoktorskim w grupie profesora Janusza Pawliszyna w University of Waterloo w Kanadzie. Praca w zespole twórcy techniki SPME była prowadzona z zachowaniem najwyższych standardów i jakości analiz oraz umożliwiła zapoznanie się z tajnikami technologii SPME, a także zagłębienie tematu złożonych przemian biochemicznych zachodzących w żywych organizmach zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Uzyskane wyniki potwierdziły znaczący potencjał technologii *in vivo* SPME w analizach nakierowanych na poszukiwanie potencjalnych biomarkerów zmian na poziomie molekularnym, ze szczególnym uwzględnieniem związków mało stabilnych i tych, występujących w śladowych ilościach w materiale biologicznym. Ponadto, opracowana technologia SPME umożliwiła dokładny pomiary stężenia leków oraz monitorowanie ich dystrybucji w tkankach stałych w warunkach *in vivo*.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

[H1] **A. Roszkowska**, M. Yu, V. Bessonneau, L. Bragg, M. Servos, J. Pawliszyn, Tissue storage affects lipidome profiling in comparison to in vivo microsampling approach, *Sci. Rep.* 8, 1-10 (2018)

IF = 4,011 / MNiSW = 40

[H2] **A. Roszkowska**, M. Yu, V. Bessonneau, L. Bragg, M. Servos, J. Pawliszyn, Metabolome profiling of fish muscle tissue exposed to benzo[a]pyrene using in vivo solid-phase microextraction, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 5, 431-435 (2018)*

IF = 6,934 / MNiSW = 140

*praca wyróżniona jako jedna z pięciu najlepszych publikacji w 2018 roku czasopisma *Environmental Science & Technology Letters* [1]

[H3] **A. Roszkowska**, M. Yu, V. Bessonneau, J. Ings, M. McMaster, R. Smith, L. Bragg, M. Servos, J. Pawliszyn, In vivo solid-phase microextraction sampling combined with metabolomics and toxicological studies for the non-lethal monitoring of the exposome in fish tissue, *Environ. Pollut.* 249, 109-115 (2019)

IF = 5,714 / MNiSW = 100

[H4] **A. Roszkowska**, M. Tascon, B. Bojko, K. Goryński, P.R. dos Santos, M. Cypel, J. Pawliszyn, Equilibrium ex vivo calibration of homogenized tissue for in vivo SPME quantitation of doxorubicin in lung tissue, *Talanta* 183, 304-310 (2018)

IF = 4,916 / MNiSW = 40

[H5] M. Huq, M. Tascon, E. Nazdrajic, **A. Roszkowska**, J. Pawliszyn, Measurement of free drug concentration from biological tissue by solid-phase microextraction: in-silico and experimental study, *Anal Chem*, 91, 7719-7728 (2019)

IF = 6,35 / MNiSW = 140

Sumaryczny IF = 27,925 / MNiSW = 460

IF/publikację = 5,585

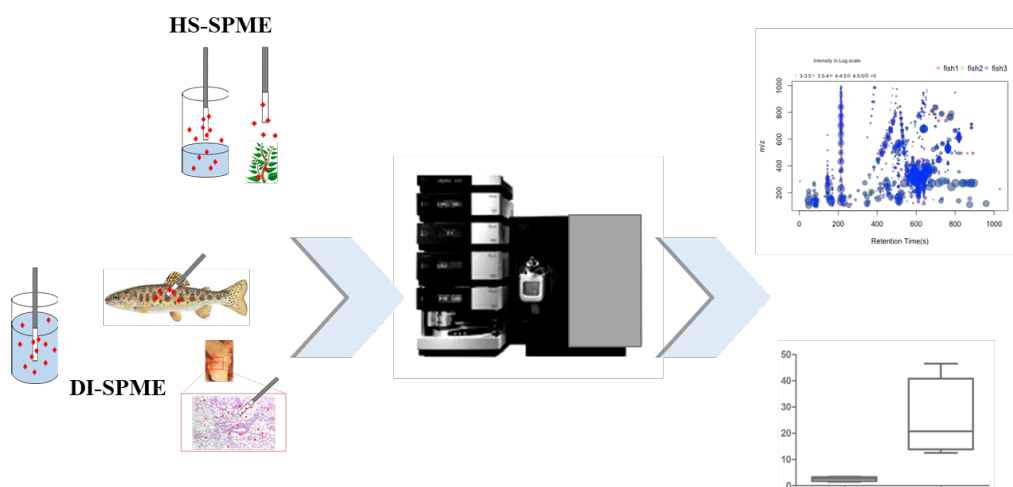
c) Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników**WPROWADZENIE*****Techniki ekstrakcji analitów***

Analiza substancji endogennych oraz ksenobiotyków to złożony, wieloetapowy proces, wymagający użycia precyzyjnych technik ekstrakcji oraz zaawansowanych urządzeń analitycznych, które pozwolą nie tylko na jakościowe, ale również ilościowe oznaczenie związków w materiale biologicznym. Jednym z kluczowych elementów procedury analitycznej jest wybór odpowiednio czulej, selektywnej i efektywnej techniki przygotowania próbki do analizy. Dotyczy to szczególnie izolacji związków ze złożonych matryc biologicznych, gdyż oprócz badanej substancji obecne są tam liczne związki pochodzenia egzo- i endogenne, które mogą zakłócić właściwą ekstrakcję i oznaczanie analitu/-ów i w konsekwencji wpłynąć na interpretację uzyskanych danych.

W teoretycznym ujęciu technika ekstrakcji obejmuje wydzielenie lub rozdzielenie składników mieszaniny pomiędzy dwie nie mieszące się ze sobą fazy, a także prowadzić może do usunięcia substancji balastowych oraz do zagęszczenia próbki, aby w efekcie umożliwić właściwe oznaczenie poziomu stężeń danego związku lub grupy związków [2]. Tradycyjne techniki izolacji analitów oparte są między innymi na ekstrakcji typu ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid extraction*, LLE), na ekstrakcji do fazy stałej (ang. *solid-phase extraction*, SPE) lub na prostej technice strącania białek (ang. *protein precipitation*, PPT). Często jednak obserwuje się tzw. efekt matrycy związany ze zbyt słabym oczyszczeniem próbki. Ponadto, metody te posiadają szereg wad związanych z długim czasem trwania analizy i zużyciem dużej ilości rozpuszczalników organicznych. W związku z tym w ostatnich latach konwencjonalne techniki ekstrakcji są coraz częściej zastępowane nowoczesnymi technikami, w których wykorzystuje się mniejsze objętości rozpuszczalników organicznych oraz materiału do badań, co w konsekwencji przyczynia się do zachowania zasad „zielonej chemii” [3,4]. Techniki mikroekstrakcji znajdują szerokie zastosowanie w analizach farmaceutycznych, w badaniach metabolomicznych, a także w badaniach z zakresu medycyny sądowej oraz w badaniach klinicznych i środowiskowych, gdyż umożliwiają ekstrakcję analitów z małych objętości/ilości konwencjonalnych (np. krew, mocz), jak i niekonwencjonalnych matryc biologicznych (np. ślina, włosy, tkanki organów wewnętrznych) [5,6]. Przykładem nowoczesnych technik przygotowania próbki do analizy jest będąca zminiaturyzowaną metodą SPE technika mikroekstrakcji do fazy stałej (ang. *solid-phase microextraction*, SPME).

Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)

Technologia SPME jest nowoczesną strategią izolacji związków małowcząsteczkowych (< 1000 Da), zarówno egzo- jak i endogennych z określonego układu badawczego. Technika ta została opracowana w latach 90-tych ubiegłego wieku przez profesora Janusza Pawliszyna z University of Waterloo w Kanadzie [7]. Początkowo stosowana była do analizy próbek środowiskowych, z czasem została również wdrożona do analizy produktów żywnościowych, a obecnie znajduje coraz szersze zastosowanie w badaniach leków oraz substancji endogennych (metabolitów) w obszarze badań farmaceutycznych i biomedycznych [8–10]. Jedną z cech, która odróżnia tę technikę od innych technik ekstrakcyjnych jest możliwość jednoczesnej izolacji i zateżenia analitów oraz oczyszczenie próbki, co sprawia, że możliwa jest szybka, prosta i wydajna ekstrakcja związków z różnych matryc oraz ich bezpośrednia analiza przy użyciu metod instrumentalnych, takich jak chromatografia cieczowa lub chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *liquid chromatography/gas chromatography mass spectrometry*, LC-MS/GC-MS). Technika SPME jest szczególnie pomocna, gdy celem badań jest identyfikacja śladowych ilości analitów, a matryca biologiczna jest bardzo złożona [11]. W zależności od charakteru substancji, którą chcemy wyekstrahować, SPME dzielimy na dwa rodzaje: HS-SPME (ang. *head space*, HS) do ekstrakcji substancji lotnych (ekstrakcja w fazie nadpowierzchniowej) oraz DI-SPME (ang. *direct immersion*, DI) do ekstrakcji związków nielotnych (faza ekstrakcyjna umieszczona bezpośrednio w badanej próbce) (Ryc. 1). Oba rodzaje SPME są szeroko stosowane w ekstrakcji analitów ze złożonych matryc biologicznych w badaniach metabolomicznych, w terapeutycznym monitorowaniu stężenia leków, a także w analizach toksykologicznych i z zakresu medycyny sądowej [12].



Ryc. 1. Rodzaje ekstrakcji SPME w połączeniu z analizą instrumentalną w badaniach celowanych i niecelowanych.

Wyekstrahowane za pomocą SPME związki małowcząsteczkowe są adsorbowane na złożu i nie ulegają procesom degradacji lub biotransformacji podczas przechowywania próbek (tzw. "quenching"). Na szczególną uwagę zasługuje również zastosowanie SPME w analizach prowadzonych w czasie rzeczywistym, jako, że dostępne w SPME materiały biokompatybilne mogą być wprowadzone/umieszczone bezpośrednio w organizmie żywym (*in vivo*) [13,14]. Dzięki takiemu rozwiązaniu uproszczony zostaje etap przygotowania próbki, eliminując potrzebę pobierania materiału do badań (np. pobranie krwi, biopsja tkanki). ***In vivo* SPME** pozwala na monitorowanie zarówno poziomu leków, jak i związków endogennych w czasie rzeczywistym w organizmach żywych na wielu płaszczyznach, przykładowo jako odpowiedź na zastosowaną farmakoterapię, czy jako reakcja organizmu na zmieniające się warunki środowiska.

Teoretyczne podstawy in vivo SPME

Dostępność wielu rodzajów sorbentów (złóż) SPME stanowiących fazę ekstrakcyjną, a także ich biokompatybilność w organizmie żywym sprawia, że mogą być one stosowane do badań *in vivo* powodując niewielką inwazyjność w stosunku do badanej tkanki. Dobór właściwego złoża odgrywa istotną rolę w procesie ekstrakcji związków o różnej polarności, obecnych w analizowanej próbce w różnych stężeniach. W zależności od grupy badanych związków, termicznie stabilne złoża są używane w chromatografii gazowej, zaś złoża odporne na działanie rozpuszczalników organicznych używane są w analizach z użyciem chromatografii cieczowej. Zastosowanie odpowiedniego sorbentu ma kluczowe znaczenie, szczególnie jeśli ekstrakcji ulegają jednocześnie związki hydrofilowe i hydrofobowe, jak to ma miejsce w niecelowanych analizach metabolomicznych. Biokompatybilne złoża typu C18 i „mixed-mode” (połączenia C18 i kwasu benzenosulfonowego) mogą być umieszczane bezpośrednio w tkankach i narządach systemu żywego, podobnie jak złoża HLB (ang. *hydrophilic lipophilic balance*), które służą do jednoczesnej ekstrakcji analitów o różnej polarności [15]. Ponadto do przeprowadzenia badań metodą *in vivo* SPME wykorzystuje się różne formaty SPME, w tym **ostrza** i **włókna** pokryte cienką warstwą złoża, które stanowią cząstki sorbentu wielkości mikrona zawieszone w biokompatybilnym polimerze (poliakrylonitrylu). Zawiesina po niesieniu na ostrze/włókno tworzy gładką powierzchnię charakteryzującą się małymi usieciowanymi porami umożliwiającymi dyfuzję wyłącznie związkom małowcząsteczkowym, natomiast adsorpcja wielkocząsteczkowych składników matrycy, takich jak białka czy krwinki czerwone na powierzchni sorbetu nie jest możliwa. Odzyskiwanie zaadsorbowanych na sorbencie analitów uzyskuje się przez ich desorpcję do małej objętości rozpuszczalnika

organicznego, który następnie poddawany jest analizie instrumentalnej, np. LC-MS, GC-MS lub elektroforetycznej (ang. *capillary electrophoresis*, CE) [16]. W ostatnich latach wprowadzono liczne modyfikacje umożliwiające szybszą i prostszą analizę wyekstrahowanych związków poprzez pominięcie etapu chromatograficznego i bezpośrednie sprzężenie (ang. *direct coupling*) narzędzi SPME z MS. Przykładami takich rozwiązań jest system MOI (ang. *microfluidic open interface*) oraz metoda CBS (ang. *coated blade spray*), które poprzez modyfikację wcześniej stosowanej fazy ekstrakcyjnej umożliwiają szybką analizę stężenia analitu/-ów w próbce [17,18]. Zaproponowane rozwiązania wpisują się w rosnący trend dążący do automatyzacji protokołów diagnostycznych i obok urządzeń takich jak iKnife czy MasSpec Pen, będą mogły służyć jako narzędzia do szybkiej analizy laboratoryjnej na oddziałach intensywnej terapii i salach operacyjnych [19,20].

Technika SPME jest rodzajem ekstrakcji, w którym jedynie frakcja analitu, która nie jest związana z elementami komórkowymi, np. z białkami zostaje wyizolowana z badanej matrycy biologicznej. Ma to szczególnie znaczenie w badaniach farmakokinetycznych i toksykologicznych, gdyż tylko wolna postać danej substancji determinuje jej aktywność w określonym układzie. Ponadto jest to również istotne w badaniach *in vivo*, ponieważ taki rodzaj ekstrakcji nie narusza równowagi biochemicznej na poziomie molekularnym, głównie w odniesieniu do związków małowczątkowych występujących na niskich poziomach w tkance. Opracowano różne metody umożliwiające wyznaczenie stężeń badanych analitów w próbkach biologicznych, wśród nich najczęściej stosowany jest model kalibracji w stanie równowagi (ang. *equilibrium calibration model*) lub model kalibracji przed osiągnięciem stanu równowagi (ang. *pre-equilibrium calibration model*), taki jak kalibracja kinetyczna (ang. *kinetic calibration*) [21]. W pierwszym z wymienionych modeli, wyekstrahowana ilość analitu jest w równowadze chemicznej z ilością analitu obecną w badanej próbce i można ją wyrazić jako:

$$n_e = C_0 \frac{K_{fs} V_s V_f}{K_{fs} V_f + V_s}$$

gdzie:

- n_e - ekstrahowana ilość analitu,
- C_0 - początkowe stężenie analitu w próbce,
- V_s - objętość próbki,
- V - powierzchnia fazy ekstrakcyjnej,
- K_{fs} - współczynnik podziału analitu między fazą ekstrakcyjną a próbką.

Wykazano, że w przypadku dużych objętości matrycy, kiedy $V_s \gg K_{fs}V_f$, przedstawiony powyżej wzór może być uproszczony do:

$$n_e = C_0 K_{fs} V_f$$

Warto podkreślić, że w tym modelu kalibracji ilość wyekstrahowanego analitu nie jest zależna od czynników hydrodynamicznych, takich jak przepływ krwi w organizmie żywym. Jednakże wadą tego modelu w przypadku niektórych analitów jest długi czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi. W związku z tym alternatywnym modelem kalibracji, szczególnie do badań *in vivo* jest kalibracja typu 'pre-equilibrium' umożliwiająca znacznie krótszy czas ekstrakcji w porównaniu z metodą ekstrakcji równowagowej [22]. Jednak w tym modelu musi zostać zachowany warunek liniowości w odniesieniu do szybkości procesu ekstrakcji, co często w badaniach na żywych organizmach jest trudne do osiągnięcia ze względu na wpływ elementów matrycy na ilość ekstrahowanego analitu. Aby zminimalizować wpływ czynników zewnętrznych, model kalibracji kinetycznej opiera się na wstępnym obciążeniu włókna deuterowanym analogiem danego związku [23]. Zastosowanie tej metody kalibracji zwiększa dokładność i precyzję analizy między innymi poprzez uwzględnienie wpływu niektórych czynników, w tym temperatury, na ilość wyekstrahowanego związku. Jednak jednym z głównych ograniczeń tego modelu jest brak możliwości zastosowania w większości badań *in vivo*, szczególnie tych u ludzi, gdyż wiąże się to z koniecznością wprowadzenia związku egzogenego, często o nieznanym działaniu, do organizmu żywego.

SPME w badaniach metabolomicznych

Analiza metabolomiczna w badaniach z obszaru mikrobiologii, biologii roślin i zwierząt, a także ludzi pozwala lepiej zrozumieć sieć zależności biochemicznych oraz zagłębić problem złożonych interakcji występujących w określonym układzie biologicznym. Małocząsteczkowe związki endogenne są potencjalnymi markerami chorób, jednakże często występują w płynach i tkankach ustrojowych w bardzo niskich stężeniach, a do ich ekstrakcji i oznaczenia niezbędne są czułe i precyzyjne metody analityczne. Tradycyjne techniki ekstrakcji używane w takich analizach mają często liczne ograniczenia w możliwości scharakteryzowania rzeczywistego profilu biochemicznego danej tkanki/organu. Wynika to głównie z faktu zastosowania standardowego protokołu analitycznego, obejmującego pobranie tkanki (np. biopsję), przechowywanie/mrożenie, homogenizację czy też użycie rozpuszczalników organicznych, które prowadzić mogą do dezaktywacji i/lub degradacji metabolitów i w ten sposób zaburzają właściwy obraz metabolomu [24]. Natomiast mała

inwazyjność, zdolność izolacji nawet śladowych ilości metabolitów ze złożonych matryc biologicznych, a także wykonanie ekstrakcji bez konieczności pobierania materiału biologicznego sprawia, że technika SPME jest coraz szerzej stosowana w celowanych i niecelowanych badaniach z obszaru metabolomiki [14,16,25].

Przykładowo, metoda HS-SPME-GC-MS przy użyciu złoża polidimetylosiloksan/diwinylbenzen (PDMS/DVB) została użyta w analizach celowanych do równoczesnej ekstrakcji i analizy siedmiu lotnych metylowych estrów kwasów tłuszczowych jako potencjalnych markerów procesu różnicowania komórek macierzystych w komórki tłuszczowe [26]. Z kolei metoda DI-SPME-GC-MS z użyciem złoża typu karboksen (CAR)/PDMS/DVB umożliwiła opracowanie protokołu do jednoczesnego oznaczania ilościowego poliamin w moczu ludzkim [27]. Związki te uważane są za potencjalne markery nowotworowe, a opracowana metoda w sposób szybki umożliwia oznaczenie nawet niewielkich ilości tych związków w materiale biologicznym. Połączenie DI-SPME z micelną elektrokinetyczną chromatografią kapilarną (ang. *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) oraz z LC-MS umożliwiło izolację i analizę ilościową szeregu neurotransmitterów w różnych matrycach biologicznych [28,29]. Związki te uważane są za markery chorób nowotworowych, takich jak guzy chromochłonne nadnerczy czy zwojak zarodkowy współczulny (łac. *neuroblastoma*), jednak ich oznaczenie jest skomplikowane, gdyż są to związki niestabilne i występują w płynach i tkankach ustrojowych w bardzo niskich stężeniach. Zastosowanie cienkich włókien typu *mixed-mode* w połączeniu z analizą LC-MS/MS umożliwiło wydajną ekstrakcję i oznaczenie na poziomie nanogramów czterech polarnych neurotransmitterów w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego i mózgu szczurów w badaniach *in vitro*, a także w badaniach *in vivo* u swobodnie poruszających się zwierząt [30]. Postęp technologii *in vivo* SPME umożliwił także opracowanie metody jednoczesnej ekstrakcji i analizy ilościowej czterech neuroprzekaźników w korze mózgu i prądkowiu u żywych małych podczas badań behawioralnych [31,32]. W celu izolacji wybranych analitów niezbędna była modyfikacja włókien SPME poprzez miniaturyzację fazy ekstrakcyjnej oraz średnicy samego włókna. Ostatecznie do analiz wybrano złożo HLB o całkowitej średnicy włókna wynoszącej 195 µm. W najnowszych badaniach z obszaru neurobiologii, technologię *in vivo* SPME użyto do monitorowania poziomu 52 eikozanoidów (oksylipin) w mózgu żywych szczurów [33]. W tym celu zastosowano włókna typu C18 o 4 mm długości i 290 µm średnicy. Uzyskany profil wyekstrahowanych związków porównano z analizami próbek pobranych pośmiertnie od zwierząt i wykazano liczne rozbieżności w składzie oksylipin (brak wielu metabolitów

w analizach post-mortem), potwierdzając użyteczność narzędzi *in vivo* SPME do precyzyjnego i dokładnego określenia profilu metabolicznego w czasie rzeczywistym.

Określenie zmian, jakim podlegają małowcząsteczkowe związki endogenne pod wpływem bodźców zewnętrznych to istotny element w wyjaśnieniu molekularnych procesów wewnątrzkomórkowych leżących u podstaw patomechanizmów wielu chorób. W niecelowanych analizach metabolomicznych ekstrakcję HS-SPME wykorzystano głównie do analizy lotnych związków organicznych (LZO, ang. *volatile organic compounds*, VOCs) w różnych roślinnych i zwierzęcych próbkach biologicznych [34]. U ludzi profil LZO wyznaczono między innymi w wydychanym powietrzu, moczu i skórze [35,36]. Przykładowo, złoże CAR/PDMS wykorzystano do analizy HS-SPME-GC-MS w celu określenia korelacji między profilem LZO w moczu a klinicznie istotnymi parametrami, takimi jak poziom antygeny swoistego gruczołu krokowego (ang. *prostate specific antigen*, PSA) w diagnozowaniu pacjentów z rakiem prostaty. Dzięki użyciu HS-SPME możliwa była również analiza LZO w skórze w celu określenia stopnia rozwoju melanomy, gdyż wykazano, że profil metabolomiczny skóry może być pomocnym narzędziem diagnostycznym, odzwierciedlającym stany patofizjologiczne organizmu [37]. Z kolei analizy DI-SPME z użyciem złoża typu *mixed-mode* umożliwiły jednoczesną ekstrakcję szeregu związków hydrofilowych i hydrofobowych, w tym acylokarnityn, aminokwasów i związków lipidowych w prądkowiu żywych szczurów [30]. Dzięki automatyzacji procesu ekstrakcji SPME i użyciu złoża HLB możliwa była jednoczesna ekstrakcja 96 próbek osocza w celu izolacji związków endogennych i analizy metabolomu podczas monitorowania funkcji wątroby po przeszczepie [38]. Natomiast bezpośrednia analiza niecelowana tego organu podczas przeszczepu możliwa była dzięki umieszczeniu biokompatybilnych włókien SPME w różnych płatach wątroby świni w warunkach *in vivo* w celu identyfikacji związków endogennych i poszukiwania potencjalnych biomarkerów funkcji wątroby [39].

SPME w badaniach substancji leczniczych

Wiedza na temat właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych danej substancji leczniczej, w tym jej stężenia i dystrybucji tkankowej oraz mechanizmu działania niezbędna jest w analizach farmaceutycznych i toksykologicznych, a także w fazie przedklinicznej i klinicznej badań nad nowymi lekami. Możliwość szybkiego i prostego oznaczenia danej substancji jest zatem istotna nie tylko dla badaczy opracowujących nowoczesne metody analityczne, ale również dla sprawnej pracy laboratoriów diagnostycznych

oraz dla personelu medycznego, umożliwiając ściśle monitorowanie farmakoterapii u pacjentów. Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się wzrost zainteresowania SPME w analizach leków, gdyż przy użyciu tej technologii możliwe jest określenie nawet śladowych ilości związków zarówno w próbkach środowiskowych, żywnościowych, jak i w materiale biologicznym [9,40].

Dotychczas za pomocą tej techniki wyekstrahowano wiele leków obecnych na Liście Leków Podstawowych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *WHO Model List of Essential Medicines*) i opracowano szereg protokołów dotyczących postępowania analitycznego w badaniach podstawowych, a także w badaniach klinicznych [16,41]. Główna zaleta SPME w analizie leków wynika z zasad leżących u podstaw tego procesu, w którym to izolacji ulega jedynie wolna, nie związana z elementami tkankowymi frakcja determinująca biodostępność i aktywność substancji czynnej [42]. Ma to szczególnie znaczenie w przypadku, kiedy leki posiadają wąski zakres terapeutyczny i w wyższych stężeniach mogą wywoływać efekty toksyczne w organizmie żywym. Przykładowo, przy użyciu HS-SPME możliwa była ekstrakcja substancji aktywnych działających w ośrodkowym układzie nerwowym, takich jak opioidy, leki przeciwdepresyjne, czy leki przeciwpsychotyczne z konwencjonalnych materiałów biologicznych (krew, osocze, mocz) [43,44]. Z kolei złożo PDMS zastosowano w DI-SPME i HS-SPME w połączeniu z GC-MS do ekstrakcji i analizy substancji psychoaktywnych z próbek potu, śliny czy włosów [45,46]. Ponadto technika SPME umożliwiła jednoczesną izolację i oznaczenie ilościowe ponad 100 związków o różnych właściwościach fizykochemicznych, będących potencjalnymi substancjami dopingowymi w sporcie. Użycie w pełni zautomatyzowanej techniki SPME pozwoliło na jednoczesną analizę 96 próbek moczu i znacznie zmniejszyło ogólny czas analizy; dla pojedynczej próbki wynosił on około 2 minut [47]. Ponadto, opracowana metoda w pełni spełniała kryteria Światowej Organizacji Antydopingowej (ang. *World Anti-Doping Agency*, WADA) dla metod analitycznych. Metoda SPME umożliwiła również ekstrakcję wybranych antybiotyków z osocza ludzkiego, a także była wykorzystywana do analizy leków stosowanych w chorobach układu sercowo-naczyniowego oraz w terapii bólu [16]. Ponadto, z jej udziałem przeprowadzono szeroko zakrojone badania farmakokinetyczne dotyczące oznaczenia poziomu kwasu traneksamowego w osoczu u pacjentów z niewydolnością nerek poddanych zabiegom kardiochirurgicznym, co umożliwiło opracowanie schematu indywidualnego dawkowania leku [48]. Postęp w technologii SPME doprowadził również do opracowania protokołu opartego na metodzie CBS-MS/MS jako nowoczesnego narzędzia do szybkiego oznaczania wybranych leków immunosupresyjnych we krwi [49]. Użycie w pełni zautomatyzowanej procedury analitycznej

w znacznym stopniu uprościło proces przygotowania próbki i jej analizę, pomijając etap rozdziału chromatograficznego.

Aktualnie, coraz więcej badań koncentruje się na bezpośredniej ekstrakcji i oznaczeniu stężenia leków w tkankach i narządach w układzie żywym w warunkach *in vivo* przy użyciu biokompatybilnych ostrzy i włókien SPME. Po raz pierwszy zastosowanie włókien SPME w analizach *in vivo* przeprowadzono w roku 2011 i dotyczyło ono izolacji i monitorowania poziomu benzodiazepin we krwi psów [50]. Od tego czasu nastąpił znaczny postęp w rozwoju biokompatybilnych złóż i dostosowania formatów SPME do analiz na żywych modelach zwierzęcych. Poprzez bezpośrednie umieszczenie cienkich włókien SPME typu C18 w różnych płatach wątroby świni możliwe było monitorowanie poziomu i dystrybucji tkankowej metyloprednizolonu i jego metabolitów, zarówno u dawcy jak i biorcy podczas przeszczepu tego organu [39]. Użycie membran SPME ze złożem PDMS–HLB umieszczonych w jamie ustnej umożliwiło nieinwazyjną ekstrakcję kofeiny i jej metabolitu (paraksantyny), a także benzokainy i acetaminofenu w ślinie po doustnym podaniu tych leków [51]. *In vivo* SPME znajduje również zastosowanie w badaniach środowiskowych i toksykologicznych dotyczących kontroli stężenia ksenobiotyków w środowisku wodnym oraz ich dystrybucji i akumulacji w organizmach żywych [52]. Przeprowadzone analizy *in vivo* SPME wykazały, że w mięśniach ryb żyjących w warunkach naturalnych obecne były leki z różnych grup, w tym niesteroidowe leki przeciwzapalne oraz leki przeciwdepresyjne [53,54]. Zastosowanie *in vivo* SPME umożliwiło także monitorowanie poziomu wybranych substancji czynnych u ryb bez potrzeby pobierania materiału do badań. Wyżej przedstawione przykłady klinicznych i środowiskowych zastosowań *in vivo* SPME jednoznacznie wskazywały, że ta technika ekstrakcyjna może być również obiecującym narzędziem w badaniach u ludzi, gdyż w dobie rozwijającego się trendu medycyny spersonalizowanej, takie rozwiązanie analityczne może w znacznym stopniu przyczynić się do poprawy skuteczności oraz szybkości analiz w obszarze badań farmaceutycznych i klinicznych.

CEL BADAŃ

Możliwości, jakie dostarcza technologia *in vivo* SPME stały się inspiracją do prowadzonych przez mnie badań naukowych, których wyniki zostały opisane w pięciu pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego [H1–H5]. Głównym celem badań było opracowanie i zastosowanie zaawansowanych narzędzi analitycznych opartych na technice SPME do izolacji małowcząsteczkowych związków endogennych (metabolitów) oraz wybranych leków z tkanek zwierzęcych, w tym także ludzkich. Możliwość wglądu w złożony metabolom organizmów żywych oparty na rzetelnych wynikach analitycznych umożliwia śledzenie zmian patologicznych zachodzących na poziomie molekularnym, natomiast monitorowanie stężenia leków w warunkach *in vivo* jest jedną z najbardziej efektywnych metod personalizacji farmakoterapii. Zasadnicze cele badawcze przedstawione w ramach osiągnięcia naukowego obejmowały:

- I. Analizę profilu lipidomicznego mięśni żywych ryb z zastosowaniem techniki *in vivo* SPME oraz ocenę zmian zachodzących w tkance po rocznym przechowywaniu w -80°C.
- II. Poznanie profilu metabolomicznego mięśni żywych ryb z wykorzystaniem techniki *in vivo* SPME w niecelowanych badaniach metabolomicznych z zakresu analiz środowiskowych. Badania te nakierowane były na poszukiwanie potencjalnych biomarkerów zmian na poziomie molekularnym w organizmach ryb żyjących:
 - a) w warunkach laboratoryjnych (w obecności benzo[a]pirenu)
 - b) w warunkach naturalnych (w obszarach przemysłowych).
- III. Opracowanie metody oznaczania doksorubicyny w tkance płucnej z zastosowaniem techniki SPME-LC/MS. Wymagało to przeprowadzenia badań dotyczących:
 - a) optymalizacji parametrów wpływających na izolację leku w warunkach *in vivo* z płuc podczas zabiegu operacyjnego
 - b) pomiaru wolnej frakcji leku ekstrahowanego z użyciem narzędzi SPME z tkanki płucnej na podstawie analiz laboratoryjnych oraz opracowanego modelu matematycznego *in silico*.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

I. Zastosowanie technologii *in vivo* SPME w niecelowanych analizach metabolomicznych i badaniach środowiskowych

[H1] A. Roszkowska, M. Yu, V. Bessonneau, L. Bragg, M. Servos, J. Pawliszyn, Tissue storage affects lipidome profiling in comparison to *in vivo* microsampling approach, *Sci. Rep.* 8, 1-10 (2018)

[H2] A. Roszkowska, M. Yu, V. Bessonneau, L. Bragg, M. Servos, J. Pawliszyn, Metabolome profiling of fish muscle tissue exposed to benzo[a]pyrene using *in vivo* solid-phase microextraction, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 5, 431-435 (2018)

[H3] A. Roszkowska, M. Yu, V. Bessonneau, J. Ings, M. McMaster, R. Smith, L. Bragg, M. Servos, J. Pawliszyn, *In vivo* solid-phase microextraction sampling combined with metabolomics and toxicological studies for the non-lethal monitoring of the exposome in fish tissue, *Environ. Pollut.* 249, 109-115 (2019)

Dostępność nowoczesnych narzędzi i technik analitycznych, takich jak *in vivo* SPME umożliwia rozwój badań nad poszukiwaniem małowcząsteczkowych związków endogennych (metabolitów) będących wskaźnikiem zachodzących procesów biochemicznych w warunkach fizjologicznych lub patologicznych w organizmie żywym, a także mogących stanowić podstawę odpowiedzi organizmu na zastosowaną farmakoterapię lub na zmieniające się warunki środowiskowe wynikające z zanieczyszczenia wód, powietrza czy gleby [55]. Zagadnienia z zakresu niecelowanych analiz metabolomicznych z użyciem technologii SPME stanowią temat przewodni trzech prezentowanych prac [H1-H3] i realizowane były w ramach środków uzyskanych z Resortu Środowiska rządu kanadyjskiego w ramach funduszu przeciwdziałającego zniszczeniom środowiska naturalnego (Environmental Damages Fund; grant EC-129114, tytuł grantu: „Integrated approach to monitoring aquatic ecosystem health”).

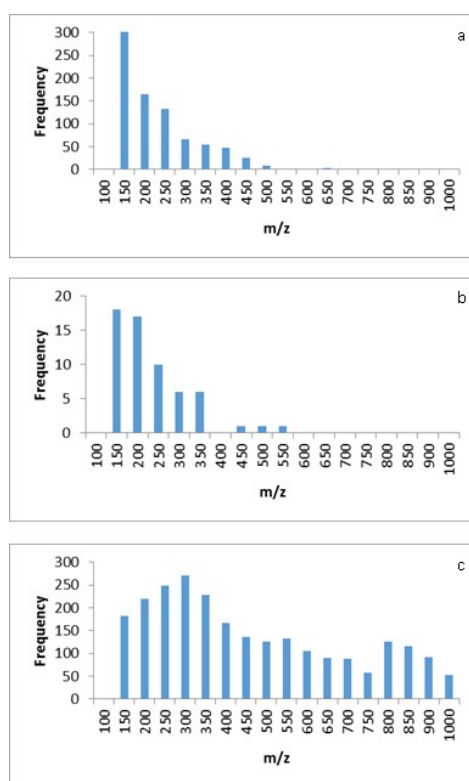
W pierwszym z przeprowadzonych projektów zastosowałam technikę SPME do analizy profilu biochemicznego tkanki stałej u ryb z rodziny łososiowatych (*Oncorhynchus mykiss*) [H1], a także do oceny wpływu czasu na profil lipidomiczny mięśni po rocznym przechowywaniu tkanek w niskiej temperaturze. Większość aktualnych badań z obszaru metabolomiki dotyczy analiz przeprowadzanych na tkankach płynnych, natomiast niewiele doniesień odnosi się do metabolomu tkanek stałych [56]. W prezentowanej pracy, ekstrakcję SPME w warunkach *in vivo* przeprowadzono z mięśni nadosiowych ryb przy użyciu biokompatybilnych włókien typu *mixed-mode*, a następnie włókna zamrażano w -80°C do czasu analizy instrumentalnej LC-MS. Równolegle, po zakończeniu ekstrakcji *in vivo* SPME, ryby uśmiercano i pobierano kawałki mięśni, zamrażano w -80°C i przechowywano przez okres 1

roku. Po tym czasie, przeprowadziłam ekstrakcję *ex vivo* SPME z rozmrożonych tkanek, a następnie kawałki mięśni homogenizowałam i poddawałam tradycyjnej ekstrakcji typu ciało stałe-ciecz (ang. *solid-liquid extraction*, SLE) w celu porównania profili metabolomicznych mięśni ryb przy użyciu obu technik [H1].

W ocenie składu biochemicznego mięśni ryb skupiłam się na analizie związków o budowie lipidowej (analiza lipidomiczna), które oprócz znanej roli budulcowej błon komórkowych oraz magazynu energii, pełnią również funkcje cząstek sygnałowych i uczestniczą w licznych ścieżkach przemian biochemicznych organizmu (bioaktywne lipidy) [57]. Do opisanego i zobrazowania zależności profilu lipidomicznego posłużyły zaawansowane metody statystyczne i bioinformatyczne. W analizach instrumentalnych, a zwłaszcza tych prowadzonych z wykorzystaniem spektrometrii mas, uzyskuje się bowiem ogrom danych, których opracowanie możliwe jest jedynie dzięki użyciu programów dedykowanego do tego rodzaju analiz. Uzyskane dane metabolomiczne zostały poddane analizie (ang. *pre-processing*) z użyciem oprogramowania XCMS, a następnie otrzymane piki poddano wstępnej identyfikacji tzw. „*features*” do odpowiadających im związków małowcząsteczkowym przy użyciu programu xMSannotator Integrative Scoring Algorithm, który oparty jest na wielowymiarowej strategii uwzględniającej parametry takie jak: intensywność sygnału analitów, czas retencji, masa monoizotopowa czy obecność izotopów/adduktów [58,59]. Jako referencyjną bazę danych do badań lipidomicznych użyto LIPID MAPS [60].

Standardowo pobrany materiał biologiczny przeznaczony do analiz *ex vivo* SPME i SLE, jest zazwyczaj przechowywany w niskiej temperaturze do momentu właściwej ekstrakcji i analizy instrumentalnej [61]. Na podstawie uzyskanych danych dla fragmentów mięśni ryb zaobserwowałam jednak istotne różnice w ilości związków lipidowych wyekstrahowanych za pomocą *in vivo* SPME oraz *ex vivo* SPME i wykazałam znaczący, bo aż ponad 10-ciokrotny spadek ilości metabolitów po upływie rocznego przechowywania tkanek (Ryc. 2).

Metabolity o budowie lipidowej, takie jak kwasy tłuszczowe, hormony steroidowe, niektóre witaminy obecne w żywych rybach nie zostały wykryte w tkance mięśniowej po rocznym przechowywaniu. Technika *in vivo* SPME dostarcza zatem informacji o składzie szeregu związków endogennych, zarówno stabilnych, jak i niestabilnych chemicznie lub ulegających szybkim biotransformacjom w organizmie żywym. Wykazałam, że długoterminowe przechowywanie próbek negatywnie wpłynęło na stabilność związków małowcząsteczkowych, co może wynikać z degradacji/dezaktywacji metabolitów pod wpływem różnych czynników, takich jak enzymy, bądź też związki te mogą ulegać procesom agregacji tworząc wielkowcząsteczkowe struktury, których włókna SPME nie są w stanie wyekstrahować.



Ryc. 2. Histogram przedstawiający rozłożenie mas cząsteczkowych dla wykrytych pików dla danych uzyskanych z (a) *in vivo* SPME; (b) *ex vivo* SPME (po rocznym przechowywaniu tkanki); (c) SLE (po rocznym przechowywaniu tkanki) [na podstawie [H1]].

W przeciwieństwie do profilu lipidomicznego uzyskanego na podstawie danych z analiz ekstraktów SPME, analizując ekstrakty SLE wykazałam obecność szeregu związków lipidowych o dużych masach cząsteczkowych (ok. 800-1000 Da), należących głównie do grupy fosfolipidów, które stanowią główny element składowy błon komórkowych (Ryc. 2). Wskazuje to, że użycie odczynników organicznych i/lub homogenizacja tkanki prowadzić mogą do dysocjacji połączeń błonowych i uwolnienia szeregu związków endogennych. Zatem SLE dostarcza informacji o profilu metabolitów, które w nienaruszonej (niepoddanej homogenizacji) tkance nie mogą być wyekstrahowane, gdyż związki te związane są prawdopodobnie z elementami tkankowymi. W przypadku techniki SPME ekstrakcji uległa jedynie wolna, niezwiązana frakcja lipidów w tkance mięśniowej. Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych badań potwierdziłam, że istotą technologii *in vivo* SPME jest możliwość ekstrakcji krótkotrwałych związków przejściowych oraz niestabilnych metabolitów należących jedynie do wolnej/aktywnej frakcji analitów obecnych w matrycy. Tym samym, technika ta

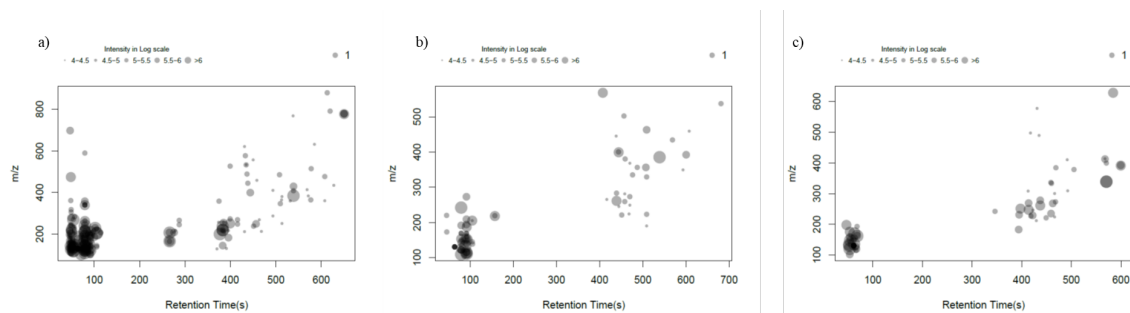
pozwala uzyskać cenne informacje o licznych szlakach biochemicznych zachodzących w organizmie żywym. Na podstawie uzyskanych danych wykazałam, że zarówno rodzaj zastosowanej techniki ekstrakcji, jak i przechowywanie próbek biologicznych są kluczowymi elementami procesu analitycznego, które mogą mieć istotny wpływ na uzyskany profil danych lipidomicznych. Do pełnego scharakteryzowania tkanki, szczególnie w badaniach z zakresu lipidomiki, istotnym wydaje się jednak zastosowanie obu technik – SPME i SLE.

Zmiany na poziomie molekularnym zachodzące w organizmach żywych pod wpływem różnych bodźców, takich jak zanieczyszczenie środowiska, drobnoustroje czy ksenobiotyki stanowią podstawy tzw. ekspozomu (ang. *exposome*) [62,63]. Istniejąca od ponad 10 lat teoria zakłada, że czynniki zewnętrzne wpływają na niegenomowe przemiany w organizmie, rzutując na jego funkcjonowanie na każdym etapie życia. Ekspozom znajduje coraz szersze uznanie w badaniach naukowych z zakresu metabolomiki [64]. Zagłębiając temat ekspozomu, w kolejnych etapach prowadzonych badań skupiłam się na analizie potencjalnego wpływu czynników egzogennych na zmiany metabolomiczne w mięśniach ryb [H2, H3]. Badania wpływu ekspozomu na profil metabolomiczny przy użyciu technologii *in vivo* SPME rozpoczęłam od analizy mięśni ryb poddanych ekspozycji na benzo[a]piren (BaP) [H2]. BaP to wielopierścieniowy węglowodór aromatyczny, który jest jednym z głównych czynników zanieczyszczenia środowiska, powstający podczas niepełnego spalania substancji organicznych. Związek ten występuje w dymie papierosowym i spalinach. Obecność BaP i jego metabolitów w organizmach żywych powoduje zakłócenie metabolizmu komórkowego i wywiera silne działanie rakotwórcze, mutagenne i cytotoksyczne [65].

Badania przeprowadzono na modelu typu „*case-control*” złożonym z trzech grup ryb – jednej grupy kontrolnej oraz dwóch grup doświadczalnych, które przebywały w wodzie zawierającej subletalne, czyli znacznie osłabiające żywotność organizmu, ale nie powodujące natychmiastowej śmierci poziomy BaP. Była to odpowiednio grupa niskiej dawki (1 ng/L) i grupa wysokiej dawki (10 ng/L). Aby zminimalizować wpływ innych czynników na przemiany molekularne, pozostałe parametry, takie jak temperatura i dieta były kontrolowane i utrzymywane na stałym poziomie przez 14 dni trwania eksperymentu. Ekstrakcję *in vivo* SPME przeprowadzono w warunkach kontrolowanych (laboratoryjnych) na tym samym gatunku ryb, co w opisanych poprzednio badaniach [H1] i przy użyciu włókien typu *mixed-mode* o grubości 45 µm. Na podstawie ekstrakcji wykonanych po pierwszym i 14-tym dniu od momentu rozpoczęcia eksperymentu określiłam zależne od dawki i czasu ekspozycji na BaP zmiany w metabolomie ryb. Podobnie jak w poprzednim badaniu [H1], do analizy otrzymanych danych i wstępnej identyfikacji związków użyto oprogramowania xMSannotator, natomiast

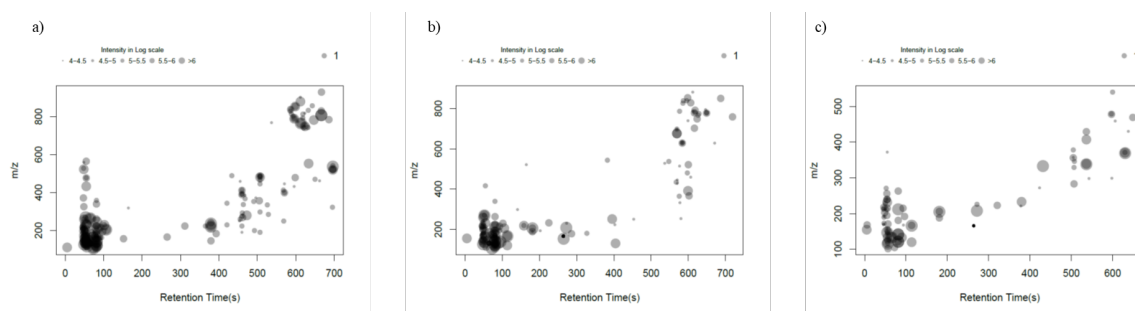
jako referencyjną bazę danych w badaniach metabolomicznych użyto Human Metabolome Data Base (HMDB) [66].

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazałam dużą zmienność profilu metabolomicznego u ryb w zależności od stężenia BaP w porównaniu do profilu grupy kontrolnej już po pierwszym dniu eksperymentu, wskazując na istotny wpływ obecnego w środowisku wodnym związku toksycznego na procesy biochemiczne w mięśniach ryb (Ryc. 3).



Ryc. 3. Profil zależności masy (m/z) od czasu retencji dla związków wyekstrahowanych za pomocą *in vivo* SPME po 1-szym dniu eksperymentu. (a) grupa kontrolna ryb, (b) grupa ryb przebywająca w wodzie zawierającej BaP o stężeniu 1 ng/L, (c) grupa ryb przebywająca w wodzie zawierającej BaP o stężeniu 10 ng/L (na podstawie [H2]).

Zaobserwowałam także, że po 14 dniach eksperymentu obecność BaP w największym stopniu wpłynęła na procesy związane z przemianami energii oraz osmoregulacją i w szczególności dotyczyła przemian aminokwasów i lipidów. Ponadto wskazałam, że karnityna i jej ester - acetylokarnityna, które pełnią istotną rolę w beta oksydacji kwasów tłuszczowych, obecne były jedynie w mięśniach ryb grupy kontrolnej. W pozostałych grupach badawczych wykazałam jedynie obecność karnityny, co świadczyć może o zaburzeniu metabolizmu lipidów (Ryc. 4).



Ryc. 4. Profil zależności masy (m/z) od czasu retencji dla związków wyekstrahowanych za pomocą *in vivo* SPME po 14-tym dniu eksperymentu. a) grupa kontrolna ryb, (b) grupa ryb przebywająca w wodzie zawierającej BaP o stężeniu 1 ng/L, (c) grupa ryb przebywająca w wodzie zawierającej BaP o stężeniu 10 ng/L (na podstawie [H2]).

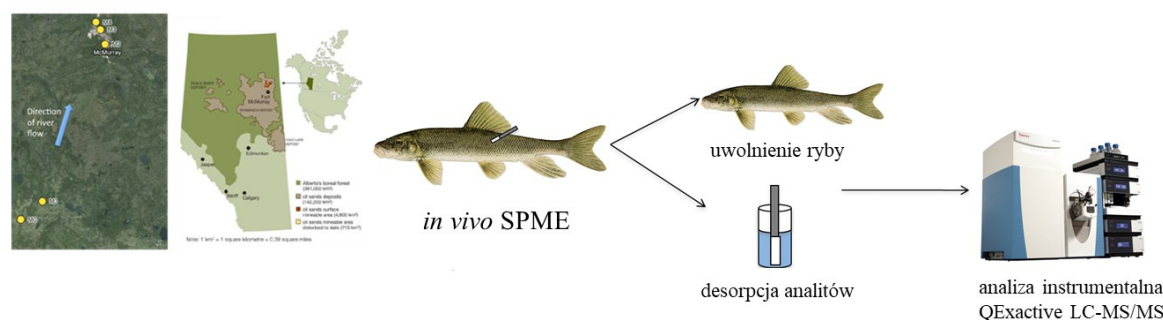
Ponadto użycie włókien *in vivo* SPME umożliwiło ekstrakcję szeregu metabolitów, takich jak glukoza-6-fosforan oraz wtórny przekaźnik - cykliczny monofosforan cytydyny, które są pośrednimi związkami wielu szlaków metabolomicznych. Jednak oba związki obecne były jedynie w grupie kontrolnej, co wskazywać może, że prawidłowy przebieg procesów biochemicznych występował jedynie w tej grupie ryb. Dodatkowo w mięśniach ryb przebywających w wodzie zawierającej wyższe stężenie BaP wykazałam obecność związku endokannabinoidowego (2-arachidonyloglicerolu), który występuje w śladowych ilościach w tkankach i uznawany jest za labilny metabolit. Obecność tego związku endogennego już po pierwszym dniu eksperymentu pozwoliła także na odróżnienie tej bardziej narażonej na działanie BaP grupy ryb od innych badanych grup. Istotną obserwacją był także fakt, iż po pierwszym dniu eksperymentu profile metabolomiczne obu grup ryb przebywających w wodzie zawierającej BaP były zbliżone, jednakże po 14 dniach eksperymentu profil metaboliczny ryb z niskim stężeniem BaP w wodzie był porównywalny do profilu metabolomicznego grupy kontrolnej, szczególnie w odniesieniu do związków o wyższych masach cząsteczkowych (Ryc. 4). Zaobserwowane zmiany wskazywać mogą na obecność mechanizmów adaptacyjnych na poziomie molekularnym w mięśniach ryb w obecności niższych stężeń BaP w środowisku wodnym. Ponadto, ogólna liczba metabolitów w każdej z badanych grup ryb uległa istotnemu zwiększeniu po 14 dniach eksperymentu, co prawdopodobnie związane jest z faktem intensywnego wzrostu, gdyż badania prowadzono na rybach młodocianych.

Na podstawie opisanych wyżej wyników badań prowadzonych w warunkach laboratoryjnych wskazałam, że obecność BaP w otaczającym środowisku powoduje znaczące zmiany metabolomiczne w organizmie żywym. Jednakże w warunkach naturalnych organizm ryb poddany jest ekspozycji na wiele czynników środowiskowych, które w sposób różnorodny (np. synergistyczny, addytywny, antagonistyczny) mogą wpływać na przemiany metaboliczne, co sprawia, że analiza kompletnego metabolomu staje się procesem skomplikowanym, wymagającym użycia zaawansowanych narzędzi analitycznych i bioinformatycznych [67].

Kolejnym zagadnieniem podjętym w moich badaniach była analiza ekspozycji ryb żyjących w warunkach naturalnych. Powyższa analiza zawierała elementy biomonitoringu środowiska naturalnego umożliwiające ocenę stopnia akumulacji toksyn w mięśniu ryb, ich potencjalnego wpływu na przemiany biochemiczne oraz na status zdrowotny konsumentów ryb [H3]. Realizowane badania były częścią projektu mającego na celu ocenę stanu środowiska w obszarach miejsc wydobywania ropy naftowej oraz śledzenie zmian w ekosystemie związanych z rozwojem przemysłu naftowego (The Joint Oil Sands Monitoring Plan, JOSM). Analizie i monitorowaniu poddane zostały ryby z rodziny czukuczanowatych (*Catostomus commersonii*)

żyjące w rzece Athabaska w kanadyjskiej prowincji Alberta. W ramach projektu przebadano łącznie 60 ryb bytujących w pięciu miejscach rzeki Athabaska, przy czym cztery z wybranych rejonów znajdowały się w pobliżu ośrodków przemysłowych związanych z wydobyciem ropy lub produkcją papieru, a także w okolicach oczyszczalni ścieków.

Zastosowana technika *in vivo* SPME umożliwiła jednoczesną ekstrakcję i oznaczenie zarówno związków toksycznych, jak i endogennych metabolitów w mięśniach, co w dalszych analizach umożliwiło korelację miejsca przebywania ryb, rodzaju toksyn obecnych w ich mięśniach oraz zaobserwowane zmiany metaboliczne. Do przeprowadzenia ekstrakcji *in vivo* SPME użyto ostrzy ze złożem typu C18. Jednakże przed przeprowadzeniem analiz w warunkach *in vivo*, oceniono wydajność procesu SPME dla związków o różnej polarności i potwierdzono, że wybrane złożo SPME wykazuje wysokie powinowactwo do związków hydrofobowych, natomiast odzysk analitów hydrofilowych, takich jak adenozyzna i kofeina był niski. Z uwagi na fakt, że będące przedmiotem badań związki toksyczne mają w dużej mierze charakter hydrofobowy, uzasadnionym był wybór tego złoża do analiz. Następnie opracowano protokół prowadzenia badań środowiskowych, który obejmował 20-minutową ekstrakcję z mięśni nadosiowych ryb w warunkach *in vivo*. Podczas eksperymentu ryby umieszczone były w klatkach zanurzonych w rzece, a po zakończeniu badań ryby wypuszczano na wolność. Analizy toksykologiczne i metaboliczne przeprowadzono przy użyciu metody LC-MS/MS (Ryc. 5).



Ryc. 5. Schemat ekstrakcji *in vivo* SPME z mięśni ryb oraz analizy LC-MS/MS.

Do analizy otrzymanych danych użyto oprogramowania xMSannotator. Identyfikację związków toksycznych przeprowadzono przy wykorzystaniu bazy danych Toxin and Toxin Target Database (T3DB) [68], natomiast do identyfikacji endogennych metabolitów posłużyły bazy danych HMDB oraz METLIN [66,69]. Analizując otrzymane wyniki wykazałam, że

technika *in vivo* SPME umożliwiła ekstrakcję wielu substancji toksycznych należących do różnych klas, w tym węglowodorów aromatycznych, pestycydów, czy plastyfikatorów, które obecne były w mięśniach ryb żyjących nie tylko w rejonie wydobycia ropy naftowej, ale również w pozostałych rejonach przemysłowych. Jednakże zwróciłam uwagę na fakt, że wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne nie muszą pochodzić z produkcji przemysłowej, ale mogą być również związane z naturalnymi źródłami pochodzenia tych substancji, w tym z piaskami bitumicznymi. Ponadto, na podstawie przeprowadzonych analiz wykazałam, że ryby żyjące w rejonie rzeki bezpośrednio powyżej miejsca wydobycia ropy naftowej mają ogólną mniejszą ilość związków toksycznych oraz brak substancji związanych z przemysłem naftowym. Na podstawie wykonanych analiz wskazałam również na mniejsze zmiany profilu metabolomicznego w tej grupie ryb, co może sugerować korelację stopnia zanieczyszczenia środowiska z profilem metabolomicznym organizmu żywego. Zmiany metabolomiczne, jakie zaobserwowałam w pozostałych grupach ryb dotyczyły głównie przemian eikozanoidów powstających z kwasów tłuszczowych na szlaku działania cyklooksygenaz i lipooksygenaz. Ponadto, w grupie ryb żyjących w okolicach przemysłu papierniczego, wykazałam obecność metabolitów uczestniczących w reakcjach zapalnych organizmu, takich jak metabolity kwasu arachidonowego (np. kwasy hydroksyeikozatetraenowe, HETE) oraz kwasu linolowego (np. kwasy hydroksyoktadekadienowe, HODE). W tej grupie ryb, podobnie jak we wcześniej opisanych badaniach [H2], zaobserwowałam również zmiany w endogennym układzie kannabinoidowym. Podsumowując badania wpływu ekspozycji na profil metabolomiczny dziko żyjących ryb stwierdziłam, że istotny wpływ na otrzymane dane metabolomiczne miały addytywne i/lub skumulowane efekty różnych substancji zanieczyszczających środowisko. Tym samym, przedstawiony obraz zmian metabolomicznych jedynie w sposób zbliżony może odzwierciedlać funkcjonowanie organizmu w warunkach naturalnych. Zaobserwowane różnice w szlakach sygnałowych mogą prowadzić do identyfikacji specyficznych tkankowo związków (biomarkerów), które powstają w wyniku zmienionego metabolizmu. Wskazałam też, że technika *in vivo* SPME jest użytecznym narzędziem do monitorowania wpływu ekspozycji na zmiany metabolomu organizmów wodnych.

II. Zastosowanie techniki *in vivo* SPME w badaniach klinicznych

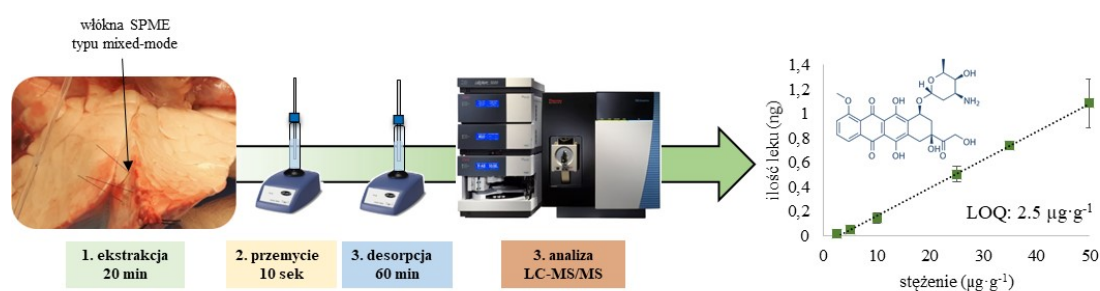
[H4] A. Roszkowska, M. Tascon, B. Bojko, K. Goryński, P.R. dos Santos, M. Cypel, J. Pawliszyn, Equilibrium ex vivo calibration of homogenized tissue for in vivo SPME quantitation of doxorubicin in lung tissue, *Talanta* 183, 304-310 (2018)

[H5] M. Huq, M. Tascon, E. Nazdrajic, A. Roszkowska, J. Pawliszyn, Measurement of free drug concentration from biological tissue by solid-phase microextraction: in-silico and experimental study, *Anal Chem*, 91, 7719-7728 (2019)

Jak już wcześniej wspominałam, dzięki zastosowaniu cienkich, mało inwazyjnych i biokompatybilnych włókien SPME możliwa stała się ekstrakcja i monitorowanie poziomu leków w warunkach *in vivo* w żywych organizmach roślinnych i zwierzęcych [52]. Natomiast ze względu na liczne uregulowania prawne i etyczne niemożliwe było dotąd zastosowanie *in vivo* SPME bezpośrednio w organizmie ludzkim. Jednakże szereg przeprowadzonych badań oraz udowodnienie skuteczności SPME w analizach *in vivo* na zwierzętach wskazywały na potencjalną wysoką przydatność tego rozwiązania analitycznego w terapeutycznym monitorowaniu leków bezpośrednio na sali operacyjnej. W efekcie, uzyskano zgodę na użycie SPME do badań w warunkach *in vivo* u ludzi. Technologia *in vivo* SPME stała się elementem składowym badań klinicznych pierwszej fazy prowadzonych w szpitalu Toronto General Hospital w Kanadzie, dotyczących monitorowania stężenia i dystrybucji leku przeciwnowotworowego – doksorubicyny w płatach płuc podczas nowatorskiej techniki leczenia przerzutów opartej na perfuzji płuc *in vivo* (ang. *in vivo lung perfusion*, IVLP), w której chemioterapeutyk podawany jest bezpośrednio do płuc z pominięciem krążenia układowego u pacjenta. Badania dotyczące zastosowania technologii *in vivo* SPME do monitorowania stężenia doksorubicyny w płucach ludzkich są tematem przewodnim dwóch kolejnych prac [H4, H5] włączonych do prezentowanego osiągnięcia naukowego. Wspomniane analizy realizowałam w ramach środków uzyskanych z Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada oraz z Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (numer grantu: 355935, tytuł grantu: “Supervised in vivo lung perfusion strategy for treatment of cancer metastases to the lungs. Real time monitoring of chemotherapy by on-site analytical platform”).

Wraz z zespołem naukowców opracowałam szczegółowy protokół użycia włókien *in vivo* SPME do bezpośredniego oznaczania stężenia doksorubicyny w różnych płatach płuc w czasie rzeczywistym (podczas zabiegu IVLP), aby możliwe było określenie właściwych, dotąd nieznanych terapeutycznych dawek leku podawanego bezpośrednio do płuc, a nie do krążenia ogólnego [H4]. Mając na uwadze powyższe wytyczne i jednocześnie biorąc pod

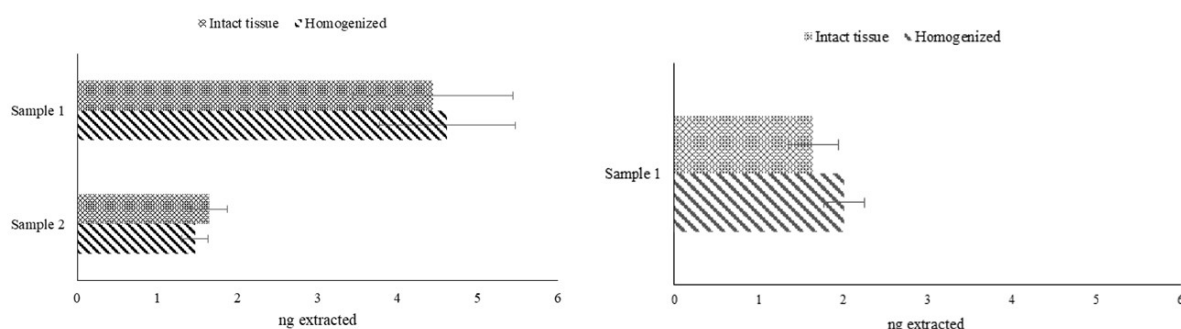
uwagę wszelkie procedury kliniczne, w ścisłych warunkach laboratoryjnych przygotowałam precyzyjną procedurę analityczną (*ex vivo* SPME), która w kolejnym kroku umożliwiła bezpośrednie jej zastosowanie do ekstrakcji dokсорubicyny z płuc człowieka w warunkach sali operacyjnej. Podczas etapu optymalizacji procesu ekstrakcji w laboratorium przy użyciu nowego typu włókien *mixed-mode* (złożonych z C-8 i kwasu benzenosulfonowego) uwzględniałam wszystkie aspekty koncepcyjne związane z SPME i warunkami *in vivo*, gdyż takie analizy mają kluczowe znaczenie dla przyszłościowej użyteczności tej metodologii w dalszych badaniach na ludziach (Ryc. 6).



Ryc. 6. Przebieg procesu ekstrakcji SPME-LC-MS/MS w celu ekstrakcji dokсорubicyny z niehomogenizowanej tkanki płucnej.

Najważniejsze parametry procesu optymalizacji SPME obejmowały analizę wpływu wyjąłowania włókien na wydajność ekstrakcji, wybór odpowiedniej ilości homogenatu tkankowego (matrycy) niezbędnego do przeprowadzenia ekstrakcji *ex vivo* SPME, wybór metody kalibracji oraz sposób pomiaru stężenia leku bez możliwości uwzględniania korekty przez standard wewnętrzny, który nie mógł zostać użyty z uwagi na fakt docelowego prowadzenia badań w warunkach *in vivo*. Wykazałam, że wyjąłowanie włókien w autoklawie powoduje wzrost wydajności ekstrakcji o 75% w porównaniu do wydajności włókien nie poddanych wyjąłowaniu. Można to wytłumaczyć faktem bardziej wyczerpującej aktywacji powierzchni włókna w autoklawie (temperatura, para wodna), co przekłada się także na wyższą wydajność ekstrakcyjną złoża SPME. W analizach laboratoryjnych istotnym był również dobór optymalnej ilości homogenatu do przeprowadzenia ekstrakcji, aby ilość wyekstrahowanego leku nie była zależna od masy/ilości tkanki użytej do badań oraz aby ekstrakcja z homogenatu pozwalała na określenie stężenia leku w określonej tkance w żywym układzie. Z uwagi na fakt, iż niemożliwe było użycie ludzkiej tkanki płucnej do tego rodzaju eksperymentów, jako materiał do badań *ex vivo* wybrałam płuca jagnięce, które po homogenizacji wzbogacałam

standardem analitycznym dokсорubicyny w różnych stężeniach i używałam do dalszych badań. Wykazałam, że ilość wyekstrahowanego leku nie jest zależna od ilości użytego homogenatu i że zwiększanie ilości homogenatu nie prowadzi do zwiększenia ilości wyekstrahowanego leku. Ponadto porównałam również wydajność ekstrakcji po umieszczeniu włókien SPME we fragmentach tkanki niezhomogenizowanej i następnie, po homogenizacji tkanki. Na przykładzie fragmentów tkanki płucnej pobranej od świń po zabiegu IVLP, w którym oprócz dokсорubicyny podawano również cefazolinę, wykazałam, że w przypadku obu leków wydajność ekstrakcji pomiędzy niezhomogenizowaną i zhomogenizowaną tkanką jest porównywalna. Zatem wyniki otrzymane w badaniach laboratoryjnych z homogenatów tkankowych odpowiadać będą warunkom *in vivo* SPME przeprowadzonym na nienaruszonej (niezhomogenizowanej) tkance płucnej (Ryc.7).



Ryc. 7. Wpływ homogenizacji na wydajność ekstrakcji dokсорubicyny (a) oraz cefazoliny (b) przy użyciu włókien SPME z różnych fragmentów tkanki płucnej świni poddanej zabiegowi IVLP (częściowo na podstawie [H4]).

Wybór odpowiedniej metody kalibracji SPME ma kluczowe znaczenie w terapeutycznym monitorowaniu leków, jednak w warunkach *in vivo*, gdy nie można użyć standardu wewnętrznego do korekty wyników, precyzyjne określenie stężenia analitu stanowi duże wyzwanie analityczne. Zatem podczas doboru modelu kalibracji do ilościowej analizy dokсорubicyny w płucach wzięłam pod uwagę wpływ szeregu czynników, w tym ciągły przepływ krwi w żywym organizmie ludzkim oraz przepływ perfuzatu z lekiem przez płuca podczas IVLP, które znacząco mogłyby wpływać na szybkość adsorpcji dokсорubicyny do włókna SPME. Ostatecznie, po przeprowadzonych analizach profilu ekstrakcji dokсорubicyny, do dalszych badań wybrałam model kalibracji w warunkach ekwilibrium, eliminujący wpływ czynników hemodynamicznych. Ponadto, wykazałam, że 20-minutowa ekstrakcja dostarcza powtarzalne i precyzyjne pomiary stężenia leku. Czas ten jest również optymalny do

wielokrotnego przeprowadzenia ekstrakcji leku z płuc podczas około 3-godzinnej procedury IVLP, nie naruszając przy tym struktury tkankowej przez włókna SPME.

W ostatnim etapie badań związanych z optymalizacją procedury SPME w warunkach *in vivo* przeprowadziłam analizę porównawczą techniki SPME i SLE w odniesieniu do ekstrakcji doksorubicyny z fragmentów płuc świni poddanej zabiegowi IVLP i wykazałam brak istotnych różnic w wydajności ekstrakcji pomiędzy obiema technikami. Jak wcześniej wspominałam, w przeciwieństwie do tradycyjnych technik, takich jak SLE, SPME umożliwia wykonanie analiz w sposób prosty i precyzyjny, jednocześnie eliminując potrzebę pobierania próbek, co ma szczególne znaczenie w badaniach na organizmach żywych. Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników wykazałam, że model matrycy zastępczej oraz prowadzenie ekstrakcji *ex vivo* SPME w stanie równowagi jest optymalnym narzędziem analitycznym do przełożenia na warunki analiz klinicznych w celu monitorowania stężenia doksorubicyny w ludzkich płucach podczas nowatorskiej metody chemioterapii.

Pomiar stężenia wolnej frakcji leku w narzędziu docelowym w warunkach *in vivo* jest najbardziej wiarygodnym wskaźnikiem mówiącym o dostępności terapeutycznej i aktywności farmakologicznej danej substancji leczniczej. Jednakże, większość badań z zakresu farmakokinetyki skupia się na pomiarach poziomu leku we krwi i stopniu jego wiązania z białkami osocza, natomiast istnieje niewiele badań dotyczących określenia poziomu leku w narządach docelowych. Wcześniejsze badania wykazały, że ekstrakcja SPME powoduje niewielki ubytek wolnej frakcji ekstrahowanych analitów (tzw. „*negligible depletion*”) i dzięki temu możliwe jest kilkukrotne wykonanie pomiarów w tej samej tkance [11]. Obserwacje te stały się podstawą dogłębnej analizy mechanizmu i kinetyki ekstrakcji doksorubicyny z tkanki płucnej oraz pomiaru jej wolnej frakcji w narzędziu docelowym. Badania zostały wykonane w warunkach laboratoryjnych (*ex vivo*) oraz na modelu matematycznym (*in silico*) przy użyciu programu COMSOL Multiphysics [H5]. Wspólnie z zespołem naukowców przeprowadziłam szeroko zakrojone badania obejmujące ekstrakcję leku z płynnej matrycy (roztwór PBS (buforowana fosforanem sól fizjologiczna) bez i z dodatkiem albumin surowicy krwi ludzkiej) oraz ze stałej matrycy (żel agarozowy oraz homogenat tkanki płucnej). W celu wyznaczenia pełnego profilu kinetyki ekstrakcji leku, zakres badań obejmował pomiary stopnia ekstrakcji doksorubicyny przez włókna SPME nie tylko w stanie równowagi, ale również w warunkach tzw. *pre-equilibrium*. Symulacje matematyczne przygotowane w oparciu o znane parametry fizykochemiczne tkanki płucnej, a także na podstawie pomiarów laboratoryjnych posłużyły do stworzenia modelu umożliwiającego określenie kinetyki ekstrakcji leku, a także pozwoliły na

obliczenie stopnia wiązania leku z elementami tkankowymi, takimi jak białka, DNA i błony komórkowe oraz na wyznaczenie stężenia wolnej frakcji leku w tkance płucnej.

Ekstrakcja leku z roztworu PBS w warunkach eksperymentalnych wykonana z wytrząsaniem pozwoliła na osiągnięcie stanu równowagi w czasie 100 minut i wyniki te były zgodne z przeprowadzoną równoległe symulacją matematyczną. Dodatek albumin surowicy krwi ludzkiej (ang. *human serum albumin*, HSA) do roztworu PBS umożliwił wyliczenie wartości stałej wiązania leku z białkami (K_A), która wyniosła $6.203 (10^3 \times \text{mol}^{-1})$, co było zgodne z danymi literaturowymi [70]. Natomiast w żelu agarozowym przeprowadzono ekstrakcję statyczną i wykazano, że stan równowagi został osiągnięty dopiero po 80 godzinach trwania eksperymentu, co między innymi tłumaczy fakt użycia gęstej matrycy, w której absorpcja zachodzi znacznie wolniej niż w roztworze PBS oraz wykonanie ekstrakcji bez wytrząsania. Otrzymane wyniki przeprowadzonych analiz laboratoryjnych z użyciem homogenatów tkanki płucnej posłużyły również do opracowania precyzyjnego modelu matematycznego określającego przebieg procesu ekstrakcji doksorubicyny w narządzie docelowym. Po raz pierwszy, przy pomocy opracowanego modelu, dokonaliśmy pomiaru stężenia wolnej frakcji doksorubicyny w tkance stałej, wyznaczając pozorną stałą wiązania leku z elementami tkankowymi (K_{app}), która dla doksorubicyny wynosi 1251. W kolejnej etapie badań określona została ilość leku, jaka zostaje wyekstrahowana w miejscu umieszczenia włókna SPME w tkance stałej i wykazałam, że w warunkach równowagi jedynie 7 ng doksorubicyny z próbki zawierającej 25 $\mu\text{g/g}$ homogenatu ulega ekstrakcji przez złożę SPME. Podobne wyniki uzyskano przy użyciu modelu matematycznego. Na podstawie obliczeń matematycznych wyznaczono także stężenie wolnej frakcji doksorubicyny, które wynosiło $1.25 \times 10^{-5} (\text{mol} \times \text{m}^{-3})$ dla stężenia 25 $\mu\text{g/g}$ homogenatu, co świadczy o silnym związaniu leku z elementami tkankowymi w płucach. Wartość ta została oszacowana na poziomie 99.97%. Dotychczas dane dotyczące stopnia wiązania leku z elementami tkankowymi dotyczyły jedynie krwi, gdzie wykazano, że doksorubicyna wiąże się w około 75% z białkami osocza [71]. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazaliśmy, że stężenie wolnej frakcji leku w tkance pozostaje na niezmiennym poziomie, gdyż ubytek wolnej frakcji doksorubicyny spowodowany absorpcją na włóknie SPME jest szybko rekompensowany w tkance poprzez przeniesienie części frakcji leku związanej z elementami tkankowymi, wskazując, że matryca tkankowa działa jak bufor warunkujący utrzymanie stałego stężenia wolnej i związanej frakcji leku w płucach. Ponadto, ubytek leku w otoczeniu włókna był znikomy, co wskazuje, że ekstrakcja z użyciem włókien SPME nie wpływa na stężenie wolnej frakcji leku w tkance stałej. W przyszłości opracowany model symulacyjny pozwoli zredukować ilość koniecznych do

wykonania badań laboratoryjnych podczas opracowywania nowych metod analitycznych z użyciem doksorubicyny.

Ostatecznie opracowana metoda ekstrakcji doksorubicyny z tkanki płucnej wraz z wnikliwą analizą i wyliczeniem ilości wyekstrahowanego leku przez włókna SPME została z sukcesem zastosowana u dwóch pacjentów poddanych procedurze IVLP w Toronto General Hospital. Oprócz ekstrakcji leku, włókna SPME umożliwiły także ekstrakcję małych cząsteczkowych związków endogennych jako istotny element analiz niecelowanych. Uzyskane dane metabolomiczne wraz z korelacją poziomu doksorubicyny w różnych płatach płuc dostarczyły informacji o zmieniającym się metabolomie pacjentów poddanych terapii IVLP. Następnym krokiem prowadzonych badań będzie bezpośrednie połączenie SPME z MS, aby skrócić całkowity czas analizy oraz umożliwić monitorowanie poziomu leku bezpośrednio na sali operacyjnej. Wdrożenie narzędzia SPME-MS ma istotną wartość kliniczną i terapeutyczną, ponieważ może dostarczyć personelowi medycznemu bieżącą informację na temat stężenia leku w danym płacie płuc i pozwoli na odpowiednie dostosowanie dawki leku w czasie rzeczywistym podczas zabiegu.

PODSUMOWANIE

Zastosowanie techniki SPME w badaniach *in vivo* jest źródłem wielu informacji o poziomie, dystrybucji tkankowej, farmakokinetyce leków, a także umożliwia wgląd w profil metabolomiczny podczas badań nad poszukiwaniem biomarkerów, zarówno w badaniach medycznych, jak i środowiskowych. Głównym wynikiem badań, które zostały opisane w pracach wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego [H1-H5], było szczegółowe wyjaśnienie złożoności mechanizmów molekularnych zachodzących w organizmach żywych oraz opracowanie protokołu izolacji określonych grup związków do badań w warunkach *in vivo*. Prezentowany cykl prac zawiera opisy stosowanych procedur analitycznych opartych na technologii SPME oraz przedstawia uzyskane wyniki ekstrakcji ze złóż SPME w obszarze badań metabolomicznych, klinicznych i środowiskowych. Wiedza i umiejętności zdobyte podczas pracy z SPME stały się inspiracją do kolejnych badań z zakresu metabolomiki oraz analiz klinicznych, które są przedmiotem aktualnie prowadzonych przeze mnie projektów badawczych.

Badania stanowiące cykl przedłożonych prac stały się podstawą do wyciągnięcia następujących wniosków:

1. Wykazano, że technologia *in vivo* SPME umożliwiła analizę profilu lipidomicznego mięśni żywych ryb, szczególnie w odniesieniu do bioaktywnych lipidów będących cząsteczkami sygnałowymi.
2. Wybór strategii badawczych opartych na różnorodnych technikach ekstrakcyjnych (*in vivo* SPME, *ex vivo* SPME i SLE) umożliwił określenie i porównanie profilu małowcząsteczkowych metabolitów o budowie lipidowej w tkance mięśniowej po rocznym przechowywaniu i wniósł wkład w badania określające zmiany profilu lipidomicznego tkanek przechowywanych w porównaniu do analiz *in vivo*.
3. Implementacja niecelowanych analiz metabolomicznych w badaniach środowiskowych umożliwiła bardziej wnikliwe poznanie mechanizmów związanych z wpływem związków toksycznych na profil małowcząsteczkowych związków endogennych w mięśniach żywych ryb oraz na wytypowanie potencjalnych markerów zmian na poziomie molekularnym.
4. Prowadzone badania niecelowane określające profil metabolomiczny ryb żyjących w warunkach naturalnych w okolicach miejsc przemysłowych pozwoliły na wyselekcjonowanie metabolitów, które w przyszłości mogłyby pełnić funkcje biomarkerów określających stopień ekspozycji organizmów na zanieczyszczenie środowiska.
5. Zastosowanie technologii *in vivo* SPME umożliwiło ekstrakcję licznych analitów występujących na niskich poziomach oznaczalności w tkance stałej i dowiodło, że jedynie użycie czułych, precyzyjnych i dokładnych narzędzi analitycznych umożliwia śledzenie zmian metabolomicznych, szczególnie w odniesieniu do związków niestabilnych.
6. Wykazano, że nowatorska metoda ekstrakcji i analizy doksorubicyny z tkanki płucnej przy użyciu SPME-LC-MS/MS umożliwia precyzyjny pomiar stężenia leku w warunkach równowagi bez konieczności korekty standardu wewnętrznego. Istotnym atutem zaproponowanej metodyki *in vivo* SPME jest powtarzalność uzyskiwanych wyników, których wartości są stałe i niezależne od wpływu czynników zewnętrznych mogących modyfikować proces ekstrakcji. Uzyskane rezultaty potwierdziły przydatność opracowanej metody do bezpośredniego monitorowania poziomu leku w różnych płatach płuc u pacjenta podczas zabiegu operacyjnego.
7. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na opracowanie modelu umożliwiającego dokładny pomiar wolnej, aktywnej frakcji doksorubicyny w tkance płucnej, kinetykę ekstrakcji oraz ilość leku zaadsorbowanego przez złożę SPME w odniesieniu do

całkowitego stężenia doksorubicyny. Uzyskane wyniki potwierdziły, że ekstrakcja z użyciem złoża SPME wywiera niewielki wpływ na całkowity poziom leku w badanej matrycy, nie powodując znaczącego ubytku analitu. Tym samym, nie zaburza równowagi pomiędzy frakcją leku wolną i związaną z elementami tkankowymi.

Wymiernym efektem przeprowadzonych badań było zastosowanie nowoczesnej technologii *in vivo* SPME w żywym organizmie, co stanowić może przełom w celowanych i niecelowanych analizach metabolomicznych, klinicznych i środowiskowych, gdyż dostarcza badaczom cenne narzędzie analityczne, które można zastosować do monitorowania zmian metabolomu w organizmie żywym w reakcji na zmieniające się warunki zewnętrzne i otaczające środowisko, a także może służyć w terapeutycznym monitorowaniu leków i odpowiedzi organizmu na zastosowaną farmakoterapię.

PIŚMIENNICTWO

- [1] B.E. Logan, D. Schlenk, S.L. Massey Simonich, W.A. Arnold, Editor's Choice for the Best Papers Published in ES&T Letters in 2018, *Environ. Sci. Technol. Lett.* (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.9b00161>.
- [2] L. Nováková, H. Vlčková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004>.
- [3] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>.
- [4] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Miniaturized solid-phase extraction techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.026>.
- [5] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, Y. Wen, Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>.
- [6] Y. He, M. Concheiro-Guisan, Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology, *Biomed. Chromatogr.* (2019). <https://doi.org/10.1002/bmc.4444>.
- [7] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Anal. Chem.* (1990). <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
- [8] Y. Wang, J. Zhang, Y. Ding, J. Zhou, L. Ni, C. Sun, Quantitative determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples using solid-phase microextraction, *J. Sep. Sci.* (2009). <https://doi.org/10.1002/jssc.200900420>.
- [9] É.A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, N. Reyes-garcés, G.A. Gómez-ríos, E. Boyacı, Trends in Analytical Chemistry A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis, *Trends Anal. Chem.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.016>.
- [10] B. Bojko, J. Pawliszyn, In vivo and ex vivo SPME: A low invasive sampling and sample preparation tool in clinical bioanalysis, *Bioanalysis.* 6 (2014) 1227–1239. <https://doi.org/10.4155/BIO.14.91>.
- [11] N. Reyes-Garcés, E. Gionfriddo, G.A. Gómez-Ríos, M.N. Alam, E. Boyacı, B. Bojko, V. Singh, J. Grandy, J. Pawliszyn, Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions, *Anal. Chem.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04502>.
- [12] B. Bojko, E. Cudjoe, G.A. Gómez-Ríos, K. Gorynski, R. Jiang, N. Reyes-Garcés, S. Risticvic, É.A.S. Silva, O. Togunde, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, SPME - Quo vadis?, *Anal. Chim. Acta.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.052>.
- [13] D. Vuckovic, I. De Lannoy, B. Gien, R.E. Shirey, L.M. Sidisky, S. Dutta, J. Pawliszyn, In vivo solid-phase microextraction: Capturing the elusive portion of metabolome, *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2011). <https://doi.org/10.1002/anie.201006715>.

- [14] G. Ouyang, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, Nondestructive sampling of living systems using in vivo solid-phase microextraction, *Chem. Rev.* 111 (2011). <https://doi.org/10.1021/cr100203t>.
- [15] D. Vuckovic, X. Zhang, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions, *J. Chromatogr. A.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.061>.
- [16] A. Roszkowska, N. Miękus, T. Bączek, Application of solid-phase microextraction in current biomedical research, *J. Sep. Sci.* (2019). <https://doi.org/10.1002/jssc.201800785>.
- [17] M. Tascon, M.N. Alam, G.A. Gómez-Ríos, J. Pawliszyn, Development of a Microfluidic Open Interface with Flow Isolated Desorption Volume for the Direct Coupling of SPME Devices to Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04295>.
- [18] M. Tascon, G.A. Gómez-Ríos, N. Reyes-Garcés, J. Poole, E. Boyaci, J. Pawliszyn, High-Throughput Screening and Quantitation of Target Compounds in Biofluids by Coated Blade Spray-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01877>.
- [19] E.R. St John, J. Balog, J.S. McKenzie, M. Rossi, A. Covington, L. Muirhead, Z. Bodai, F. Rosini, A.V.M. Speller, S. Shousha, R. Ramakrishnan, A. Darzi, Z. Takats, D.R. Leff, Rapid evaporative ionisation mass spectrometry of electrosurgical vapours for the identification of breast pathology: Towards an intelligent knife for breast cancer surgery, *Breast Cancer Res.* (2017). <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0845-2>.
- [20] J. Zhang, J. Rector, J.Q. Lin, J.H. Young, M. Sans, N. Katta, N. Giese, W. Yu, C. Nagi, J. Suliburk, J. Liu, A. Bensussan, R.J. Dehoog, K.Y. Garza, B. Ludolph, A.G. Sorace, A. Syed, A. Zahedivash, T.E. Milner, L.S. Eberlin, Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system, *Sci. Transl. Med.* (2017). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan3968>.
- [21] G. Ouyang, J. Pawliszyn, A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction, *Anal. Chim. Acta.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.08.015>.
- [22] G. Ouyang, K.D. Oakes, L. Bragg, S. Wang, H. Liu, S. Cui, M.R. Servos, D.G. Dixon, J. Pawliszyn, Sampling-rate calibration for rapid and nonlethal monitoring of organic contaminants in fish muscle by solid-phase microextraction, *Environ. Sci. Technol.* (2011). <https://doi.org/10.1021/es201709j>.
- [23] Z. Bai, A. Pilote, P.K. Sarker, G. Vandenberg, J. Pawliszyn, In vivo solid-phase microextraction with in vitro calibration: Determination of off-flavor components in live fish, *Anal. Chem.* (2013). <https://doi.org/10.1021/ac3033245>.
- [24] C. Skonberg, A. Artmann, C. Cornett, S.H. Hansen, H.S. Hansen, Pitfalls in the sample preparation and analysis of N-acyl ethanolamines, *J. Lipid Res.* (2010). <https://doi.org/10.1194/jlr.D004606>.
- [25] Q.H. Zhang, L. Di Zhou, H. Chen, C.Z. Wang, Z.N. Xia, C.S. Yuan, Solid-phase microextraction technology for in vitro and in vivo metabolite analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.017>.
- [26] D.-K. Lee, T. Yi, K.-E. Park, H.-J. Lee, Y.-K. Cho, S.J. Lee, J. Lee, J.H. Park, M.-Y. Lee, S.U. Song, S.W. Kwon, Non-invasive characterization of the adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by HS-SPME/GC-MS, *Sci. Rep.* 4 (2014). <https://doi.org/10.1038/srep06550>.
- [27] A. Naccarato, R. Elliani, B. Cavaliere, G. Sindona, A. Tagarelli, Development of a fast and simple gas chromatographic protocol based on the combined use of alkyl chloroformate and solid phase microextraction for the assay of polyamines in human urine, *J. Chromatogr. A.* 1549 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.034>.
- [28] N. Miękus, I. Ołędzka, N. Kossakowska, A. Plenis, P. Kowalski, A. Prah, T. Bączek, Ionic liquids as signal amplifiers for the simultaneous extraction of several neurotransmitters determined by micellar electrokinetic chromatography, *Talanta.* 186 (2018) 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.041>.
- [29] E. Cudjoe, J. Pawliszyn, Optimization of solid phase microextraction coatings for liquid chromatography mass spectrometry determination of neurotransmitters, *J. Chromatogr. A.* 1341 (2014) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.035>.
- [30] E. Cudjoe, B. Bojko, I. de Lannoy, V. Saldivia, J. Pawliszyn, Solid-Phase Microextraction: A Complementary In Vivo Sampling Method to Microdialysis, *Angew. Chemie Int. Ed.* 52 (2013) 12124–12126. <https://doi.org/10.1002/anie.201304538>.
- [31] S. Lendor, S.A. Hassani, E. Boyaci, V. Singh, T. Womelsdorf, J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction-Based Miniaturized Probe and Protocol for Extraction of Neurotransmitters from Brains in Vivo, *Anal. Chem.* (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00995>.
- [32] S.A. Hassani, S. Lendor, E. Boyaci, J. Pawliszyn, T. Womelsdorf, Multineuromodulator measurements across fronto-striatal network areas of the behaving macaque using solid-phase microextraction, *J. Neurophysiol.* (2019). <https://doi.org/10.1152/jn.00321.2019>.
- [33] A. Napylov, N. Reyes-Garcés, G. Gomez-Rios, M. Olkowicz, S. Lendor, C. Monnin, B. Bojko, C. Hamani, J. Pawliszyn, D. Vuckovic, In Vivo Solid-Phase Microextraction for Sampling of Oxylipins in Brain of Awake, Moving Rats, *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2020). <https://doi.org/10.1002/anie.201909430>.
- [34] T. Khalid, R. Aggio, P. White, B. De Lacy Costello, R. Persad, H. Al-Kateb, P. Jones, C.S. Probert, N.

- Ratcliffe, Urinary volatile organic compounds for the detection of prostate cancer, *PLoS One*. 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143283>.
- [35] E. Duffy, M.R. Jacobs, B. Kirby, A. Morrin, Probing skin physiology through the volatile footprint: Discriminating volatile emissions before and after acute barrier disruption, *Exp. Dermatol.* 26 (2017) 919–925. <https://doi.org/10.1111/exd.13344>.
- [36] B. Bojko, N. Reyes-Garcés, V. Bessonneau, K. Goryński, F. Mousavi, E.A. Souza Silva, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction in metabolomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 61 (2014) 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.005>.
- [37] T. Abaffy, M.G. Möller, D.D. Riemer, C. Milikowski, R.A. DeFazio, Comparative analysis of volatile metabolomics signals from melanoma and benign skin: A pilot study, *Metabolomics*. 9 (2013) 998–1008. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0523-z>.
- [38] Q.J. Yang, M. Kluger, K. Goryński, J. Pawliszyn, B. Bojko, A.M. Yu, K. Noh, M. Selzner, A. Jerath, S. McCluskey, K.S. Pang, M. Wąsowicz, Comparing early liver graft function from heart beating and living-donors: A pilot study aiming to identify new biomarkers of liver injury, *Biopharm. Drug Dispos.* (2017). <https://doi.org/10.1002/bdd.2066>.
- [39] B. Bojko, K. Goryński, G. a Gomez-Rios, J.M. Knaak, T. Machuca, E. Cudjoe, V.N. Spetzler, M. Hsin, M. Cypel, M. Selzner, M. Liu, S. Keshjavee, J. Pawliszyn, Low invasive in vivo tissue sampling for monitoring biomarkers and drugs during surgery., *Lab. Invest.* 94 (2014) 586–94. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.44>.
- [40] T.A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, E. Boyaci, B. Bojko, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 249–264. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.017>.
- [41] World Health Organization, WHO, WHO Model List of Essential Medicines, *Essent. Med. Heal. Prod.* 14 (2017) 1–39. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7).
- [42] J. Pawliszyn, Theory of Solid-Phase Microextraction, in: *Handb. Solid Phase Microextraction*, 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00002-4>.
- [43] S.S.H. Davarani, S. Nojavan, R. Asadi, M.H. Banitaba, Electro-assisted solid-phase microextraction based on poly(3,4-ethylenedioxythiophen) combined with GC for the quantification of tricyclic antidepressants., *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2315–22. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300099>.
- [44] M.T. Jafari, M. Saraji, A.H. Ameri, Coupling of solid phase microextraction with electrospray ionization ion mobility spectrometry and direct analysis of venlafaxine in human urine and plasma, *Anal. Chim. Acta.* 853 (2015) 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.054>.
- [45] N. Fucci, C. Gambelunghe, K. Aroni, R. Rossi, A direct immersion solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous detection of levamisole and minor cocaine congeners in hair samples from chronic abusers, *Ther. Drug Monit.* 36 (2014) 789–795. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000076>.
- [46] S. Gentili, C. Mortali, L. Mastrobattista, P. Berretta, S. Zaami, Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.018>.
- [47] E. Boyaci, K. Goryński, A. Rodriguez-Lafuente, B. Bojko, J. Pawliszyn, Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances, *Anal. Chim. Acta.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.056>.
- [48] A. Jerath, A.J. Yang, K.S. Pang, N. Looby, N. Reyes-Garcés, T. Vasiljevic, B. Bojko, J. Pawliszyn, D. Wijesundera, W.S. Beattie, T.M. Yau, M. Wasowicz, Tranexamic acid dosing for cardiac surgical patients with chronic renal dysfunction: A new dosing regimen, *Anesth. Analg.* (2018). <https://doi.org/10.1213/ANE.00000000000002724>.
- [49] G.A. Gómez-Ríos, M. Tascon, N. Reyes-Garcés, E. Boyaci, J.J. Poole, J. Pawliszyn, Rapid determination of immunosuppressive drug concentrations in whole blood by coated blade spray-tandem mass spectrometry (CBS-MS/MS), *Anal. Chim. Acta.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.016>.
- [50] H.L. Lord, X. Zhang, F.M. Musteata, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, In vivo solid-phase microextraction for monitoring intravenous concentrations of drugs and metabolites, *Nat. Protoc.* (2011). <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.329>.
- [51] V. Bessonneau, E. Boyaci, M. Maciazek-Jurczyk, J. Pawliszyn, In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring, *Anal. Chim. Acta.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.029>.
- [52] A. Roszkowska, M. Yu, J. Pawliszyn, In Vivo SPME for Bioanalysis in Environmental Monitoring and Toxicology, in: *A New Paradig. Environ. Chem. Toxicol.*, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9447-8_3.

- [53] O.P. Togunde, K.D. Oakes, M.R. Servos, J. Pawliszyn, Optimization of solid phase microextraction for non-lethal in vivo determination of selected pharmaceuticals in fish muscle using liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.053>.
- [54] S. Wang, K.D. Oakes, L.M. Bragg, J. Pawliszyn, G. Dixon, M.R. Servos, Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish, *Chemosphere.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.035>.
- [55] E. Cudjoe, B. Bojko, P. Togunde, J. Pawliszyn, In vivo solid-phase microextraction for tissue bioanalysis, *Bioanalysis.* (2012). <https://doi.org/10.4155/bio.12.250>.
- [56] J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M.Á. Bello-López, M. Ramos-Payán, New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Anal. Chim. Acta.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.041>.
- [57] E.B. Divito, M. Cascio, Metabolism, physiology, and analyses of primary fatty acid amides, *Chem. Rev.* (2013). <https://doi.org/10.1021/cr300363b>.
- [58] C.A. Smith, E.J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, G. Siuzdak, XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Anal. Chem.* (2006). <https://doi.org/10.1021/ac051437y>.
- [59] K. Uppal, D.I. Walker, D.P. Jones, xMSannotator: An R package for network-based annotation of high-resolution metabolomics data, *Anal. Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01214>.
- [60] E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. Van Meer, M.J.O. Wakelam, E.A. Dennis, Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, *J. Lipid Res.* (2009). <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>.
- [61] A.M. Zivkovic, M.M. Wiest, U.T. Nguyen, R. Davis, S.M. Watkins, J.B. German, Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum, *Metabolomics.* (2009). <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0174-2>.
- [62] C.S. Bloszies, O. Fiehn, Using untargeted metabolomics for detecting exposome compounds, *Curr. Opin. Toxicol.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.002>.
- [63] T.H. Miller, N.R. Bury, S.F. Owen, J.I. MacRae, L.P. Barron, A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna, *Environ. Pollut.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.012>.
- [64] C.S. Bloszies, O. Fiehn, Using untargeted metabolomics for detecting exposome compounds, *Curr. Opin. Toxicol.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.002>.
- [65] M.P. Santacroce, A.S. Pastore, A. Tinelli, M. Colamonaco, G. Crescenzo, Implications for chronic toxicity of benzo[a]pyrene in sea bream cultured hepatocytes: Cytotoxicity, inflammation, and cancerogenesis, *Environ. Toxicol.* (2015). <https://doi.org/10.1002/tox.21978>.
- [66] D.S. Wishart, Y.D. Feunang, A. Marcu, A.C. Guo, K. Liang, R. Vázquez-Fresno, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, N. Karu, Z. Sayeeda, E. Lo, N. Assempour, M. Berjanskii, S. Singhal, D. Arndt, Y. Liang, H. Badran, J. Grant, A. Serra-Cayuela, Y. Liu, R. Mandal, V. Neveu, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, C. Manach, A. Scalbert, HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018, *Nucleic Acids Res.* (2018). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>.
- [67] P.M. Costa, E. Chicano-Gálvez, J. López Barea, T.A. Delvalls, M.H. Costa, Alterations to proteome and tissue recovery responses in fish liver caused by a short-term combination treatment with cadmium and benzo[a]pyrene, *Environ. Pollut.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.07.030>.
- [68] D. Wishart, D. Arndt, A. Pon, T. Sajed, A.C. Guo, Y. Djoumbou, C. Knox, M. Wilson, Y. Liang, J. Grant, Y. Liu, S.A. Goldansaz, S.M. Rappaport, T3DB: The toxic exposome database, *Nucleic Acids Res.* (2015). <https://doi.org/10.1093/nar/gku1004>.
- [69] C.A. Smith, G. O'Maille, E.J. Want, C. Qin, S.A. Trauger, T.R. Brandon, D.E. Custodio, R. Abagyan, G. Siuzdak, METLIN: A metabolite mass spectral database, in: *Ther. Drug Monit.*, 2005. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39>.
- [70] G.J. Finlay, B.C. Baguley, Effects of protein binding on the in vitro activity of antitumour acridine derivatives and related anticancer drugs, *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2000). <https://doi.org/10.1007/s002800051011>.
- [71] D.S. Wishart, Y.D. Feunang, A.C. Guo, E.J. Lo, A. Marcu, J.R. Grant, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, Z. Sayeeda, N. Assempour, I. Iynkkaran, Y. Liu, A. Maclejewski, N. Gale, A. Wilson, L. Chin, R. Cummings, D. Le, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic Acids Res.* (2018). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>.

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

a) Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

W październiku 2002 roku jako studentka V roku farmacji rozpoczęłam badania naukowe w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej ówczesnej Akademii Medycznej w Gdańsku, które wykonywałam w ramach pracy magisterskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Krystiana Kalety. Badania dotyczyły analizy wpływu wybranych efektorów allosterycznych na aktywność i właściwości regulacyjne deaminazy AMP (AMPD) – enzymu przemiany puryn pełniącego istotną rolę w regulacji metabolizmu energetycznego komórki. Następnie kontynuując podjęte zagadnienia, zgłębiałam tematykę dotyczącą badań nad właściwościami kinetycznymi, regulacyjnymi i strukturalnymi AMPD, a otrzymane wyniki stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej. Przeprowadzane doświadczenia dotyczyły zarówno świeżego, wyizolowanego preparatu AMPD z łożyska ludzkiego, jak i preparatu przechowywanego w 4°C i obejmowały ocenę potencjalnych zmian właściwości kinetyczno-regulacyjnych enzymu oraz stopnia jego degradacji. Ten etap pracy naukowej pozwolił mi w sposób teoretyczny i praktyczny zaznajomić się z metodami chromatograficznymi oraz z pomiarami kolorymetrycznymi i spektrofotometrycznymi. W ramach wykonywanych badań określiłam również strukturę podjednostkową i agregacyjną AMPD, odpowiednio przy użyciu techniki elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS oraz metody sączenia molekularnego na kolumnie wypełnionej Sepharozą CL-6B. Ponadto, istotnym elementem moich badań była ocena potencjalnych dróg degradacji adenozylo-5'-monofosforanu (AMP) w łożysku ludzkim poprzez analizę kluczowych enzymów katabolizmu nukleotydów purynowych (AMPD i cytozolowej 5'-nukleotydyazy-I (CN-I)) w oparciu o narzędzia biologii molekularnej. W tym celu przeprowadziłam analizę Northern blotting i Western blotting, izolację i elektroforezę RNA oraz zastosowałam metodę RT-PCR (ang. *reverse transcription polymerase chain reaction*), określając ekspresję genów kodujących izoformy AMPD i CN-I. W latach 2005-2007 byłam kierownikiem projektu badawczego (badania własne, W-922) zatytułowanego „Ekspresja genów oraz profile kinetyczno – regulacyjne deaminazy AMP oraz 5'-nukleotydyazy w łożysku ludzkim”. Oprócz wyżej opisanych badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, uczestniczyłam w innych projektach naukowych prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, które dotyczyły izolacji oraz analizy właściwości

regulacyjnych APMD wyizolowanej z tkanek, takich jak wątroba, grasica czy mięsień szkieletowy, a także określiłam ekspresję genów rodziny AMPD w raku wątrobowokomórkowym (ang. *human hepatocellular carcinoma*, HCC). Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora, z uwzględnieniem prac, na podstawie których powstała rozprawa doktorska, obejmuje: 3 prace oryginalne i 3 prace popularno-naukowe o łącznej wartości **IF = 4,560** i punktacji **MNiSW = 55,0** [*załącznik 4, punkt II.4a*]. Wyniki prowadzonych przeze mnie badań zaprezentowałam w formie 9 doniesień na zjazdach i konferencjach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym [*załącznik 4, punkt II.7a*]. Dodatkowo w roku 2002 odbyłam miesięczne szkolenie w aptece szpitalnej Bloomington Hospital and Healthcare System Pharmacy w USA, a w roku 2008 miesięczne szkolenie w dziale badań klinicznych w firmie Synevo w Gdańsku.

b) Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych moje zainteresowania naukowe skupiły się na celowanych i niecelowanych analizach związków endogennych oraz substancji leczniczych w materiale biologicznym z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi instrumentalnych, takich jak LC-MS i LC-MS/MS. Od kilku lat rozwijam swoje umiejętności analityczne głównie przy opracowywaniu nowych protokołów przygotowania próbek do analizy, gdyż etap ten jako pierwszy w całym procesie analitycznym w dużym stopniu warunkuje rzetelność uzyskanych wyników i prawidłową interpretację danych. Jest to szczególnie istotne szczególnie podczas izolacji związków endogennych oraz leków występujących w śladowych ilościach w materiale biologicznym.

Dotychczas przeprowadzone przeze mnie badania obejmowały zastosowanie różnych technik ekstrakcji w celu izolacji i oznaczania poziomu endogennych metabolitów w matrycach biologicznych. Dzięki współpracy Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej GUMed z Kliniką Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci GUMed uczestniczyłam w opracowaniu metody jednoczesnego oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach we krwi u dzieci chorych na mukowiscydozę [*zal. 4 punkt II.4b, poz. P.8.*]. W tych badaniach etap przygotowania próbki do analizy oparty był na strącaniu białek oraz technice LLE, a uzyskane wyniki umożliwiły oszacowanie poziomu witamin po rocznej terapii żywieniowej i były ważnym wskaźnikiem stanu odżywiania dzieci. Natomiast w ramach współpracy naukowej z Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMed brałam udział w badaniach określających

poziom wybranych amin biogennych przy użyciu techniki opartej na mikroekstrakcji do upakowanej strzykawki (ang. *microextraction in packed syringe*, MEPS) przy użyciu pipety półautomatycznej typu eVol [zal. 4 punkt II.4b, poz. P.7.]. Zoptymalizowana metoda MEPS-LC-HILIC-MS umożliwiła ocenę poziomu amin biogennych, ich prekursorów i metabolitów w osoczu i moczu pacjentów pediatrycznych. Ponadto, współpraca z wyżej wymienioną Kliniką zaowocowała powstaniem dwóch kolejnych prac, w których zoptymalizowałam technikę dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz (ang. *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) w celu jednoczesnej izolacji 13 neurotransmiterów o różnej polarności z próbek moczu [zal. 4 punkt II.4b, poz. P.9.]. Dodatkowo opracowałam metodę DLLME-LC-MS do oceny poziomu szeregu neurotransmiterów w próbkach osocza u pacjentów z neuroblastomą oraz w guzach Wilmsa. Otrzymane wyniki badań zostały opublikowane [zal. 4 punkt II.4b, poz. P.10.] oraz prezentowane były na międzynarodowych konferencjach naukowych [zal. 4 punkt II.7b, poz. 1,2,4,7].

W ramach badań prowadzonych podczas rocznego stażu podoktorskiego w grupie profesora Pawliszyna brałam udział w dodatkowych projektach, innych niż te opisane w cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia, obejmujących zastosowanie techniki SPME w badaniach biomedycznych. Podczas mojej pracy w University of Waterloo współpracowałam z Malignant Hyperthermia Investigation Unit w Department of Anesthesia and Pain Management, Toronto General Hospital i uczestniczyłam w analizach wykonywanych w ramach profilowania metabolomicznego mięśni pacjentów ze złośliwą hipertermią (ang. *Malignant Hyperthermia*, MH). Badania te obejmowały użycie włókien SPME do ekstrakcji endogennych metabolitów z fragmentów mięśni pobranych od pacjentów cierpiących na MH i miały na celu poszukiwanie nowych markerów tej choroby, a także korelację uzyskanych danych z wynikami badań genetycznych. Podłoże choroby MH nie jest w pełni poznane, a profil biochemiczny opracowany na podstawie analiz SPME-LC-MS może w przyszłości posłużyć jako ważne narzędzie diagnostyczne pacjentów z MH. Manuskrypt opisujący uzyskane wyniki badań został wysłany do czasopisma *Canadian Journal of Anesthesia*. Ponadto współpracując z Department of Latner Thoracic Surgery, Toronto General Hospital (TGH) rozpoczęłam projekt, który prowadzony był na płucach świń podczas wielogodzinnego zabiegu perfuzji płuc *ex vivo* (ang. *Ex Vivo Lung Perfusion*, EVLP). Analizy z zastosowaniem przygotowanych w laboratorium włókien *in vivo* SPME ze złożem HLB miały na celu oznaczenie profilu metabolomicznego i potencjalnych zmian zachodzących na poziomie molekularnym w płucach podczas 19-godzinnego EVLP, aby w przyszłości możliwe było prowadzenie wielogodzinnego zabiegu na organach wyizolowanych od pacjentów. W kolejnym projekcie prowadzonym we

współpracy z wyżej wymienioną jednostką uczestniczyłam w opracowywaniu wyników niecelowanych analiz metabolomicznych oraz określenia poziomu leków przeciwnowotworowych podanych według schematu FOLFOX (kwas folinowy, 5-fluorouracyl, oksaliplatyna) bezpośrednio do płuc świni podczas zabiegu IVLP. Podobnie, jak w przypadku badań w cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego [H4, H5], głównym założeniem wyżej wymienionego projektu było podanie leków bezpośrednio do płuc i ograniczenie jego dystrybucji układowej. W przeciwieństwie do tradycyjnej metody pobierania biopsji tkanki po zakończeniu zabiegu IVLP, zastosowanie techniki *in vivo* SPME umożliwiło kilkukrotną ekstrakcję leków podczas zabiegu, a także określenie profilu metabolomicznego tkanki płucnej jako odpowiedź na zastosowaną chemioterapię FOLFOX. Część wyników badań prowadzonych we współpracy z torakochirurgami z TGH została opracowana i opisana w manuskrypcie wysłanym do czasopisma *Journal of Pharmaceutical Analysis*, a pozostałe dane są w przygotowaniu. Badania obejmujące zastosowanie włókien SPME do ekstrakcji dokсорubicyny z płuc pacjenta podczas procedury IVLP zaprezentowałam w postaci doniesienia ustnego, a także wyniki te zostały przedstawione w formie prezentacji posterowych na międzynarodowych konferencjach naukowych [zal. 4 punkt II.7b, poz. 3,10,17].

Kolejnym nurtem badań związanych z użyciem technologii SPME była kontynuacja tematu podjętego w pracy [H1] i dotyczyła zastosowania *in vivo* SPME, *ex vivo* SPME i SLE w celu określenia wpływu czasu i temperatury na zmiany metabolomiczne tkanki mięśniowej ryb podczas 30-dniowego eksperymentu. Na podstawie przeprowadzonych badań i dogłębnych analiz z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych wykazaliśmy, że czas przechowywania próbek jest jednym z kluczowych czynników, który wpływa na stabilność endogennych związków małowcząsteczkowych przechowywanych zarówno w -20°C, jak i w -80°C. Największe zmiany w profilu metabolomicznym obserwowane były po pierwszym dniu przechowywania tkanek. Ponadto, w ramach niecelowanych badań metabolomicznych, uczestniczyłam w opracowaniu danych określających wpływ tzw. artefaktów eksperymentalnych w analizach LC-MS/MS na podstawie przeprowadzonych symulacji modeli *in silico* z wykorzystaniem ogólnodostępnych danych metabolomicznych. Manuskrypty opisujące uzyskane wyniki badań zostały wysłane do czasopism, ponadto wyniki badań zostały przedstawione na konferencjach międzynarodowych [zal. 4 punkt II.7b, poz. 14,16].

Aktualnie w ramach współpracy Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej GUMed z grupą badawczą profesora Pawliszyna oraz University of Toronto i Toronto General Hospital kontynuuję rozpoczęty jeszcze podczas stażu podoktorskiego projekt dotyczący profilowania

metabolomicznego surowicy krwi pacjentów cierpiących na łuszczycę i łuszczycowe zapalenie stawów. Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem ostrzy SPME i zestawu 96-dołkowego umożliwiającego ekstrakcję analitów jednocześnie z wielu próbek, a analizy wykonano przy użyciu wysokorozdzielczej spektrometrii mas. Głównym celem projektu jest poszukiwanie nowych markerów, które umożliwiłyby szybszą diagnozę pacjentów z łuszczycowym zapaleniem stawów. Wstępne wyniki analiz wykazały różnice w profilu metabolomicznym pomiędzy pacjentami ze słabym, średnim i silnym nasileniem objawów chorobowych. Wśród głównych związków endogennych rozróżniających badane grupy były metabolity związane z metabolizmem aminokwasów, a także wybrane kwasy tłuszczowe oraz prostaglandyny. Wyniki zostały zaprezentowane podczas międzynarodowej konferencji oraz zamieszczone w prestiżowym czasopiśmie *Arthritis & Rheumatology* jako materiały pokonferencyjne [zal. 4 punkt II.7b, poz. 18]. Dalsza część współpracy opierać się będzie na dogłębnej analizie profilu metabolomicznego oraz korelacji otrzymanych wyników z badaniami surowicy krwi przeprowadzonymi na próbkach otrzymanych od zdrowych ochotników.

Ponadto, w chwili obecnej moje zainteresowania naukowe dotyczą wykorzystania technik mikroekstrakcji w celowanych analizach metabolomicznych oraz w badaniach substancji leczniczych w różnych materiałach biologicznych. W ramach ścisłej współpracy z Katedrą Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej, Collegium Medicum w Bydgoszczy oraz Katedrą i Zakładem Anatomii GUMed opracowuję metodę jednoczesnej izolacji i oznaczania endogennych kannabinoidów z mózgu szczura wraz z korelacją poziomu receptorów dla endokannabinoidów w oparciu o analizy immunohistochemiczne. Układ endokannabinoidowy uczestniczy w wielu przemianach biochemicznych organizmu, w tym w regulacji gospodarki energetycznej, aktywności motorycznej i nastroju. Endokannabinoidy będące naturalnymi neuroprzekaźnikami o budowie lipidowej, wykazują działanie zarówno ośrodkowe na neurony podwzgórza oraz układu mezolimbicznego, jak i obwodowe, wpływając m.in. na czynność adipocytów. Pełna rola w procesach fizjologicznych i patologicznych nie jest jednak w pełni poznana. Większość endokannabinoidów występuje w materiale biologicznym na bardzo niskim poziomie, stąd też do ich analizy niezbędne jest zastosowanie wysoce czułej i selektywnej metody ekstrakcji. Opracowany protokół analityczny oparty o ekstrakcję SPME i analizę LC-MS/MS będzie mógł być w przyszłości wykorzystany do badań *in vivo* w celu monitorowania poziomu tych metabolitów w różnych strukturach mózgu. Wyniki wstępnych badań zostaną przedstawione w formie doniesienia ustnego podczas 18th International

Conference of “Monitoring Molecules in Neuroscience”, a także podczas XXXIV Międzynarodowego Kongresu Polskiego Towarzystwa Anatomicznego.

Kierunkiem poszerzającym moje umiejętności i wiedzę na temat technik przygotowania próbki do analizy oraz spektrometrii mas był udział w opracowania metod rozdziału i analizy białek w oparciu o SPE-LC-MS/MS. We współpracy z Katedrą i Zakładem Anatomii GUMed oraz Laboratorium Spektrometrii Mas Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i GUMed brałam udział w projekcie dotyczącym niecelowanych analiz proteomicznych przeprowadzonych na mózgu myszy. Badania miały na celu określenie potencjalnych różnic w składzie białek mózgowych ze względu na płeć badanych zwierząt. Wyniki badań zostały zaprezentowane na konferencji krajowej [*zal. 4 punkt II.7b, poz. 13*], za które otrzymałam nagrodę za najlepszą prezentację posterową. Manuskrypt opisujący wyniki otrzymanych analiz jest w trakcie przygotowania.

Ważnym, równoległe rozwijanym kierunkiem mojej aktywności naukowej jest udział w badaniach dotyczących optymalizacji technik mikroekstrakcji substancji leczniczych z konwencjonalnych i niekonwencjonalnych matryc biologicznych. Współpraca Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej GUMed z Kliniką Psychiatrii Dorosłych GUMed umożliwiła opracowanie procedury umożliwiającej monitorowanie stężenia atypowych leków przeciwpsychotycznych we krwi oraz ślinie pacjentów oraz korelacje uzyskanych wyników. Opracowując metodę ekstrakcji leków porównałam technikę DLLME i SPME pod kątem parametrów, takich jak wydajność procesu ekstrakcji oraz czasu trwania analizy i wykazałam, że technika SPME jest metodą szybszą i wydajniejszą, szczególnie przy jednoczesnej analizie wielu próbek biologicznych. Wyniki badań zostały przedstawione na międzynarodowej konferencji naukowej [*zal. 4 punkt II.7b, poz. 12*]. Ponadto uczestniczę w projekcie mającym na celu opracowanie wydajnej metody ekstrakcji i analizy wybranych leków immunosupresyjnych w osoczu. W ramach niniejszego projektu jestem zaangażowana w optymalizację etapu przygotowania próbek do analizy leków immunosupresyjnych metodą LC-MS/MS. Wstępne wyniki analiz zostały zaprezentowane na międzynarodowej konferencji CECE'2019 [*zal. 4 punkt II.7b, poz. 15*]. Wniosek o finansowanie badań nad analizą profili uwalniania leków immunosupresyjnych z biodegradowalnych stentów kardiologicznych, który prowadzony jest we współpracy z Uniwersytetem w Rostoku (University Medical Center Rostock, Institute for Biomedical Engineering) został złożony do Narodowego Centrum Nauki i aktualnie znajduje się w drugim etapie konkursu.

Posumowaniem moich dotychczasowych badań i zdobytej wiedzy dotyczącej techniki SPME jest praca przeglądowa, w której jestem pierwszym autorem, obejmująca przegląd

najnowszych aplikacji SPME w badaniach klinicznych i w analizach farmaceutycznych [zal. 4 punkt II.4b, poz. 13]. Praca ta znalazła się wśród 10% najczęściej czytanych publikacji czasopisma *Journal of Separation Science* w latach 2018-2019. Jestem również pierwszym autorem i równocześnie autorem korespondencyjnym rozdziału w książce wydawnictwa Springer, która ukazała się na początku 2020 roku i dotyczy zastosowania techniki *in vivo* SPME w badaniach środowiskowych i toksykologicznych [zal. 4 punkt II.2].

W kolejnych etapach pracy naukowej chciałabym w dalszym ciągu rozwijać swoje zainteresowania w obszarze metabolomiki oraz analiz farmaceutycznych przy wykorzystaniu nowoczesnych narzędzi analitycznych. Zamierzam zgłębić tematykę dotyczącą metabolomu mózgu i wdrożyć opracowany protokół analityczny do monitorowania poziomu związków endogennych w żywych organizmach jako element badań nad poszukiwaniem nowych markerów zaburzeń układu nerwowego, takich jak choroba Alzheimera. W ramach kontynuacji głównego kierunku badań planuję również wykonanie analiz mających na celu ocenę poziomu leków działających w ośrodkowym układzie nerwowym w różnych strukturach mózgu w organizmie żywym oraz monitorowanie poziomu endogennych metabolitów w odpowiedzi na zastosowaną farmakoterapię w wybranych chorobach układu nerwowego. Rozwinięcie tych problemów badawczych wymaga nawiązania współpracy z grupami naukowymi zarówno na macierzystej uczelni, jak i poza nią. Taką współpracę nawiązałam między innymi z firmą HemPoland, z którą w przyszłości zamierzam prowadzić badania dotyczące wpływu poszczególnych fitokannaibinoidów na wybrane struktury mózgowe w analizach *in vivo*. Ponadto współpracę w tym zakresie zamierzam także podjąć między innymi z polskimi i zagranicznymi klinikami neurochirurgicznymi.

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

Aktualnie w ramach działalności dydaktycznej prowadzę zajęcia dla studentów II i III roku kierunku farmacja na Wydziale Farmaceutycznym GUMed w ramach ćwiczeń z przedmiotu Chemia Farmaceutyczna. Prowadzę fakultet dla studentów II-III roku kierunku farmacja z zakresu „Wpływu substancji psychoaktywnych na funkcjonowanie organizmu ludzkiego”. Ponadto, w ramach programu POWER realizuję zajęcia fakultatywne dla słuchaczy Studiów Doktoranckich pt. „Praktyczne aspekty izolacji substancji biologicznie czynnych z próbek biologicznych, farmaceutycznych i środowiskowych”. Prowadzę zajęcia stacjonarne

oraz on-line w formie e-learningu. Ponadto od roku 2012 prowadzę ćwiczenia i seminaria w języku angielskim dla studentów III roku kierunku lekarskiego English Division na Wydziale Lekarskim GUMed z przedmiotu Farmakologia i Toksykologia.

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych prowadziłam zajęcia z przedmiotu Biochemia dla studentów II roku kierunku farmacja na Wydziale Farmaceutycznym oraz dla studentów II roku kierunku lekarsko-dentystycznego GUMed, a także zajęcia z tej samej tematyki prowadzone w języku angielskim dla studentów II roku kierunku lekarskiego English Division na Wydziale Lekarskim GUMed. W latach 2012-2015 prowadziłam ćwiczenia i seminaria w zakresie Farmakologii i Toksykologii dla studentów III roku Wydziału Lekarskiego oraz studentów II roku pielęgniarstwa i położnictwa GUMed. W roku akademickim 2014-2015 byłam odpowiedzialna za planowanie i prowadzenie zajęć z przedmiotu Farmakologia Kliniczna dla studentów V roku English Division GUMed. W 2015 roku przeprowadziłam wykład pt. „Farmakogenomika w onkologii” w ramach kursu specjalizacyjnego dla diagnostów laboratoryjnych.

W latach 2017-2020 byłam opiekunem 3 prac magisterskich wykonywanych przez studentów Wydziału Farmaceutycznego GUMed. Sprawowałam również opiekę merytoryczną nad studentami uczelni zagranicznych, przebywających na naszym Wydziale w ramach odbywania praktyk lub z tytułu międzynarodowej wymiany studentów. Od roku 2015 prowadzę zajęcia ze studentami ze Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GUMed. Uzyskane wyniki badań zostały zaprezentowane w roku 2016 podczas Sympozjum Studenckich Kół Naukowych Wydziału Farmaceutycznego GUMed oraz w roku 2017 podczas Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej "Pacjent pediatryczny - priorytet we współpracy lekarza farmaceuty".

W zakresie działalności organizacyjnej byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego Międzynarodowego Konkursu Wiedzy Neurobiologicznej Brain Bee w roku 2019 i 2020. Ponadto byłam członkiem Komitetu Organizacyjnego międzynarodowej konferencji naukowej CECE'2019: 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Gdańsk, Poland. Aktywnie uczestniczyłam w jej przygotowaniu organizacyjnym i programowym oraz w przeprowadzeniu i podsumowaniu konferencji. Aktualnie jestem członkiem Komitetu Organizacyjnego XXVI Konferencji Naukowej Wydziału Farmaceutycznego, która odbędzie się w dniach 10-11 grudnia 2020 roku na Wydziale Farmaceutycznym GUMed.

W ramach aktywności popularyzujących naukę wygłosiłam wykład podczas III. Ogólnopolskiej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej Ratownictwo w Zintegrowanym Systemie, która odbyła się w dniach 29-30 maja 2018 roku w Szkole Policji w Słupsku.

Tematem wykładu był „Mechanizm działania substancji psychoaktywnych a użycie paralizatora elektrycznego - potencjalny wpływ na organizm człowieka”. Ponadto, w roku 2019 zostałam zaproszona przez Studenckie Koło Naukowe „Vermis” przy Zakładzie Anatomii i Neurobiologii GUMed o przedstawienie wyników badań i możliwości wykorzystania narzędzi SPME w badaniach klinicznych, szczególnie z obszaru neurobiologii.

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

Za prowadzone badania naukowe i osiągnięcia otrzymałam dwie Nagrody Naukowe Zespołowe Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2009 (nagroda I-stopnia za analizę peroksydacji lipidów i degradacji nukleotydów adeninowych w łożysku ludzkim) oraz 2016 (nagroda I-stopnia za zastosowanie nowoczesnych metod w analizie substancji endogennych i ich metabolitów). W roku 2018 zdobyłam nagrodę za najlepszą prezentację posterową podczas XXV Konferencji Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed. W roku 2019 publikacja, w której jestem pierwszym autorem [H2] została wyróżniona jako jedna z pięciu najlepszych publikacji 2018 roku w czasopiśmie *Environmental Science & Technology Letters* (American Chemical Society).

W latach 2017-2020 byłam recenzentem 15 publikacji naukowych w czasopismach: *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *Analytica Chimica Acta*, *Chromatographia*, *Folia Morphologica*, *Open Life Science*, *Journal of Separation Science*, *Bioanalysis*, *Journal of Chromatography B*, *Pharmaceutics* oraz *Drug Testing and Analysis* [zal. 4 punkt II.13].

W ramach rozwoju kompetencji naukowo-badawczych, w roku 2015 odbyłam kurs z zakresu nowych procedur w badaniach na zwierzętach prowadzony w GUMed oraz kurs z zakresu technik mikroekstrakcji prowadzony przez GUMed. W roku 2016 odbyłam kurs mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) prowadzony w University of Waterloo w Kanadzie. Ponadto w latach 2016 i 2018 brałam udział w dwudniowych spotkaniach Centrum Medycyny Translacyjnej GUMed w Sobieszewie poświęconych pracom nad rozwojem między innymi obszarów badań farmaceutycznych, klinicznych i metabolicznych służących medycynie spersonalizowanej i rozwojowi nowych metod diagnostyki, terapii i analiz środowiskowych. W roku 2017 uczestniczyłam w konferencji Bioinnovation International Summit 2017 w Gdańsku poświęconej tematyce procesu transferu technologii począwszy od innowacyjnej idei poprzez negocjacje z inwestorami, pozyskiwanie finansowania zewnętrznego ze środków publicznych oraz ochronę własności intelektualnej [zal. 4 punkt II.7b, poz.8]. W roku 2019

uczestniczyłam w wizycie studyjnej organizowanej przez Stowarzyszenie „Pomorskie w UE”/Biuro Regionalne Województwa Pomorskiego w Brukseli, podczas którego przedstawiciele uczelni europejskich poruszali zagadnienia takie, jak: EU Health Policy, EU Health Research, Digital transformation in health, University-Business Cooperation in practice. Ponadto brałam udział w spotkaniu EIT Health Matchmaking organizowanym przez Centrum Medycyny Translacyjnej GUMed wraz z European Institute of Innovation & Technology (EIT), które odbyło się w roku 2019 w Barcelonie i miało na celu zapoznanie się z aktualnie prowadzonymi projektami naukowymi w Unii Europejskiej z zakresu szeroko pojętego obszaru medycyny oraz nawiązanie kontaktów do przyszłych wspólnych europejskich projektów badawczych.

W ramach rozwoju kompetencji dydaktycznych, w roku 2016 brałam udział w kursie dla nauczycieli akademickich prowadzonym w University of Waterloo, a w roku 2018 odbyłam szkolenie z zakresu ochrony danych osobowych. W latach 2018-2019 uczestniczyłam w cyklu kursów „Rozwój kompetencji kadry dydaktycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego”, którego zakres obejmował podniesienie kompetencji kadry w zakresie innowacyjnych umiejętności dydaktycznych (kurs: „Nowoczesne metody aktywizacji studentów”) oraz podniesienie kompetencji kadry w zakresie umiejętności informatycznych, korzystania z baz danych i podstaw zarządzania informacją (kursy: „Umiejętność posługiwania się programami statystycznymi”, „Kurs e-learningu”, „Kurs z zakresu zaawansowanych prezentacji multimedialnych”). W roku 2020 odbyłam kurs e-learningowy „Pedagogika dorosłych”, który obejmował następujące zagadnienia: Terminologia w pedagogice, Wprowadzenie do pedagogiki, Wprowadzenie do andragogiki, Człowiek dorosły i jego możliwości rozwojowe, Dydaktyka człowieka dorosłego, Budowanie relacji społecznych sprzyjających uczeniu się, Kwalifikacje i kompetencje, Podstawy emisji głosu, Technologie Informacyjno-komunikacyjne w edukacji dorosłych oraz Jakość edukacji w szkole wyższej.

Anna Roszkowska
