

Autoreferat

Ewelina Dziurkowska

Ślina jako materiał diagnostyczny do analizy leków psychotropowych

Ślina jako materiał diagnostyczny do analizy leków psychotropowych

1. Imię i nazwisko: Ewelina Dziurkowska
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

28.05.2003 r. – mgr farmacji, na podstawie pracy magisterskiej pt. „Oznaczanie florfenikolu w osoczu krwi metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej”, wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademii Medycznej w Gdańsku, promotor – prof. dr hab. Henryk Lamparczyk

11.10.2011 r. – doktor nauk farmaceutycznych, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ leków przeciwdepresyjnych na poziom kortyzolu w ślinie kobiet z depresją”, wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, promotor – prof. dr hab. Marek Wesołowski

27.06.2011 r. – Specjalizacja z Analityki Farmaceutycznej

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.12.2003 - 30.11.2008 – asystent, Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna w Gdańsku

01.12.2008 - 31.08.2013 – asystent, Katedra i Zakład Chemii Analitycznej, Akademia Medyczna w Gdańsku (aktualnie Gdański Uniwersytet Medyczny)

01.09.2013 - nadal – adiunkt, Katedra i Zakład Chemii Analitycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego

(art. 221 ust. 14 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.)

Osiągnięcie naukowe pt. „Ślina jako materiał diagnostyczny do analizy leków psychotropowych” stanowi cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych dotyczących badań nad zastosowaniem śliny do analizy stężenia leków przeciwdepresyjnych i przeciwpsychotycznych u osób leczonych związkami psychotropowymi z wykorzystaniem do izolacji substancji aktywnych ekstrakcji do fazy stałej. Jest to kontynuacja badań nad wykorzystaniem śliny jako materiału diagnostycznego i związanych z tym metod izolacji substancji aktywnych zapoczątkowanych i przedstawionych w pracy doktorskiej. W cyklu 6 publikacji habilitacyjnych przedstawiłam metody, które opracowałam do oczyszczania śliny i izolacji związków stosowanych w zaburzeniach psychicznych m.in. depresji, schizofrenii czy choroby afektywnej dwubiegunowej. Ponadto, publikacje przedstawiają zastosowanie opracowanych metod do oznaczenia stężenia analitów w ślinie osób leczonych badanymi lekami. Łączny współczynnik oddziaływania IF prac habilitacyjnych wynosi 16,392 i 390 punktów MNiSW. Poza osiągnięciem habilitacyjnym dorobek po doktoracie stanowi 10 publikacji o wartości IF: 15,227 i punktacji MNiSW=315. Całkowity dorobek naukowy

po doktoracie wynosi IF: 31,619 i 705 punktów MNiSW. Indeks-h według bazy Web of Science wynosi 4, oraz według bazy Scopus wynosi 4.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Ślina jako materiał diagnostyczny do analizy leków psychotropowych

4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

H1. Dziurkowska Ewelina, Wesołowski Marek, Simultaneous quantification of citalopram and its main metabolite, desmethylcitalopram, in human saliva by UHPLC. *Curr. Anal. Chem.* 2018, vol. 14, s. 554-561. doi:10.2174/1573411013666171113144 10

Impact Factor: 1.242

Punktacja MNiSW: 20.000

H2. Dziurkowska Ewelina, Wesołowski Marek, Evaluation of solid-phase extraction procedures for the quantitation of venlafaxine in human saliva by high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2018, vol. 41, s. 2151-2160. doi:10.1002/jssc.201701184

Impact Factor: 2.516

Punktacja MNiSW: 30.000

H3. Dziurkowska Ewelina*, Wesołowski Marek, Solid phase extraction purification of saliva samples for antipsychotic drug quantitation. *Molecules* 2018, vol. 23, s. 1-11. doi:10.3390/molecules23112946

Impact Factor: 3.060

Punktacja MNiSW: 30.000

H4. Dziurkowska Ewelina*, Wesołowski Marek, Simultaneous quantification of antipsychotic and antiepileptic drugs and their metabolites in human saliva using UHPLC-DAD. *Molecules* 2019, vol. 24, s. 1-20. doi:10.3390/molecules24162953

Impact Factor: 3.267

Punktacja MNiSW: 100.000

H5. Dziurkowska Ewelina*, Jiménez-Morigosa Cristian, López-Rivadulla Manuel, Wesołowski Marek, Development and validation of solid-phase extraction coupled with a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of olanzapine in saliva. *J. Chromatogr. B* 2020, vol. 1136, s. 1-14. doi:10.1016/j.jchromb.2019.121896

Impact Factor: 3.004

Punktacja MNiSW: 70.000

H6. Dziurkowska Ewelina*, Wesołowski Marek, Effects of age, drug dose, and sampling time on salivary levels of olanzapine, quetiapine, and their metabolites. *J. Clin. Med.* 2020, vol. 9, 3288. Doi: 10.3390/jcm9103288

Impact Factor: 3.303

Punktacja MNiSW: 140.000

* - autor korespondencyjny

4.3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych rezultatów wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Dobór odpowiedniej dawki leku podczas terapii zaburzeń psychicznych jest jednym z ważniejszych zagadnień w psychiatrii. Ze względu na często ciężki stan psychiczny pacjenta najczęściej leczenie rozpoczyna się od wysokich dawek. Z drugiej strony zastosowanie wysokich dawek leków kiedy pacjent ma współistniejące choroby lub jego waga nie przekracza 70 kg, a także jest w bardzo młodym wieku, może spowodować szybkie wystąpienie działań niepożądanych. Ponadto, w przypadku depresji działanie terapeutyczne niektórych leków, w szczególności I generacji, uwidacznia się po kilku tygodniach. W tym czasie pojawiają się nasilonych działań ubocznych i nadal trwający stan chorobowy może skutkować odstawieniem leków lub nawet samobójstwem.

W przypadku neuroleptyków, których efekt działania jest widoczny po krótkim czasie od rozpoczęcia terapii, istnieje prawdopodobieństwo, iż pacjent zaprzestanie terapii, gdy jego stan ulegnie poprawie. Natomiast brak poprawy stanu zdrowia może oznaczać, że dawka nie jest odpowiednio dobrana lub lek jest zbyt szybko metabolizowany. Możliwe jest również nieodpowiednie wchłanianie leku. Należy pamiętać, że w przypadku schizofrenii leczenie neuroleptykami jest wymagane praktycznie do końca życia. Długotrwała i dobrze dobrana terapia pozwala pacjentowi funkcjonować w społeczeństwie prawie bezproblemowo. Jednak niekiedy w wyniku niekorzystnych zdarzeń losowych jak dodatkowy stres, czy np. trwająca obecnie pandemia, może dojść do nawrotu lub nasilenia objawów choroby. Wówczas musi nastąpić zmiana podawanych leków. Ponadto, często zdarza się, że chory nie chce pogodzić się z wyrokiem, jakim jest diagnoza i zaraz po poprawie stanu zdrowia i ustąpieniu najbardziej nieprzyjemnych objawów choroby, nie kontynuuje terapii, co kończy się nawrotem choroby. Jednak zaostrzenie objawów następuje dopiero kilka tygodni po zaprzestaniu terapii, co utwierdza pacjenta w przekonaniu, że przyjmowane leki nie są mu potrzebne.

Monitorowanie poziomu ksenobiotyku pozwala określić, czy pacjent prawidłowo przyjmuje leki, a obserwacja głównych metabolitów, najczęściej również aktywnych, daje odpowiedź, czy metabolizm związku macierzystego jest prawidłowy. Kontrola stężenia leku w organizmie i jego metabolizmu pozwala na określenie czy dawkowanie jest prawidłowe, a także pozwala na jego modyfikacje.

Podstawowym materiałem służącym do monitorowania poziomu leków w organizmie jest krew. Jednak związane z jej pobieraniem niedogodności, jak obecność wyspecjalizowanego personelu, potrzeba użycia sterylnego sprzętu, czy sam sposób jej pobrania – użycie igieł, jest stresujące i uciążliwe dla osoby badanej, w szczególności, gdy monitoring powinien być regularny. Dodatkowo, osoby bojące się igieł, mogą nie chcieć współpracować podczas oddawania próbki tego materiału. Alternatywą dla krwi jest mocz lub ślina. W przypadku moczu zwykle prowadzi się jego zbiórkę dobową, co również może być problematyczne dla pacjenta z objawami choroby psychicznej. Ponadto, nie daje możliwości szybkiej weryfikacji aktualnego stężenia leku w

organizmie. Natomiast ślina może stanowić alternatywę dla krwi i moczu jako potencjalny materiał diagnostyczny [1].

Ślina wydzielana jest w ilości od 0,5 do 1,5 L na dobę, przez gruczoły ślinowe zwane śliniankami, zlokalizowane w jamie ustnej. Wyróżniamy trzy główne pary gruczołów – przyuszne, podjęzykowe oraz podżuchwowe. Ponadto, wydzielana jest również przez mniejsze gruczoły zlokalizowane w śluzówce języka. Gruczoły ślinowe zbudowane są z dwóch typów komórek – śluzowych oraz surowicznych w różnym stosunku ilościowym. Poszczególne typy komórek mogą być regulowane zarówno przez układ współczulny jak i przywspółczulny, co wpływa na rodzaj wydzielanej śliny. Komórki surowicze kontrolowane są przez układ współczulny, podczas gdy śluzowe przez oba rodzaje autonomicznego układu nerwowego. W zależności od pobudzonej części układu nerwowego wydzielana ślina różni się składem i właściwościami. Układ współczulny odpowiada na produkcję śliny bogatej w jony potasowe oraz białko. Natomiast, wydzielona pod wpływem układu przywspółczulnego cechuje się niską zawartością związków zarówno organicznych jak i nieorganicznych [2].

Ślina w 99,5% składa się z wody, pozostała część to białka (0,3%) oraz związki nieorganiczne i substancje śladowe (0,2%). Oprócz wydzieliny pochodzącej bezpośrednio z gruczołów ślinowych w jej skład wchodzi śluz z jamy nosowej, a także zrogowaciałe komórki nabłonka, cząstki pokarmu czy bakterie zamieszkujące jamę ustną. Wśród składników śliny znajdują się również elementy krwi, jak białka osocza, erytrocyty czy leukocyty [2]. Do najważniejszych zadań śliny należy zachowanie homeostazy w jamie ustnej oraz ochrona błony śluzowanej. Dodatkowo, ze względu na obecność białek takich jak immunoglobuliny, peroksydazy czy lizozym, ochrona przed patogenami oraz hamowanie wzrostu mikroorganizmów. Ponadto, zwilża pokarm ułatwiając tworzenie kęsów możliwych do przełknięcia, a zawarta w niej α -amylaza zapoczątkowuje trawienie skrobi. Dzięki obecności wodorowęglanów ślina buforuje kwaśne składniki pokarmów, a także bierze udział w percepcji smaków. Zawarty w niej wapń zapewnia odpowiednią mineralizację szkliwa. Wśród pozostałych minerałów znajdują się sód, potas, magnez i chlorki. Ich stężenie powoduje, iż ślina w stosunku do osocza jest hipotoniczna, a jej pH może wahać się od 6,2 do 7,4 [3].

Ślina jest cieczą nieniutonowską, a swoją strukturą przypomina słaby żel. W jej budowie wyróżnia się cztery podstawowe elementy organizacyjne. Pierwszy z nich stanowi faza ciągła, w której skład wchodzi woda wraz z elektrolitami. Kolejnym elementem jest rusztowanie, w którego skład wchodzi glikoproteiny o dużej masie cząsteczkowej oraz jony, przede wszystkim wapnia, które stabilizują strukturę. Ten element śliny odpowiada za tworzenie filmu na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej oraz jej ochronę. Następne elementy są obserwowane wewnątrz sieci. Można tu wyróżnić białka słabo rozpuszczalne w wodzie, micide i inne struktury globularne (trzeci element organizacyjny), a ponadto bakterie, złuszczone komórki nabłonka oraz związki lipidowe (czwarty element organizacyjny) [3].

Wśród związków organicznych występujących w ślinie znajdują się m.in. kwas moczowy, kreatynina, bilirubina, glukoza, aminokwasy czy aminy. Najważniejszymi jednak składnikami ze względu na wartość diagnostyczną, a także rolę jaką pełnią w organizmie są białka i peptydy. Wśród występujących w ślinie znajdują się te wytwarzane przez ślinianki, a także pochodzące z osocza. Aktualnie zidentyfikowano ponad 2400 tego typu związków, z których większość stanowią białka wspierające układ odpornościowy (21%). Do innych zadań polipeptydów należą naprawa i replikacja białek, a także kontrola: funkcji wydzielniczych komórek, przekazywania impulsów oraz metabolizmu. Ponadto, białka stanowią istotny element cytoszkieletu śliny, a także hamują wytrącanie się jonów wapniowych. Innymi związkami, których obecność w ślinie jest istotna ze względów diagnostycznych są hormony steroidowe. Do najczęściej oznaczanych należą kortyzol, testosteron, progesteron, 17-hydroksyprogesteron, aldosteron oraz dehydroepiandrosteron (DHEA) [4].

Zainteresowanie śliną jako materiałem diagnostycznym wynika między innymi z tego, że jej pobór jest szybki, nie wymaga obecności wyspecjalizowanego personelu, a także zwykle wzbudza mniejsze kontrowersje i sprzeciw ze strony pacjenta. Ślina może być pobrana jednorazowo, a często dla ułatwienia jej pobierania stosuje się bawełniane gaziki, co zwiększa jej wydzielanie. Warunkiem traktowania śliny jako wartościowego materiału diagnostycznego jest wystąpienie korelacji pomiędzy stężeniem leku we krwi i ślinie. Należy jednak pamiętać, że leki przedostają się z krwi do śliny najczęściej za pomocą dyfuzji biernej. Ponadto, tylko frakcja leku niezwiązana z białkiem, zwana wolną może przejść do śliny. Ze względu na to, iż to właśnie ta frakcja jest odpowiedzialna za działanie leku oraz podlega dalszym przemianom, określenie jej stężenia pozwala wyciągnąć wnioski o losach leku w organizmie [1].

Ślina jako materiał biologiczny może być zanieczyszczona resztkami pożywienia, a także lekami, co może wpływać na przebieg oznaczenia. Dlatego zwykle przed pobraniem próbki należy przepłukać jamę ustną wodą, a dodatkowo zaleca się powstrzymanie od spożywania jedzenia i picia co najmniej pół godziny, a najlepiej 2-3 godzin przed pobraniem próbki. Sam pobór nie powinien trwać dłużej niż 5 minut. Konieczne jest również zastosowanie pewnych kroków zaraz po zakończeniu pobierania śliny, jak wirowanie, czy mrożenie. Ślina zaraz po pobraniu może być przechowywana w lodówce, jednak czas ten nie powinien przekroczyć 2 h. Natomiast przechowywanie próbek w temperaturze poniżej -21°C zapobiega rozkładowi niestabilnych analitów oraz namnażaniu się bakterii [1].

Ślina może być pobierana po uprzedniej stymulacji lub bez niej. Pobudzenie wydzielania śliny odbywa się poprzez żucie niearomatyzowanej parafiny lub wosku, a także kwasu cytrynowego. Stymulacja wydzielania śliny może prowadzić do zmiany poziomu analitów, w szczególności tych na poziom których wpływa przepływ śliny. Ten sposób pozyskiwania próbki ma jednak pewne zalety. Podczas jego stosowania objętość otrzymanej w krótkim czasie próbki jest większa. Dodatkowo, podczas szybkiego wydzielania zmniejsza się gradient pH między śliną a osoczem, co może zwiększyć wydzielanie niektórych związków. Oznacza to również, że otrzymane wyniki mogą być

mniej wiarygodne. Dlatego też nie jest to metoda zalecana, a w przypadku gdy jest ona jedyną dostępną alternatywą, sposób stymulacji musi być dokładnie odwzorowany przez cały czas trwania eksperymentu [1].

W przypadku pobierania śliny bez wcześniejszej stymulacji bezpośrednio do probówki zwykle otrzymana objętość jest mniejsza, a często nie przekracza 1 mL, która to objętość jest najczęściej wymaganą, aby móc oznaczyć w niej substancje z odpowiednią precyzją i dokładnością. Ponadto, podczas bezpośredniego płucia ślina jest często gęsta i zanieczyszczona. Wśród innych metod służących pozyskiwaniu śliny można wymienić odsysanie przez specjalnie do tego celu skonstruowane przyrządy. Zapewniają one pobór śliny z poszczególnych ślinianek oraz większą objętość próbki niż w przypadku płucia. Kolejnym sposobem poboru śliny jest umieszczenie odpowiedniego gazika w ustach, który nasiąka wydzieliną. Umożliwia on w krótkim czasie otrzymanie śliny w objętości minimum 1 mL. Gaziki są polecane w szczególności do pobierania próbek od dzieci, a także osób starszych i mających trudności z technikami pasywnymi, takimi jak bezpośrednie płucie. W przypadku, gdy próbka jest pobierana, np. od dzieci lub osób z zaburzeniami psychicznymi, zalecane jest używanie specjalnie skonstruowanego wacika, który umieszczony jest na plastikowym patyczku, co uniemożliwia jego połknięcie i zadławienie się osoby badanej. Ponadto, patyczek posiada wskaźnik odpowiedniego nawilżenia, co ułatwia określenie czasu pobierania próbki. Pobór śliny za pomocą wacika jest niezwykle pomocny również w przypadku badania poziomu leków psychiatrycznych, które często zmniejszają ilość wydzielanej śliny. Wówczas umieszczenie wacika w jamie ustnej pozwala zwiększyć jej wydzielanie [5].

Analiza chromatograficzna związków biologicznie czynnych w ślinie musi być poprzedzona oczyszczeniem próbki, co wynika przede wszystkim z obecności związków białkowych oraz ich pochodnych, np. glikoprotein w matrycy. Ich obecność powoduje pojawienie się na chromatogramach licznych pików, co znacząco zmniejsza wykrywalność związków występujących w niskich stężeniach, a także skraca żywotność kolumn chromatograficznych. Ze względu na mniejsze rozpowszechnienie śliny jako materiału diagnostycznego często brak jest jednolitych procedur dotyczących postępowania z próbkami śliny, począwszy od sposobu jej pobierania, przez sposób przechowywania, do metod oczyszczania i izolacji związków badanych. Często izoluje się anality ze śliny za pomocą tej samej procedury jaką stosuje się do oznaczania związków we krwi, ale ze względu na specyfikę śliny, konieczne jest zastosowanie odpowiednich modyfikacji [5].

Pierwszym etapem oznaczenia ksenobiotyków w ślinie jest opracowanie metody jej oczyszczania. Najczęściej oznaczanie leków przeciwdepresyjnych poprzedza ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE - *liquid-liquid extraction*). W przypadku citalopramu w momencie publikacji wyników moich badań dostępne były tylko dwa artykuły, w których izolację citalopramu prowadzono ekstrakcją ciecz-ciało stałe (SPE - *solid phase extraction*) [6,7] oraz jeden, w której opisywano izolację związku za pomocą LLE [8]. Żadna z dostępnych publikacji nie obejmowała równoczesnego oznaczania citalopramu i jego głównego metabolitu demetylocitalopramu w ślinie. W związku z powyższym opracowałam dwie

metody oczyszczania śliny wykorzystując LLE i SPE oraz równoczesnej izolacji citalopramu i demetylocitalopramu, a także porównałam wydajność obu ekstrakcji (**H1**). Podczas opracowywania metod ekstrakcji pobierano ślinę w godzinach wieczornych, bez uprzedniej stymulacji jej wydzielania. Materiał biologiczny był zamrażany, a przed rozpoczęciem analizy rozmrażany i odwirowywany. Do obu typów ekstrakcji używano po 1 mL śliny. W przypadku LLE do izolacji analitów ze śliny zastosowano dichlorometan. W przypadku SPE podczas optymalizacji proces ekstrakcji stosowano kolumnienki ze złożem C18 oraz C8. Dodatkowo, zbadano wpływ pH i rodzaj roztworu do przemywania złoża na wydajność ekstrakcji. Najodpowiedniejsze okazało się złożo C18, które po naniesieniu próbki przemywano roztworem kwasu mrówkowego o pH 3,5. Do wymycia analitów ze złoża użyto metanolu. Analizy ilościowej obu związków dokonano za pomocą HPLC z detekcją DAD. W obu przypadkach wyznaczono linowość metod w zakresie stężeń 10-1000 ng/mL, a LOQ dla obu związków wyniosło 4 i 8 ng/mL, odpowiednio dla SPE oraz LLE. Oba typy ekstrakcji charakteryzowały się wysokim odzyskiem, który dla citalopramu przekroczył 92%. Natomiast aktywny metabolit dużo lepiej ekstrahował się za pomocą SPE (>93%) niż LLE (>73%). Przeprowadzono również ocenę statystyczną otrzymanych wyników, na podstawie której stwierdzono, iż obie opracowane metody charakteryzowały się dobrą precyzją. W obu przypadkach dla badanych stężeń RSD nie przekroczyło 15%. Natomiast, testy F-Snedecora i t-Studenta wykazały, iż precyzja jednego dnia dla demetylocitalopramu oznaczonego w stężeniu 200 i 750 ng/mL oraz precyzja pośrednia w stężeniu 750 ng/mL była statystycznie wyższa dla SPE niż LLE. Różnic istotnych statystycznie nie zauważono natomiast w przypadku citalopramu. Opracowaną metodę izolacji z użyciem SPE zastosowano do analizy śliny pobranej od pacjentów leczonych citalopramem. We wszystkich badanych próbkach oznaczono zarówno związek macierzysty jak i jego metabolit, a ich stężenia mieściły w zakresach 22,7–741,1 ng/mL oraz 4,6–177,3 ng/mL, odpowiednio dla citalopramu i demetylocitalopramu. Oznaczone stężenia citalopramu były zgodne z danymi literaturowymi, natomiast porównanie otrzymanych wyników w przypadku demetylocitalopramu nie było możliwe ze względu na brak danych w piśmiennictwie.

Mniejsze zużycie toksycznych rozpuszczalników, krótszy czas potrzebny na izolację związków ze śliny i możliwość automatyzacji, a także brak tworzenia się emulsji w trakcie procesu oczyszczania próbki spowodował, iż kolejne związki izolowane były ze śliny z użyciem SPE. Dodatkowo, w przypadku śliny ten typ ekstrakcji nie wymaga zastosowania wstępnego mrożenia próbki jako sposobu deproteinizacji. W tym celu możliwe jest zastosowanie, np.: metanolu lub acetonitrylu, co dodatkowo skraca czas przygotowania próbki do analizy.

Wykorzystanie SPE do izolacji związków o działaniu przeciwdepresyjnym badano również w przypadku wenlafaksyny (**H2**). Dostępne dane literaturowe nie wskazywały jednoznacznie, które z dostępnych złożeń pozwolą na selektywną izolację tego związku z materiału biologicznego. Ponadto, podstawowym materiałem diagnostycznym w przypadku wenlafaksyny również jest krew. Nieliczne badania przeprowadzono z użyciem śliny [6,9,10], a wśród metod izolacji znalazły się zarówno te wykorzystujące

ekstrakcję ciecz-ciecz [9], jak i ciecz ciało-stałe [6,10]. Biorąc powyższe pod uwagę zdecydowałam się na zbadanie, które z dostępnych źródeł pozwoli na izolację wenlafaksyny ze śliny. Wykorzystałam pięć typów kolumnienek pochodzących od różnych producentów oraz pięć procedur ekstrakcyjnych. Wśród analizowanych źródeł znalazły się sorbenty wykorzystywane do analizy związków organicznych i lipofilnych izolowanych z matryc wodnych, jak np. krew (C18 i C8), związków aromatycznych (Strata-X), związków o charakterze słabych zasad (Strata X-C) oraz o charakterze kwasowym (Strata X-AW). Zastosowane procedury obejmowały różne rozpuszczalniki organiczne, które stosowano do jedno lub dwustopniowego przemywania złoża po nałożeniu analizowanej próbki oraz wymywania zaadsorbowanego analitu. Opracowano 5 procedur postępowania. Procedura pierwsza obejmowała dwuetapowe przemycie złoża (woda dejonizowana; mieszanina (1:1) metanolu i wody dejonizowanej). Wymycie analitu ze złoża odbywało się za pomocą metanolu. W procedurze drugiej zmodyfikowano drugi etap przemywania złoża, który przeprowadzono używając mieszaniny metanolu i wody (5:95; v:v). Natomiast do wymycia analitu zastosowano acetonitryl. W procedurze trzeciej do przemycia złoża użyto buforu fosforowego i mieszaniny metanolu i buforu fosforanowego (5:95; v:v). Natomiast analit wymywano ze złoża 25% amoniakiem i metanolem w proporcji (5:95; v:v). Procedura czwarta obejmowała przemywanie złoża buforem fosforanowym oraz mieszaniną metanolu i wody dejonizowanej (5:95; v:v). Wymycie analitu następowało mieszaniną 25% amoniaku i acetonitrylu (5:95; v:v). Ostatnia z procedur przewidywała jednoetapowe przemycie złoża za pomocą wody dejonizowanej oraz wymycie analitu metanolem. Przed przystąpieniem do analizy wszystkie próbki śliny były wirowane oraz filtrowane, a następnie w celu deproteinizacji dodano acetonitryl i obciążano odpowiednią ilością roztworu roboczego wenlafaksyny. W celu rozcieńczenia do próbki dodawano buforu fosforanowego. Tak przygotowane próbki poddano każdemu z 25 typów postępowania izolacji związku, a otrzymane ekstrakty analizowano chromatograficznie za pomocą HPLC z detekcją UV przy długości fali 226 nm. Fazę ruchomą stanowił układ acetonitryl:bufor fosforanowy o pH 5,5 (30:70; v:v) o przepływie 1 mL/min, natomiast rozdział przeprowadzono stosując fazę stacjonarną C18.

Opracowując kolejne procedury ekstrakcyjne brałam pod uwagę właściwości fizykochemiczne wenlafaksyny, czyli dobrą rozpuszczalnością w metanolu, dysocjacją w wodzie i zmniejszoną dysocjacją w buforze fosforanowym. Ponadto, do pierwszego etapu przemywania w celu usunięcia maksymalnej liczby zanieczyszczeń hydrofilowych użyto wody dejonizowanej lub buforu fosforanowego. W następnym kroku złoża przemywano mieszaniną metanolu z wodą dejonizowaną lub buforem fosforanem, co miało na celu usunięcie mniejszej ilości hydrofilowych zanieczyszczeń. Ze względu na dobrą rozpuszczalność wenlafaksyny w metanolu, zoptymalizowano objętość i stężenie tego rozpuszczalnika. Dlatego aby zapobiec wymywaniu analitu w drugim etapie przemywania i uzyskać wysoki odzysk procesu ekstrakcji, użyto mniejszą objętość rozpuszczalnika. Dodatkowo, aby zapewnić odpowiednie pH podczas procesu wymywania wenlafaksyny z kolumnienek zastosowano dodatek amoniaku, który

powodował częściową dysocjację wenlafaksyny, zmniejszając jej lipofilność, a tym samym umożliwiając wymycie zaadsorbowanego związku.

Każdy tok postępowania ekstrakcyjnego powtórzono sześciokrotnie dla każdego stężenia. Wyznaczono 6 krzywych kalibracyjnych w zakresie stężeń 25-750 ng/mL dla pojedynczego postępowania. Na podstawie analizy chromatograficznej badanych próbek wyznaczono średnie wysokości pików wenlafaksyny, a także zanieczyszczeń obecnych na chromatogramach jako pozostałości mimo zastosowania odpowiedniej ekstrakcji. Wyznaczono również odzysk dla każdego z badanych stężeń stosując odpowiedni tok postępowania ekstrakcyjnego. Otrzymane dane poddano wielowymiarowej analizie statystycznej z użyciem PCA (analiza głównych składowych; *principal component analysis*) i CA (analiza skupień; *cluster analysis*).

W pierwszym etapie opracowania wyników określono, które postępowanie ekstrakcyjne pozwoli na oznaczenie wenlafaksyny w całym analizowanym zakresie stężeń. Ponadto, przyjęto, iż opracowana metoda będzie przydatna do analizy ilościowej, jeżeli $R^2 > 0,99$, a odzysk znajdzie się w przedziale 80-120%.

Podsumowując otrzymane wyniki stwierdziłam, że w przypadku analizy śliny, w której oznaczałam wenlafaksynę należącą do leków przeciwdepresyjnych, charakteryzujących się wysoką lipofilnością, wskazane jest zastosowanie dwuetapowej procedury oczyszczania próbki. Jednoetapowa procedura nie pozwala na oznaczenie wenlafaksyny w najniższym stężeniu. Najbardziej optymalne okazały się kolumnienki C18 i procedura 1 oraz kolumnienki C8 i procedura 3. W obu przypadkach pozwoliły one oznaczyć wenlafaksynę ilościowo z pożądanym odzyskiem i współczynnikiem determinacji powyżej 0,99. Powyższe wyniki zostały również potwierdzone przez analizę wieloczynnikową, gdzie wszystkie procedury umożliwiające oznaczenie wenlafaksyny w całym badanym zakresie stężeń znalazły się w jednym klastrze zarówno w przypadku CA jak i PCA.

Wykorzystanie śliny do analizy związków aktywnych nie jest powszechne. W związku z tym nie ma jednolitych procedur określających w jaki sposób pobrać próbkę śliny, a gdy próbka jest analizowana chromatograficznie, jej przygotowanie wymaga odpowiedniego postępowania.

Ślina, jako łatwo dostępny materiał do badań, może stanowić dobre źródło informacji o przyjmowanych lekach przez osoby chore psychicznie. Izolacja neuroleptyków ze śliny wykonywana jest najczęściej za pomocą LLE [11-15]. Jednak ten sposób oczyszczania śliny wymaga użycia dużej objętości rozpuszczalników. Zwykle objętość rozpuszczalnika jest kilkakrotnie większa od objętości próbki. Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej pozwala uniknąć użycia lotnych i toksycznych rozpuszczalników. Także objętość użytych do ekstrakcji roztworów jest zwykle mniejsza.

Jednym z częściej stosowanych leków o działaniu antypsychotycznym jest olanzapina, którą izolowano ze śliny za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz [12,16]. Biorąc powyższe pod uwagę opracowałam szybką i dokładną metodę oceny ilościowej olanzapiny w ludzkiej

ślinie (**H5**) wykorzystując po raz pierwszy SPE i LC-MS/MS. W trakcie mojej pracy pojawił się artykuł wskazujący na możliwość użycia SPE w powyższym celu [17].

Ślinę pobierano za pomocą Salivettes. Próbkę wirowano, a następnie pobierano 500 μ L do szklanej probówki, rozcieńczano roztworem kwasu mrówkowego, mieszano i obciążano odpowiednią objętością roztworów wzorcowych olanzapiny i wzorca wewnętrznego. Po naniesieniu próbek, złoże przemywano 2% roztworem kwasu mrówkowego i metanolem. Następnie anality eluowano 5% roztworu amoniaku w metanolu. Eluent wysuszono, a pozostałość rozpuszczono w mieszaninie 0,1% kwasu mrówkowego i acetonitrylu (90:10, v/v). Tak przygotowane próbki wstrzykiwano do kolumny chromatograficznej.

Podczas opracowywania metody ekstrakcji modyfikowano kolejne etapy przygotowania próbki m.in. dobierano złoże SPE i stężenie roztworu kwasu mrówkowego użytego do przemywania złoża. Izolację olanzapiny ze śliny badano przy użyciu czterech rodzajów sorbentów (Oasis MCX, Oasis HLB, Strata X i Strata X-C). Następnie, porównano pole powierzchni pod krzywą piku olanzapiny i stwierdzono, że najlepsze rezultaty osiągnięto stosując kolumnienki typu Oasis MCX. W związku z powyższym w kolejnych etapach badań zastosowano wspomniany sorbent. Następnym krokiem było określenie wpływu stężenia roztworu kwasu mrówkowego użytego do rozcieńczania próbek śliny i przemywania złoża SPE. Pod uwagę wzięto trzy stężenia kwasu mrówkowego (0,5; 2 i 10%), z których najlepsze rezultaty otrzymano dla stężeń kwasu mrówkowego 0,5 i 2%. Użycie 10% kwasu mrówkowego skutkowało mniejszym polem powierzchni pod pikiem olanzapiny. Badając wpływ rodzaju rozpuszczalnika eluującego na wydajność procesu ekstrakcji olanzapiny i wzorca wewnętrznego użyto metody frakcjonowania. W pierwszej kolejności wymywano anality ze złoża 5% roztworem amoniaku w metanolu, a następnie mieszaniną dichlorometanu i izopropanolu (75:25, v/v), którą użyto, ponieważ właściwości mieszaniny pozwalają na wymycie bardziej lipofilnych związków niż ma to miejsce w przypadku metanolu. Analiza chromatograficzna wykazała, że anality były eluowane w pierwszej frakcji, natomiast poziom olanzapiny i wzorca wewnętrznego w drugiej frakcji był poniżej LOD i w konsekwencji nie został wykryty.

Zoptymalizowana metoda charakteryzowała się liniowością w zakresie stężeń 1–500 ng/mL, przy współczynniku korelacji $R > 0,9991$. Granicę wykrywalności dla olanzapiny ustalono na poziomie 0,3 ng/mL, podczas gdy LLOQ wyniosło 1,0 ng/mL. Opracowana metoda była selektywna, co wykazano wykorzystując dwie metody. Pierwszą analizowano próby ślepe pochodzące od kilku różnych osób, drugą poprzez obciążenie próbek śliny pochodzących od jednej osoby roztworami wzorcowymi substancji psychoaktywnych. W obu metodach nie był widoczny żaden pik interferencji w zakresie czasu retencji specyficznego dla olanzapiny i wzorca wewnętrznego. Ponadto, w ślepych próbach śliny nie wykryto znaczących zakłóceń powodowanych przez substancje endogenne. Wyznaczono również precyzję oraz dokładność metody, które mieściły się w przedziale akceptowalnych wartości.

Opracowana metoda została również wykorzystana do określenia poziomów analitu w ślinie piętnastu pacjentów, którzy byli leczeni różnymi dawkami olanzapiny. We wszystkich przypadkach olanzapina została pomyślnie wykryta. Oznaczone stężenie leku w ślinie pacjentów leczonych olanzapiną w dawkach 5–22,5 mg/dobę wyniosło od 5,1 do 27 ng/mL.

Podczas leczenia osób z zaburzeniami psychicznymi, rzadko leki podawane są w monoterapii. Wielokrotnie inne preparaty podawane są rano, inne w porze obiadu, czy przed snem, aby ułatwić zasypianie. Dlatego też jednym z ważniejszych problemów w psychiatrii jest określenie czy zastosowana politerapia przynosi odpowiednie efekty, a ryzyko pojawienia się działań niepożądanych jest zminimalizowane. Dane literaturowe wskazują na nieliczne przypadki wykorzystania SPE podczas oznaczania neuroleptyków w ślinie [7,18]. Również leki przeciwpadaczkowe rzadko izolowano ze śliny przy użyciu tego typu ekstrakcji. Wśród leków ekstrahowanych ze śliny przy użyciu SPE znalazły się fenytoina [19], kwas walproinowy [20] i leki przeciwpadaczkowe starszej generacji. Brak jest natomiast informacji na temat zastosowania SPE do izolacji karbamazepiny. Z danych literaturowych wynika również, że brak jest metody umożliwiającej równoczesną analizę neuroleptyków oraz karbamazepiny w ślinie pochodzącej od pacjentów stosujących politerapię. Jak już wspomniano, ze względu na mniejsze rozpowszechnienie śliny jako materiału diagnostycznego, brak jest procedur jej pobierania, przechowywania, czy też przygotowania do izolacji związków w niej zawartych. Analiza danych literaturowych nie pozwala jednoznacznie określić, która z procedur może być przydatna do oznaczania neuroleptyków lub leków przeciwpadaczkowych w ślinie. Brak jest również publikacji dotyczących oczyszczania nieobciążonych próbek śliny tak, aby móc porównać wpływ rodzaju rozpuszczalników użytych w poszczególnych etapach ekstrakcji na oczyszczenie materiału diagnostycznego.

Biorąc powyższe pod uwagę, w następnym etapie badań opracowałam metodę pozwalającą oczyścić ślinę z endogennych substancji tak, aby możliwe było szybkie i wiarygodne oznaczenie najczęściej stosowanych neuroleptyków (arypiprazolu, klozapiny, olanzapiny, kwetiapiny i risperidonu), karbamazepiny oraz ich metabolitów (dehydroarypiprazolu, N-demetylo klozapiny, N-demetylo olanzapiny, norkwetiapiny, 9-OH-risperidonu i epoksydu karbamazepiny) w tym materiale diagnostycznym (**H3**).

Ślinę pobierano za pomocą Salivettes lub poprzez bezpośrednie umieszczenie w plastikowej probówce, następnie wirowano i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analizy. Do badań wstępnych nad SPE wybrano trzy typy kolumnienek; złoże Strata-X, przeznaczone do jednoczesnej ekstrakcji związków o różnej polarności oraz złoże umożliwiające analizę związków będącymi słabymi zasadami - Strata-X-C i Strata-X-CW, zawierające odpowiednio złoże będące silnym lub słabym wymienniczym kationów. Wybierając te trzy rodzaje kolumnienek kierowano się danymi literaturowymi, opisującymi izolację niektórych z badanych psychotropów z krwi [7,18]. Ponadto, wzięto pod uwagę właściwości chemiczne neuroleptyków, które będą izolowane ze śliny z użyciem opracowanej metody oczyszczania próbek.

Pierwszym etapem badań była optymalizacja procedury SPE, którą przeprowadziłam w kilku krokach. W pierwszej kolejności zdecydowano, iż do rozcieńczenia próbek użyta zostanie mieszanina wody i metanolu (1:1). Kolejnym elementem optymalizacji procesu oczyszczania śliny było opracowanie procedury przemywania złoża tak, aby w jego trakcie usunąć zanieczyszczenia pochodzące z matrycy i w jak najmniejszym stopniu wymyć zaadsorbowane na złożu anality. Stworzono 4 podstawowe procedury przemywania złoża (1-4), stosując zarówno przemywanie jedno (1-3) jak i dwuetapowe (4). W procedurze 1 do przemywania złoża zastosowano wodę destylowaną, natomiast w 2 - 2% roztwór kwasu mrówkowego. W procedurze 3 złoże przemyto mieszaniną wody i metanolu. Podobnie w 4, przy czym etap ten poprzedzono przemyciem złoża za pomocą wody destylowanej. W procedurach 5-24, skład mieszaniny do rozcieńczania próbek oraz roztwory przemywające pozostały te same, jak w procedurach 1-4.

Ostatnim z etapów optymalizacji procesu ekstrakcji było określenie wpływu pH roztworu wymywającego na skuteczność procesu oczyszczania śliny ze związków endogennych. W tym celu w procedurach 1-4 zastosowano metanol, natomiast w procedurach 4-8 acetonitryl. W kolejnych procedurach zarówno do metanolu, jak i acetonitrylu dodano kwas mrówkowy tak, aby jego stężenie końcowe wyniosło 5% (procedury 9-16). Kontynuując badania, do roztworu wymywającego dodano roztwór amoniaku tak, iż jego końcowe stężenie wyniosło 5% (procedury 17-24). Każdą z 24 procedur wykonano przy użyciu trzech typów kolumnienek - Strata X, Strata X-C i Strata X-CW.

Na podstawie badań wstępnych stwierdzono, najprostsze procedury przemywania próbek (1,2), w których użyto wodę lub 2% roztwór kwasu mrówkowego nie zapewniły oczyszczenia próbek w zadowalającym stopniu niezależnie od rodzaju użytych kolumnienek. Przemycie złoża mieszaniną wody i metanolu (procedury 3 i 4) w nieznacznym stopniu zmniejszyło stopień zanieczyszczenia eluatu tak, iż intensywność pików endogennych związków zmniejszyła się, jednak nadal widoczne są na chromatogramach. Zastosowanie acetonitrylu do wymywania (procedury 5-8) przy zachowaniu tych samych procedur przemywania złoża również nie umożliwiło dokładnego oczyszczenia próbek. Pomimo, że intensywność pików odzwierciedlających obecność związków endogennych była mniejsza, to czasy ich retencji mogą maskować piki mniej lipofilnych analitów, np. olanzapiny i jej metabolitu. Przemycie kolumnienek mieszaniną wody i metanolu (procedury 7 i 8) zmniejszyło lub wyeliminowało zanieczyszczenia ujawniające się w postaci pików w początkowym odcinku chromatogramu (czas retencji ok. 4 min). Wyjątek stanowi procedura 7, z użyciem kolumnienki Strata X-CW, podczas której wspomniany pik na chromatogramie ma dużą intensywność. Zastosowanie mieszaniny wody i metanolu (procedura 7), a także dwuetapowej procedury przemywania złoża (procedura 8) nie pozwoliło również na satysfakcjonujące oczyszczenie ekstraktów. Mimo zastosowania mieszaniny rozpuszczalników o większej sile wymywania zanieczyszczeń lipofilnych, na chromatogramie nadal obserwuje się piki związków endogennych. Mogą one uniemożliwić analizę śliny pacjentów leczonych np. karbamazepiną lub arypiprazolem.

Podczas optymalizacji pH roztworu do wymywania, który używa się w ostatnim etapie SPE, zarówno metanol jak i acetonitryl modyfikowano kwasem mrówkowym (procedury 9-16) lub amoniakiem (procedury 17-24). W przypadku procedur 9-12, w których zastosowano wymywanie 5% roztworem kwasu mrówkowego w metanolu, najmniej efektywne okazały się również procedury, w których do przemywania użyto roztwory wodne. Ponownie na chromatogramach obserwowano piki związków endogennych o krótkich czasach retencji. Natomiast najlepsze rezultaty oczyszczenia próbek uzyskano, gdy do przemywania kolumnienek użyto mieszaninę metanolu i wody (procedura 11). Dodatkowo, przemycie dwuetapowe (procedura 12) i zastosowanie kolumnienek Strata X-C oraz Strata X-CW pozwoliło na satysfakcjonujące oczyszczenie ekstraktów. Podobnie w przypadku użycia 5% kwasu mrówkowego w acetonitrylu (procedury 13-16), najmniej skutecznymi metodami oczyszczania śliny okazały się te, w których do przemywania złoża zastosowano roztwory wodne, a w szczególności, gdy procedury 13 i 14 wykonano z użyciem kolumnienek Strata X lub Strata X-CW. Na chromatogramach obserwuje się piki związków endogennych w całym zakresie analizy chromatograficznej. Natomiast, najbardziej zadowalające rezultaty oczyszczenia śliny osiągnięto podczas przemywania złoża metanolem z wodą (procedura 15) lub przemycia dwuetapowego (procedura 16). Również w tym przypadku najbardziej odpowiednie okazały się kolumnienki będące wymiennicami jonowymi. Porównując chromatogramy obrazujące procedury, w których do wymywania użyto 5% roztworu kwasu mrówkowego w metanolu (procedury 11, 12) lub acetonitrylu (procedury 15, 16) można odnieść wrażenie, że użycie acetonitrylu pozwoliło lepiej oczyścić ślinę. Należy jednakże pamiętać, iż większość analitów jest lepiej rozpuszczalna w metanolu niż acetonitrylu. Biorąc pod uwagę fakt, że najbardziej skuteczna procedura ekstrakcyjna będzie wykorzystana do opracowania metody oznaczania neuroleptyków w ślinie, użycie acetonitrylu do wymywania analitów z sorbentu może obniżyć wydajność ekstrakcji, pomimo dobrego oczyszczenia próbki ze związków endogennych. Wówczas dokładność opracowanej metody będzie mniejsza.

Kolejnym etapem optymalizacji procesu ekstrakcji było zbadanie wpływu zasadowego pH roztworu wymywającego na stopień oczyszczenia eluatów. Przed ekstrakcją próbki rozcieńczono wyłącznie mieszaniną metanolu i wody (1:1). Do przemywania sorbentów zastosowano cztery pierwsze procedury (1-4), w których zastosowano kolejno - wodę, 2% roztwór kwasu mrówkowego, mieszaninę metanolu z wodą (1:1) oraz przemywanie dwuetapowe, natomiast do wymywania użyto 5% roztworu amoniaku w metanolu lub acetonitrylu (procedury 17-24). Zastosowanie do przemywania złoża roztworów wodnych nie zapewniło oczyszczenia żadnego z badanych typów sorbentów. Na wszystkich chromatogramach obserwuje się liczne piki o dużej intensywności świadczące o obecności związków endogennych. Optymalizacja pH metanolu zapewniła zadowalające efekty oczyszczenia próbki tylko w przypadku, gdy do przemywania złoża kolumnienek Strata X-C użyto mieszaniny metanolu z wodą (procedury 19 i 20). Piki o niewielkiej intensywności związane z obecnością endogennych związków występują tylko w początkowym odcinku chromatogramu. Użycie 5% roztworu amoniaku w acetonitrylu jako roztworu wymywającego (procedury 21-24), nie dało satysfakcjonujących wyników nawet wówczas, gdy do przemywania złoża użyto

mieszanie metanolu i wody. W tym przypadku zmniejszyła się intensywność pików pochodzących od endogennych związków, których czasy retencji były zbliżone do czasów retencji badanych neuroleptyków lub karbamazepiny.

Analiza chromatogramów HPLC wykazała, że najbardziej efektywne było przemywanie złożeń kolumniek w dwóch etapach, stosując mieszaninę metanolu i wody (1:1), poprzedzone przemyciem wodą. Ponadto, najmniej pików substancji endogennych obserwowano stosując kolumniki Strata X-C lub Strata X-CW, dlatego też użyto je do dalszych badań. Proces przemywania wykonano dwuetapowo, natomiast do wymywania pozostałości zaadsorbowanej na złożu użyto roztworów metanolu lub acetonitrylu, których pH zmodyfikowano za pomocą kwasu mrówkowego lub amoniaku (procedury 26-28). Dodatkowo, określono również wpływ pH roztworu użytego do rozcieńczenia próbki, poprzez dodanie 2% roztworu kwasu mrówkowego (procedury 25, 27). Analiza chromatogramów wykazała, że najbardziej efektywną procedurą oczyszczania śliny była procedura 25, w której do rozcieńczenia próbek użyto oprócz mieszaniny metanolu i wody, 2% roztwór kwasu mrówkowego. Natomiast, do wymycia zaadsorbowanej pozostałości użyto 5% roztworu amoniaku w metanolu. Ponadto, satysfakcjonujący efekt oczyszczenia próbek uzyskano również stosując procedurę 28.

Wykonane w ramach tej pracy badania jednoznacznie potwierdziły, że najbardziej efektywne oczyszczenie próbek uzyskano stosując kolumniki zawierające wymiennicze jonowe. Ten typ złożeń umożliwił również izolację wszystkich analitów z obciążonej próbki śliny. Dlatego też kolejnym etapem badań było wskazanie, która z czterech procedur (25-28) umożliwi izolację ze śliny najczęściej stosowanych neuroleptyków (arypiprazolu, kłozapiny, olanzapiny, kwetiapiny i risperidonu), leku przeciwpadaczkowego karbamazepiny i ich metabolitów (dehydroarypiprazolu, N-demetylo kłozapiny, N-demetylo olanzapiny, norkwetiapiny, 9-OH-risperidonu i epoksydu karbamazepiny). W tym celu ślinę rozcieńczono 2% roztworem kwasu mrówkowego oraz mieszaniną metanolu z wodą (1:1), obciążono mieszaniną wzorców tak, aby ich stężenia końcowe wyniosły 100 ng/mL i poddano oczyszczeniu z użyciem procedur 25-28, stosując kolumniki Strata X-C oraz Strata X-CW. Najbardziej efektywna okazała się procedura 25 i kolumniki Strata X-C, gdzie do przemywania kolumniki użyto kolejno wody i mieszaniny wody z metanolem (1:1), natomiast pozostałość zaadsorbowaną na kolumnikach wymywano 5% roztworem amoniaku w metanolu.

Analiza chromatograficzna prowadzona przy długości fali 240 nm potwierdziła fakt izolacji wszystkich badanych związków, dlatego też może być wykorzystana do dalszych prac nad opracowaniem i walidacją metody przeznaczonej do monitorowania poziomu leków neuroleptycznych oraz kontroli przyjmowania ich przez pacjentów w łatwo dostępnym materiale biologicznym jakim jest ślina.

Celem kolejnych badań było opracowanie i walidacja szybkiej, czułej i selektywnej metody pozwalającej stwierdzić obecność w ślinie pięciu neuroleptyków (kłozapiny, kwetiapiny, olanzapiny, risperidonu i arypirazolu) wraz z ich metabolitami (N-demetylo

klozapiną, norkwetiapiną, N-demetylo olanzapiną, 9-OH-risperidonem i dehydroarypiprazolem) oraz karbamazepiny i epoksydu karbamazepiny (H4). Z danych literaturowych wynika, iż do czasu opublikowania moich badań, tego typu analiza nie była możliwa.

Opracowana metoda stanowi kontynuację wcześniejszych badań obejmujących oczyszczenie śliny za pomocą ekstrakcji do fazy stałej, dlatego też pierwszym elementem optymalizacji metody pozwalającej na równoczesne oznaczenie analitów był dobór parametrów rozdziału chromatograficznego. Niektóre z badanych związków, ze względu na podobną strukturę, charakteryzują się również podobnymi właściwościami fizykochemicznymi. Uwidocznilo się to zwłaszcza w przypadku par klozapina i kwetiapina oraz ich metabolitów, N-demetylo klozapiny i norkwetiapiny. Ponadto, risperidon i epoksyd karbamazepiny posiadają również bardzo zbliżony czas retencji. Wydłużenie czasu linearnego wzrostu stężenia roztworu B (acetonitrylu) do 21 min oraz zmniejszenie przepływu fazy ruchomej do 0,6 mL/min pozwoliło na dokładne rozdzielanie wszystkich analizowanych związków. Kolejnym krokiem było wybranie odpowiedniej długości fali do obserwacji rozdziału chromatograficznego. Najbardziej optymalną długością fali dla większości badanych analitów było 240 nm, przy której analizowano pola powierzchni pików olanzapiny, risperidonu, klozapiny, kwetiapiny i karbamazepiny wraz z ich metabolitami. Natomiast arypiprazol i dehydroarypiprazol obserwowano przy długości fali 214 nm. Ze względu na detekcję UV jako wzorzec wewnętrzny zastosowano chlordiazepoksyd, benzodiazepinę od wielu lat nie stosowaną w lecznictwie, w związku z tym brak jest możliwości przypadkowej obecności tej substancji w ślinie pacjenta.

Ślinę do badań wstępnych pobierano w ten sam sposób jak w przypadku opracowywania metody jej oczyszczania (H3), a do izolacji analitów zastosowano procedurę obejmującą rozcieńczenie próbki za pomocą 2% kwasu mrówkowego i mieszaniny metanolu z wodą (1:1). Następnie próbki śliny były obciążane odpowiednią ilością roztworu roboczego analitów oraz wzorca wewnętrznego. Kolejno, próbki wytrząsano i wirowano, a supernatant nanoszono na zaktywowane kolumny Strata X-C. Złóże przemywano wodą oraz mieszaniną wody i metanolu (1:1) i suszono. Zaadsorbowane anality wymywano za pomocą 5% roztworu amoniaku w metanolu. Eluat suszono, a suchą pozostałość rozpuszczano w mieszaninie 2% kwasu mrówkowego z dodatkiem 0,1% trietyloaminy i acetonitrylu (90:10; v/v). Następnie próbki analizowano chromatograficznie. Opracowaną metodę zwalidowałam określając jej liniowość dla każdego z analitów w zakresie stężeń 10-1000 ng/mL. Otrzymane wyniki wskazują, iż metoda jest precyzyjna, co potwierdza wartość RSD poniżej 15% dla każdego z analitów, zarówno w przypadku powtarzalności jak i precyzji pośredniej. Opracowana metoda jest selektywna, co stwierdziłam badając nieobciążone próbki śliny pochodzące od 10 zdrowych ochotników. Nie wykryłam wówczas interferencji wywołanych przez związki endogenne.

Opracowana metoda ekstrakcji jest skuteczna w przypadku wszystkich badanych związków z wyjątkiem karbamazepiny i jej metabolitu, gdzie wydajność ekstrakcji

wyniosła około 50%. Oba związki wykazują wyższy stopień oddziaływania z sorbentem w środowisku bardziej zasadowym. Jednakże celem badań było opracowanie metody umożliwiającej równoczesne oznaczenie wszystkich dwunastu związków, co osiągnęłam kosztem niskiej wydajności ekstrakcji tych dwóch analitów. Określiłam również stabilność analitów zarówno w materiale biologicznym, jak i ekstraktach podczas ich przechowywania w autosamplerze. Na podstawie wyników badań stwierdziłam, iż związki przechowywane w lodówce w temperaturze 8°C były stabilne. Nie zaobserwowałam również ich rozkładu podczas przechowywania w temperaturze -20°C. Natomiast przechowywane w temperaturze 15°C w postaci ekstraktów, N-demetylo olanzapina, epoksyd karbamazepiny i olanzapina uległy nieznacznemu rozkładowi. Największe straty zaobserwowałam w przypadku N-demetylo olanzapiny, której zawartość spadła do około 77%.

W celu określenia przydatności opracowanej metody do badań klinicznych pobrano próbki śliny od 40 pacjentów obu płci (13 kobiet i 27 mężczyzn) leczonych badanymi substancjami czynnymi zarówno w mono, jak i w politerapii. Stwierdzono, iż opracowana metoda pozwoliła wykryć i oznaczyć badane związki we wszystkich analizowanych próbkach. Przeprowadzone badania wykazały, że zawartość risperidonu i jego metabolitu w ślinie pacjentów mieściła się odpowiednio w zakresie 14,43-172,11 ng/mL i 23,87-142,33 ng/mL, co jest zgodne z danymi literaturowymi [21-24]. W przypadku kłozapiny zakres stężeń leku macierzystego i metabolitu wyniósł odpowiednio 40,29-930,97 ng/mL oraz 20,94-928,36 ng/mL. Wcześniejsze doniesienia wskazywały, iż stężenia kłozapiny i jej metabolitu w ślinie były niższe i wyniosły odpowiednio 40-364 ng/mL i 40-245 ng/mL [14]. Jednak kolejne badania wykazały, iż u osób rozpoczynających terapię preparatami kłozapiny stężenie związku w ślinie było zwykle niższe i nie przekraczało 510 ng/mL. Natomiast u pacjentów leczonych dłużej niż dwa lata stężenie związku wahało się pomiędzy 550-920 ng/mL [25]. Kolejnym oznaczanym analitem był aripiprazol, którego najwyższe stężenie w ślinie pacjentów wyniosło 19,01 ng/mL, co pokrywa się z danymi literaturowymi [21]. Również poziom kwetiapiny (29,21-791,04 ng/mL) jest zgodny z danymi literaturowymi [21]. Brak jest jednak w literaturze informacji na temat stężenia norkwetiapiny w ślinie osób leczonych preparatami kwetiapiny.

Monitorowanie stężenia leków w organizmie jest niezwykle istotne w przypadku psychiatrii, kiedy stosowanie wysokich dawek jest niezbędne, aby uzyskać efekt terapeutyczny, ale równocześnie nie dopuścić do pojawienia się nasilonych działań ubocznych. Wśród leków najczęściej aplikowanych są neuroleptyki, m.in. olanzapina i kwetiapina. Obie substancje dają szybki efekt leczniczy i poprawiają stan emocjonalny pacjenta. Zarówno olanzapina, jak i kwetiapina należą do II generacji neuroleptyków, dzięki czemu ilość działań ubocznych jest mniejsza w porównaniu z preparatami poprzednich generacji. Jednak ze względu na często stosowaną politerapię oraz duże ryzyko wystąpienia działań niepożądanych podczas stosowania dawek maksymalnych, wskazane jest monitorowanie zarówno efektów ubocznych jak i stężenia leków. Terapia Monitorowana (TDM - Therapeutic Drug Monitoring) umożliwia dopasowanie dawki

leku do indywidualnych potrzeb pacjenta, unikając nasilonych działań niepożądanych lub interakcji międzylekowych. Wskazaniem do wdrożenia terapii monitorowanej leków przeciwpsychotycznych jest m.in. brak współpracy pacjenta z lekarzem prowadzącym, brak odpowiedzi klinicznej lub jeżeli jest ona niewystarczająca przy dawkach zwykle stosowanych, a także leczenie dzieci, młodzieży oraz pacjentów w podeszłym wieku [26]. Należy jednak pamiętać, że stężenie leku we krwi może się różnić nie tylko ze względu na stosowaną dawkę, ale również w zależności od płci, wieku pacjenta lub jego masy.

Dotychczas wszystkie badania zależności pomiędzy dawką, wiekiem czy płcią pacjenta a stężeniem leku prowadzone były z użyciem krwi. Pozwala to określić całkowite stężenie substancji w organizmie, zarówno frakcji wolnej jak i związanej z białkami. Wiadomym jest jednak, że tylko frakcja wolna odpowiedzialna jest za działanie związku. Ona również podlega metabolizmowi, a wahania poziomu frakcji niezwiązanej będą świadczyły o interakcji z innymi równocześnie stosowanych związkami. Dodatkowo o szybkości metabolizowania związku świadczyć będzie poziom metabolitu. Obie substancje, frakcja wolna oraz metabolit, są obecne w ślinie. Zwykle istnieje korelacja pomiędzy stężeniem leku we krwi i ślinie, np. w przypadku kwetiapiny [27]. Oznaczanie stężenia leków w ślinie jest bardzo pomocne w przypadku dzieci. W tej grupie wiekowej podczas stosowania kwetiapiny i olanzapiny najczęściej dochodzi do nieodpowiedniego dawkowania leków i zbyt wysokiego stężenia olanzapiny lub zbyt niskiego stężenia kwetiapiny w organizmie [28]. Może to być przyczyną nasilonych działań niepożądanych lub braku odpowiedzi organizmu na zastosowaną terapię.

Biorąc powyższe pod uwagę, kolejnym etapem badań było określenie zależności pomiędzy stężeniem leku w ślinie a stosowaną dawką, wiekiem i płcią pacjentów (H6).

Stężenie kwetiapiny, olanzapiny oraz ich metabolitów w ślinie oznaczono za pomocą UHPLC z detekcją DAD po wcześniejszej izolacji związków z użyciem ekstrakcji do fazy stałej (H3, H4). Badaniem objęto 21 (F-kobiet), pacjentek Szpitala dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Starogardzie Gdańskim oraz 36 (M-mężczyzn i F-kobiet), mieszkańców Domu Pomocy Społecznej w Damasce (woj. pomorskie). Pomiar stężenia analitów obejmował dwie grupy badanych. Do pierwszej należały osoby długotrwale leczone preparatami kwetiapiny lub olanzapiny, do drugiej osoby rozpoczynające terapię. Badania zaplanowałam tak, aby u osób długotrwale leczonych określić stężenie analitów 15 minut przed podaniem leku oraz 2 h po jego aplikacji. W obu przypadkach ślinę pobierano przez 14 dni. Miało to na celu określenie, jak duże będą wahania stężenia substancji czynnej pomiędzy jej aplikacjami oraz czy te różnice będą znaczące statystycznie.

Natomiast u osób, które rozpoczynały terapię stężenie analitów oznaczałam tylko 2 h po podaniu leku, codziennie, również przez okres 14 dni. Miało to na celu określenie, czy u osób rozpoczynających terapię stężenie analitów zmienia się czy stabilizuje przez kilka dni i osiąga wartość, która utrzymuje się przez dłuższy czas. Określiłam również czy będą występowały różnice w stężeniach analitów pomiędzy osobami rozpoczynającymi

terapię oraz stosującymi preparaty przez dłuższy czas. Oprócz określenia stężenia kwetiapiny, olanzapiny i ich metabolitów zgromadziłam również informacje na temat stosowanej dawki leku, wieku pacjentów i ich płci.

W sumie zbadano 798 próbek śliny pochodzących od 57 osób (24 F i 33 M) w celu określenia stężenia olanzapiny i jej metabolitu (12 F i 20 M) oraz kwetiapiny i jej metabolitu (12 F i 13 M). Badania wykazały, że u osób rozpoczynających leczenie (średni wiek \pm SD wynosił 52 \pm 11 lat), średnie stężenie olanzapiny i jej metabolitu N-demetylo olanzapiny (średnia \pm SD) wynosiły odpowiednio 32,3 \pm 11,7 i 6,7 \pm 3,7 ng/ml. U pacjentów regularnie leczonych olanzapiną (średni wiek \pm SD wynosił 54 \pm 11 lat), średnie stężenie analitów w próbkach śliny pobranych 15 minut przed podaniem leku wynosiło 57,9 \pm 40,3 ng/ml (olanzapina) i 20,3 \pm 11,8 ng/ml (N-demetylo olanzapina) oraz 2 godziny po podaniu odpowiednio poziomy wynosiły 112,9 \pm 98,3 i 23,1 \pm 16,1 ng/ml.

Wykazałam, że istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy średnim stężeniem olanzapiny oznaczonym w próbkach śliny pobranych przed i po podaniu leku ($p < 0,05$, test Wilcoxon). Takiej zależności nie stwierdzono w przypadku metabolitu N-demetylo olanzapiny. Porównując średnie stężenie olanzapiny w próbkach śliny pobranej po aplikacji leku od pacjentów rozpoczynających terapię oraz ją kontynuujących, także tutaj zaobserwowano różnice istotnie statystycznie (Mann-Whitney U-test). Różnice istotnie statystycznie stwierdzono również pomiędzy stężeniem olanzapiny w ślinie pacjentów rozpoczynających terapię a jej stężeniem w ślinie osób stale leczonych, pobranej przed aplikacją leku. Podobną zależność stwierdzono oznaczając aktywny metabolit, N-demetylo olanzapinę ($p < 0,05$). Uwzględniając zastosowaną dawkę leku potwierdzono znaczące statystycznie różnice stężeń obu analitów w przypadku osób rozpoczynających terapię oraz ją kontynuujących. Ponadto, średnie stężenie olanzapiny u kobiet było istotnie statystycznie niższe niż u mężczyzn i wyniosło odpowiednio 33,4 \pm 11,7 oraz 86,1 \pm 63,6 ng/mL. Zastosowanie wartości skorygowanych o dawkę potwierdziło statystycznie istotną różnicę między płciami.

W przypadku kwetiapiny i norkwetiapiny średnie stężenia u pacjentów rozpoczynających leczenie (średni wiek \pm SD wynosił 49 \pm 7 lat) wyniosły odpowiednio 51,8 \pm 61,3 ng/mL i 25,2 \pm 15,8 ng/mL. Natomiast u osób leczonych stale (średni wiek \pm SD wynosił 49 \pm 11 lat), średnie stężenie analitów w próbkach pobranych 15 minut przed aplikacją leku wyniosło w przypadku kwetiapiny 110,4 \pm 126,9 ng/mL i norkwetiapiny 54,3 \pm 48,3 ng/mL. Analiza próbek śliny otrzymanych 2 h po podaniu leku wskazywała, że średnie stężenie kwetiapiny i jej metabolitu wyniosło odpowiednio 115,1 \pm 137,8 i 57,6 \pm 76,9 ng/mL.

Analiza statystyczna nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy średnim stężeniem kwetiapiny i jej metabolitu w próbkach śliny otrzymanych przed i po podaniu leku ($p < 0,05$, test Wilcoxon). Porównując średnie stężenie kwetiapiny w próbkach śliny pacjentów rozpoczynających terapię oraz ją kontynuujących zaobserwowano różnicę istotną statystycznie tylko w przypadku próbek pobranych po aplikacji leku. W przypadku metabolitu kwetiapiny nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie ($p < 0,05$). Analizując średnie stężenie leku oraz jego metabolitu w zależności od płci

pacjentów, wykazano, że niższe stężenie występuje u kobiet niż u mężczyzn i wyniosło odpowiednio $50,6 \pm 55,7$ i $123,2 \pm 105,1$ ng/mL. W przypadku norkwetiapiny, której średnie stężenie oznaczone u kobiet wyniosło $24,0 \pm 14,6$ ng/mL, a u mężczyzn $61,8 \pm 58,9$ ng/mL, nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie zarówno w przypadku kwetiapiny jak i jej metabolitu. Zaobserwowano również, iż stężenie kwetiapiny i norkwetiapiny jest statystycznie wyższe u osób po 40. r.ż. niż u osób młodszych.

Ślina jako materiał diagnostyczny może służyć z jednej strony jako wskaźnik zdrowia psychicznego, z drugiej oznaczenie w niej leków i metabolitów pozwala na monitorowanie ich stężeń, a co za tym idzie, indywidualizację terapii. Dotychczasowe badania nad zależnością stężenia olanzapiny lub kwetiapiny od dawki, płci lub wieku pacjentów były prowadzone tylko przy użyciu krwi. Jednak biorąc pod uwagę związane z tym niedogodności wskazane jest poszukiwanie alternatywnych materiałów biologicznych. Badając zależność między płcią, wiekiem pacjenta, dawką leku i czasem pobrania próbki, a stężeniem olanzapiny, kwetiapiny i ich głównych metabolitów w ślinie wykazałam, że olanzapina i kwetiapina odznaczały się niższym stężeniem w ślinie kobiet. W przypadku olanzapiny wiek pacjentów nie miał wpływu na poziom związku macierzystego ani jego metabolitu w ślinie. Doniesienia literaturowe wskazują na dużą indywidualną zmienność stężeń olanzapiny we krwi [29-31]. Również moje badania wskazały na niewielką korelację między dawką a stężeniem tego analitu w ślinie, co można wytłumaczyć właśnie dużą zmiennością indywidualną. Jednocześnie jednak zaobserwowano wysoką korelację między stężeniem związku macierzystego i jego metabolitu. Najsilniejsza korelacja obejmowała pacjentów rozpoczynających leczenie. Oznacza to, że jednoczesne oznaczanie olanzapiny i N-demetylo olanzapiny może być użyte do monitorowania metabolizmu związku macierzystego w tej grupie pacjentów. Analiza poziomów olanzapiny i metabolitu u danego pacjenta w kolejnych dniach (grupie rozpoczynającej leczenie) również wykazała istotną korelację między analitami.

Dotychczasowe badania krwi wskazują, że poziom kwetiapiny słabo koreluje z dawką leku [32-34], chociaż korelacja rang Spearmana w moich badaniach wykazała silną dodatnią korelację między dawką a stężeniem kwetiapiny i jej metabolitu w ślinie. Ta silna korelacja może wskazać na potencjalną korzyść z monitorowania poziomu kwetiapiny w ślinie. Dodatkowo, dane literaturowe wskazują na korelację stężenia kwetiapiny w ślinie i krwi, co potwierdza, że ślina może być wykorzystana do monitorowania poziomów kwetiapiny i jej metabolizmu [28,35].

Leki psychotropowe bardzo często stosowane są w dawkach maksymalnych lub nawet wyższych, tak aby jak najszybciej osiągnąć poprawę stanów zdrowia pacjenta. Powoduje to często pojawiające się, choć przemijające działania niepożądane. Stosując najwyższe dopuszczalne dawki lekarz nie dobiera je pod względem wagi pacjenta dorosłego. Może jedynie kierować się tym kryterium w przypadku dzieci. Nie ma on jednak możliwości uwzględniania cech osobniczych pacjenta, które będą wpływać na chociażby szybkość metabolizowania związku. Ponadto, w przypadku osób z zaburzeniami psychicznymi obserwuje się często samoleczenie polegające, np. na zmianie dawkowania przez pacjenta. Często również dochodzi do odstawienia leków ze względu na subiektywną

poprawę stanu zdrowia pacjenta. Zastosowanie śliny do szybkiej analizy zawartego w niej leku oraz jego metabolitu pozwala sprawdzić czy pacjent przyjmuje przepisane leki, a także określić metabolizm związku, co ułatwia indywidualizację dawkowania.

Ślina jako materiał diagnostyczny, choć nie jest tak często wykorzystywana jak krew, zyskuje coraz większe uznanie. Ze względu na swój odmienny od krwi skład, przed przystąpieniem do analizy zawartych w niej związków niezbędny jest proces oczyszczenia. Dotychczas najczęściej stosowano ekstrakcję ciecz-ciecz, która dobrze oczyszczała ślinę, ale z uwagi na niską selektywność i konieczność użycia znacznych objętości toksycznych rozpuszczalników nie jest pożądaną procedurą. Dlatego też wskazane jest opracowanie nowych metod izolacji związków ze śliny wykorzystując inne sposoby ekstrakcji, np. SPE.

Moje badania wskazują, iż ślina z powodzeniem może być zastosowana jako materiał diagnostyczny do oznaczania związków zarówno przeciwdepresyjnych jak i antypsychotycznych. Ponadto, zastosowanie odpowiedniej procedury oczyszczania śliny przy pomocy SPE umożliwiło w każdym przypadku izolację wszystkich analitów, a użyteczność opracowanych procedur została potwierdzona poprzez zastosowanie ich do analizy próbek śliny pochodzących od pacjentów.

Literatura

- [1] Elmongy H., Abdel-Rehim M. Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis: A review. *Trac-Trends Anal. Chem.* 2016, 83, 70–79.
- [2] Chiappin S., Antonelli G., Gatti R., De Palo E.F. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, 2007, 383, 30-40.
- [3] Schipper R.G., Silletti E., Vingerhoeds M.H. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*, 2007, 52, 1114-1135.
- [4] Castagnola M., Picciotti P.M., Messana I., Fanali C., Fiorita A., Cabras T., Calo L., Pisano E., Passali G.C., Iavarone F., Paludetti G., Scarano E. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 2011, 31, 347-357.
- [5] Michalke B., Rossbach B., Göen T., Schäferhenrich A., Scherer G. Saliva as a matrix for human biomonitoring in occupational and environmental medicine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2015, 88, 1–44.
- [6] de Castro A., Concheiro M., Quintela O., Cruz A., López-Rivadulla M. LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, 48, 183-193.
- [7] Petruczynik A., Wróblewski K., Szultka-Młyńska M., Buszewski B., Karakuła-Juchnowicz H., Gajewski J., Moryłowska-Topolska J., Waksmundzka-Hajnos M.

Determination of some psychotropic drugs in serum and saliva samples by HPLCDAD and HPLC MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, 127, 68-80.

[8] Das R., Agrawal Y.K. Simultaneous monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors in human urine, plasma and oral fluid by reverse-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 2013, 51, 146-154.

[9] Dziurkowska E., Wesolowski M. Simultaneous quantitation of venlafaxine and its main metabolite, O-desmethylvenlafaxine, in human saliva by HPLC. *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 1726–1733.

[10] Dziurkowska E., Wesolowski M. Determination of venlafaxine in human saliva by HPLC using solid-phase extraction. *Curr. Pharm. Anal.* 2013, 9, 165–171.

[11] Patteet L., Maudens K.E., Sabbe B., Morrens M., De Doncker M., Neels H. High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 2014, 429, 51–58.

[12] Fisher D.S., Partridge S.J., Handley S.A., Couchman L., Morgan P.E., Flanagan R.J. LC–MS/MS of some atypical antipsychotics in human plasma, serum, oral fluid and haemolysed whole blood. *Forensic Sci. Int.* 2013, 229, 145–150.

[13] Fisher D.S., Partridge S.J., Handley S.A., Flanagan R.J. Stability of some atypical antipsychotics in human plasma, haemolysed whole blood, oral fluid serum and calf serum. *Forensic Sci. Int.* 2013, 229, 151–156.

[14] Dumortier G., Lochu A., Zerrouk A., Nieuwenhuysse V.V., de Melo P.C., Rabreau D.R., Degrasat K. Whole saliva and plasma levels of clozapine and desmethylclozapine. *J. Clin. Pharm. Ther.* 1998, 23, 35–40.

[15] Jain T., Bhandari A., Ram V., Sharma S., Parakh M., Parakh M.C. Correlation of haloperidol levels between saliva and plasma of acutely ill schizophrenic patients. *Clin. Biochem.* 2011, 44, 675–680.

[16] Patteet L., Maudens K.E., Morrens M., Sabbe B., Dom G., Neels H. Determination of common antipsychotics in Quantisal-collected oral fluid by UHPLC-MS/MS: Method validation and applicability for therapeutic drug monitoring, *Ther. Drug Monit.* 2016, 38, 87–97.

[17] Rosado T., Oppolzer D., Cruz B., Barroso M., Varela S., Oliveira V., Leitão C., Gallardo E. Development and validation of a gas chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous quantitation of several antipsychotics in human plasma and oral fluid. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2018, 32, 2081–2095.

[18] Aman M.G., Vinks A.A., Remmerie B., Mannaert E., Ramadan Y., Mastj J., Lindsay R.L., Malone K. Plasma pharmacokinetic characteristics of risperidone and their

- relationship to saliva concentrations in children with psychiatric or neurodevelopmental disorders. *Clin. Ther.* 2007, 29, 1476–1486.
- [19] Hösli R., Tobler A., König S., Mühlebach S. A quantitative phenytoin GC–MS method and its validation for samples from human *ex situ* brain microdialysis, blood and saliva using solid-phase extraction. *J. Anal. Toxicol.* 2013, 37, 102–109.
- [20] Tonic-Ribarska J., Haxiu A., Sterjev Z., Kiteva G., Suturkova L., Trajkovic-Jolevska S. Development and validation of a bioanalytical LC-UV method with solid-phase extraction for determination of valproic acid in saliva. *Acta Pharm.* 2012, 62, 211–220.
- [21] Fisher D.S., van Schalkwyk G.I., Seedat S., Curran S.R., Flanagan R.J. Plasma, oral fluid, and whole-blood distribution of antipsychotics and metabolites in clinical samples. *Ther. Drug Monit.* 2013, 35, 345–351.
- [22] Flarakos J., Luo W., Aman M., Svinarov D., Gerber N., Vouros P. Quantification of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma and saliva from adult and pediatric patients by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2004, 1026, 175–183.
- [23] Saracino M.A., de Palma A., Boncompagni G., Raggi M.A. Analysis of risperidone and its metabolite in plasma and saliva by LC with coulometric detection and a novel MEPS procedure. *Talanta* 2010, 81, 1547–1553.
- [24] Mandrioli R., Mercolini L., Lateana D., Boncompagni G., Raggi M.A. Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV. *J. Chromatogr. B* 2011, 879, 167–173.
- [25] Yu D. The correlation between clozapine saliva level and clinical response as well as side effect in patient with schizophrenia. *Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi.* 1992, 25, 191–192.
- [26] Urban A.E., Cubala W.J. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotics. *Psychiatr. Pol.* 2017, 51, 1059–1077.
- [27] Langman L.J. The use of oral fluid for therapeutic drug management clinical and forensic toxicology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007, 1098, 145–166.
- [28] Neumann J., Beck O., Dahmen N., Böttcher M. Potential of oral fluid as a clinical specimen for compliance monitoring of psychopharmacotherapy. *Ther. Drug Monit.* 2018, 40, 245–251.
- [29] Gex-Fabry M., Balant-Gorgia A.E., Balant L.P. Therapeutic drug monitoring of olanzapine: The combined effect of age, gender, smoking, and comedication. *Ther. Drug Monit.* 2003, 25, 46–53.

- [30] Jönsson A.K., Spigset O., Reis M. A compilation of serum concentrations of 12 antipsychotic drugs in a therapeutic drug monitoring setting. *Ther. Drug Monit.* 2019, 41, 348–356.
- [31] Bachmann C.J., Haberhausen M., Heinzl-Gutenbrunner M., Remschmidt H., Theisen F.M. Large intraindividual variability of olanzapine serum concentrations in adolescent patients. *Ther. Drug Monit.* 2008, 30, 108–112.
- [32] Handley S.A., Bowskill S.V.J., Patel M.X., Flanagan R.J. Plasma quetiapine in relation to prescribed dose and other factors: Data from a therapeutic drug monitoring service, 2000–2011. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 2013, 3, 129–137.
- [33] Gerlach M., Hünnerkopf R., Rothenhöfer S., Libal G., Burger R., Clement H.W., Fegert J.M., Wewetzer C., Mehler-Wex C. Therapeutic drug monitoring of quetiapine in adolescents with psychotic disorders. *Pharmacopsychiatry* 2007, 40, 72–76.
- [34] Albantakis L., Egberts K., Burger R., Kulpok C., Mehler-Wex C., Taurines R., Unterecker S., Wewetzer C., Romanos M., Gerlach M. Relationship between daily dose, serum concentration, and clinical response to quetiapine in children and adolescents with psychotic and mood disorders. *Pharmacopsychiatry* 2017, 50, 248–255.
- [35] Ebert K., Maurice E., Lukačcin R., Fleischhaker C., Schulz E., Ebert D., Clement H.W. Serum and saliva concentrations of venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine, quetiapine, and citalopram in psychiatric patients. *Ther. Drug Monit.* 2018, 40, 351–355.
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze
- 5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Od początku pracy na Uczelni (w Akademii Medycznej w Gdańsku, obecnie Gdańskim Uniwersytecie Medycznym) moje zainteresowania naukowe oscylowały wokół możliwości wykorzystania śliny jako łatwo dostępnego materiału biologicznego w diagnostyce. W początkowym okresie działalności naukowej zajmowałam się oznaczaniem kortyzolu w ślinie z użyciem HPLC. W tym celu opracowałam dwie metody ekstrakcji wykorzystując zarówno SPE jak i LLE. Obie metody pozwalały na skuteczną izolację kortyzolu ze śliny, jednak ekstrakcja przy pomocy dichlorometanu umożliwiła skuteczniejsze oczyszczenie próbki, dlatego też wykorzystywałam ją do analizy śliny pochodzącej od kobiet chorych na depresję. Badania te miały na celu określenie, jak stosowane leki przeciwdepresyjne wpłyną na poziom tego hormonu. Badaniami objęto pacjentki hospitalizowane z powodu depresji w Szpitalu dla Nerwowo i Psychiczenie Chorych w Starogardzie Gdańskim w latach 2008 - 2010. Analizie poddano 2653 próbki śliny pochodzących od 97 pacjentek. Wśród stosowanych leków znalazły się preparaty podawane zarówno w mono- jak i politerapii, należące do grupy TLPD (amitryptylina,

klomipramina, doksepina i opipramol), a także SSRI (sertralina, citalopram, escitalopram, fluoksetyna, fluwoksamina, paroksetyna), jak również wenlafaksyna, mianseryna oraz mirtazapina. Kortyzol oznaczałam też w ślinie probantek leczonych terapią skojarzoną oraz innymi preparatami psychotropowymi, takimi jak promazyna czy olanzapina. Zaobserwowałam, iż w przypadku pacjentek, których odpowiedź organizmu na zastosowane leczenie była dobra, następowało szybkie obniżanie poziomu wydzielanego kortyzolu, a czas hospitalizacji probantki rzadko przekraczał wówczas 14 dni. Istotnym wydaje się fakt, iż taka sytuacja miała miejsce niezależnie od zastosowanej terapii. W pozostałych przypadkach, kiedy zmiany poziomu kortyzolu ulegały wahaniom w trakcie terapii, profile hormonu różniły się od siebie w zależności od zastosowanego leku i jego mechanizmu działania a w szczególności od wpływu substancji na receptory serotoninowe. Na podstawie przeprowadzonych badań zauważono, że inne leki psychotropowe stosowane w terapii depresji, wykazują podobny wpływ na obniżenie wydzielania kortyzolu, a pacjentki je stosujące charakteryzowały się zbliżonym profilem poziomu hormonu, jaki obserwowano w przypadku probantek leczonych lekami przeciwdepresyjnymi. Otrzymane wyniki poddałam analizie statystycznej, obejmującej analizę skupień (CA) i analizę głównych składowych (PCA). Wyniki przeprowadzonych badań, a także dyskusję oraz wnioski opublikowałam w formie rozprawy doktorskiej (Załącznik 2) oraz publikacji, które ukazały się przed obroną rozprawy, a także po niej (Załącznik 5; punkty 4.5, 4.7, 4.8, 4.14, 4.15). Ponadto, wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowałam również na konferencjach (Załącznik 5; punkty 7.26, 7.27, 7.29). Rozprawa doktorska została doceniona i uhonorowana nagrodami Prezydenta Miasta Gdańska i Gdańskiego Towarzystwa Naukowego oraz Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

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

Po uzyskaniu stopnia doktora moje zainteresowania naukowe nadal skupiały się na zastosowaniu śliny w diagnostyce, jednak rozszerzyłam je o zastosowanie śliny do analizy stężenia ksenobiotyków, a w szczególności leków psychotropowych. W ramach badań opracowałam metody oznaczania leków przeciwdepresyjnych m.in. wenlafaksyny oraz citalopramu. Dodatkowo, oba te związki analizowałam w ślinie pochodzącej od pacjentów Szpitala dla Nerwowo i Psychiczenie Chorych w Starogardzie Gdańskim. Do izolacji związków używałam zarówno SPE jak i LLE. Wyniki badań zaprezentowałam w formie publikacji (Załącznik 5, punkty 4.3, 4.9, 4.10) oraz na konferencjach zarówno krajowych jak i zagranicznych. Część opublikowanych badań włączyłam do cyklu publikacyjnego stanowiącego osiągnięcie naukowe (H1-H2).

Ponadto kontynuując pracę nad oznaczaniem kortyzolu w ślinie nawiązałam współpracę z Uniwersytetem Jagiellońskim, w ramach której oznaczałam kortyzol w ślinie osób leczonych protetycznie. Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie publikacji

(Załącznik 5, punkt 4.6) oraz wystąpień na konferencjach naukowych (Załącznik 5, punkt 7.24).

Zainteresowałam się również lekami przeciwpsychotycznymi. W ramach dotacji przyznanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego – KNOW; nawiązałam współpracę z ośrodkiem w Santiago de Compostela (Catedrático de Toxicología Servicio de Toxicología Forense, Instituto Universitario de Ciencias Forenses Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela), w którym odbyłam trzymiesięczny staż naukowy, podczas którego opracowałam metodę izolacji olanzapiny ze śliny, a następnie lek oznaczyłam u pacjentów. Wyniki badań opublikowałam, a publikację włączyłam do cyklu prac składających się na osiągnięcie naukowe (H5)

Na badania uzyskałam dotację z Narodowego Centrum Nauki (NCN) – Miniatura 1. Pozwoliła ona na opracowanie metody oczyszczania śliny oraz równoczesnego oznaczania w niej pięciu leków przeciwpsychotycznych (klozapiny, kwetiapiny, olanzapiny, risperidonu i aripiprazolu) wraz z ich metabolitami (N-demetylo klozapiną, norkwetiapiną, N-demetylo olanzapiną, 9-OH-risperidonem i dehydroarypiprozolem) oraz karbamazepiny i epoksydu karbamazepiny. Badania te opublikowałam i weszły one w cykl prac składających się na osiągnięcie naukowe (H3, H4). Opracowana metoda została również wykorzystana do oznaczenia olanzapiny i kwetiapiny wraz z metabolitami u osób leczonych wspomnianymi lekami (H6). Wyniki badań zaprezentowałam również na konferencjach krajowych i międzynarodowych (Załącznik 5, punkty 7.1-7.23).

Kolejnym etapem badań było opracowanie sposobu izolacji karbamazepiny oraz jej metabolitu, epoksydu karbamazepiny, z wykorzystaniem deproteinizacji jako metody oczyszczania śliny. Metoda została również wykorzystana do badania śliny pacjentów leczonych wspomnianym lekiem przeciwpadaczkowym. Wyniki badań opublikowałam w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (Załącznik 5, punkt 4.1).

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

6.1. Działalność dydaktyczna

W latach 2003-2009, pracując w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej AMG prowadziłam zajęcia z analizy leków, ze studentami III roku kierunku Farmacja (Załącznik 5; punkty II.1.1). Uczestniczyłam w opracowaniu skryptu dla studentów obejmującego zagadnienia dotyczące metod analizy ilościowej środków leczniczych. Za jego opracowanie otrzymałam dydaktyczną nagrodę Rektora za rok 2008.

W roku 2009 rozpoczęłam pracę w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej. Uczestniczę w realizacji zajęć dydaktycznych obejmujących ćwiczenia, seminaria oraz wykłady. Na kierunku Farmacja i Analityka Medyczna prowadzę zajęcia laboratoryjne z analizy miareczkowej (I rok Analityki, II rok Farmacji) oraz analizy instrumentalnej (II

rok). W ramach zajęć fakultatywnych prowadzę fakultet dla kierunku Farmacja Przemysłowa na temat analizy leków (IV rok). Ponadto, dla kierunku Farmacja i Analityka Medyczna opracowałam fakultet pt. „Co nam zdradzi ślina”, w którym po krótkiej charakterystyce śliny omawiam możliwości jej zastosowania w diagnostyce. Od 2019 prowadzę zajęcia z analizy miareczkowej w języku angielskim na kierunku Farmacja – English Division. Wśród prowadzonych przeze mnie zajęć były również seminaria z obliczeń chemicznych dla II roku kierunku Farmacja. Poza ćwiczeniami prowadzę również wykłady na temat metod rozdzielczych – chromatografii gazowej oraz cieczowej, ich podstaw i możliwości zastosowania. Wykłady te prowadzę w ramach przedmiotu Chemia analityczna dla II roku kierunku Farmacja oraz Analiza instrumentalna dla II roku Analityki Medycznej.

Ponadto, byłam opiekunem 12 prac magisterskich. Od roku 2012 pełnię funkcję zastępcy opiekuna I roku studiów na kierunku Analityka Medyczna.

6.2. Działalność organizacyjna

W roku 2011 była członkiem komitetu organizacyjnego II Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowego nt. „Ocena jakości preparatów farmaceutycznych z uwzględnieniem metod badania w fazie stałej”, które odbyły się w dniach 15-16 września na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

6.3. Popularyzacja nauki

W roku 2008 w ramach szkoleń ciągłych i specjalizacyjnych realizowanych na Wydziale Farmaceutycznym AMG prowadziłam wykład pt. „Współczesne wyzwania w leczeniu depresji”.

Prowadziłam również wykład w ramach Podlaskich Warsztatów Psychiatrycznych w Białowieży na temat zastosowania śliny w diagnostyce i możliwości jej użycia do monitorowania poziomu leków psychotropowych w organizmie (16-18 stycznia 2020 r.)

Niektóre z moich publikacji mają charakter przeglądowy i zostały opublikowane czasopismach ogólnodostępnych dla lekarzy i farmaceutów (Psychiatria Polska, Farmacja Polska; Załącznik 5; punkty II.4.2., 4.4, 4.11- 4.13, 4.16-4.18).

Ponadto, uczestniczyłam w sposób czynny w licznych konferencjach krajowych oraz międzynarodowych prezentując wyniki swoich badań w formie posterów oraz wystąpień ustnych (konferencje krajowe - Załącznik 5; punkty II 7.2-7.13, 7.15-17.8, 7.20-7.23, 7.25-7.27, 7.33-7.36; międzynarodowe - Załącznik 5; punkty II 7.1, 7.14, 7.19, 7.28-7.32)

6.4. Współpraca międzynarodowa

W roku 2016 nawiązałam współpracę w ośrodkiem w Santiago de Compostela (Catedrático de Toxicología Servicio de Toxicología Forense, Instituto Universitario de Ciencias Forenses Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela), specjalizującym się w oznaczaniu związków psychotropowych w ślinie, krwi, włosach i paznokciach.

Ponadto, recenzowałam ponad 30 publikacji naukowych dla wydawnictw:

- Springer (Chemical Papers)
- MDPI (Diagnostics, Journal of Clinical Medicine, International Journal of Environmental Research and Public Health, Processes, Applied Sciences, Antibiotics, Journal of Personalized Medicine, Scientia Pharmaceutica, Biomedicines, Separations, Antioxidants, Medicina, ChemEngineering, Molecules)
- Taylor&Francis Group (Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies)

6.5. Nagrody i wyróżnienia

Nagroda Prezydenta Miasta Gdańska i Gdańskiego Towarzystwa Naukowego w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych (2011) za rozprawę doktorską

Nagroda Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zespołowa II stopnia za osiągnięcia dydaktyczne za rok 2008

Nagroda Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za osiągnięcia naukowe w latach:

- 2011 – wyróżniona praca doktorska;
- 2013 - zespołowa I stopnia za osiągnięcia naukowe;
- 2018 - zespołowa II stopnia za osiągnięcia naukowe;
- 2019 – zespołowa I stopnia za osiągnięcia naukowe

6.6. Działalność w towarzystwach naukowych

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (od 2004) oraz Gdańskiego Towarzystwa Naukowego (od 2012)

7. Inne informacje

Od roku 2011 jestem specjalistą II stopnia w dziedzinie analityki farmaceutycznej.

Ewelina Dziurkowska

(podpis wnioskodawcy)