



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

WYDZIAŁ CHEMII

KATEDRA CHEMII ŚRODOWISKA I BIOANALITYKI

TECHNIKI ŁĄCZONE W BADANIU PRODUKTÓW METABOLICZNEJ
BIOTRANSFORMACJI LEKÓW DLA CELOWANEJ TERAPII FARMAKOLOGICZNEJ

Autoreferat

Dr Małgorzata Szultka-Młyńska

Obszar nauk ścisłych

Dziedzina: nauk chemicznych

Dyscyplina naukowa: chemia

Toruń, 2018

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

1. Imię i nazwisko

Małgorzata Szultka-Młyńska (z d. Szultka)

2. Posiadane dyplomy i stopnia naukowe

2009–2014 - Studia doktoranckie w zakresie z chemii w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky na Wydziale Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł rozprawy doktorskiej: „*Badanie produktów metabolizmu leków nowej generacji za pomocą mikroekstrakcyjnych technik przygotowania próbek w połączeniu z LC-MSⁿ*”, praca obroniona 17.XII.2014 r., promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski;

2007–2009 - Studia stacjonarne II stopnia (magisterium) w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky na Wydziale Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł pracy: „*Zminiaturyzowane układy sorpcyjne w analizie związków biologicznie aktywnych*”, praca obroniona z wyróżnieniem 8.VI.2009 r., promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski;

2004–2007 - Studia stacjonarne I stopnia (licencjat) w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky na Wydziale Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł pracy: „*Techniki elektromigracyjne w oznaczaniu mikroorganizmów - pomiary potencjału zeta dla żywych komórek bakteryjnych oraz stosowanych faz stacjonarnych*”, praca obroniona 12.VII.2007 r, promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1.02.2018 – obecnie	asystent, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii UMK w Toruniu
1.03.2016 – 31.01.2018	specjalista naukowo-techniczny, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii UMK w Toruniu
1.03.2016 – 31.01.2018	adiunkt naukowy, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii UMK
1.04.2015 – 29.02.2016	specjalista inżynieryjno-techniczny, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii UMK w Toruniu

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

(a) tytuł osiągnięcia naukowego:

monotematyczny cykl publikacji zatytułowany:

„Techniki łączone w badaniu produktów metabolicznej biotransformacji leków dla celowanej terapii farmakologicznej”

(b) wykaz powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

Publikacje [H1-H9] wchodzące w skład jednotematycznego cyklu prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego pochodzą z czasopism znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR). Publikacja [H10] pochodzi z czasopisma nie znajdującego się na liście JCR. Jestem autorem do korespondencji w przypadku 6 publikacji [H1-H4, H7, H9]. W publikacjach H1-H10 mój wkład w autorstwo wynosił od 15% do 80%. W przypadku publikacji H1-H9 podałam Impact Factor (IF) odnoszący się do roku wydania publikacji, 5-letni IF, punktację MNiSW odnoszącą się do roku wydania publikacji, a także liczbę cytowań Web of Science i Scopus na dzień 5.11.2018. W przypadku publikacji H10 IF oraz 5-letni IF pochodzi z bazy Google Scholar.

[H1] Małgorzata Szultka-Młyńska*, Paweł Pomastowski, Bogusław Buszewski, Application of solid phase microextraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry in the determination of antibiotic drugs and their metabolites in human whole blood and tissue samples, J. Chromatogr. B 1086 (2018) 153-165.

IF=2,441; IF_{5-letni}=2,526; MNiSW=30 pkt.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus=1/1

Wkład w autorstwo 75%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

[H2] Małgorzata Szultka-Młyńska*, Sylwia Bajkacz, Irena Baranowska, Bogusław Buszewski, Structural characterization of electrochemically and in vivo generated potential metabolites of selected cardiovascular drugs by EC-UHPLC/ESI-MS using an experimental design approach, Talanta 176 (2018) 262-276.

IF=4,244; IF_{5-letni}=3,937; MNiSW=40 pkt.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus=0/0

Wkład w autorstwo 60%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu analiz, wykonaniu analiz na próbkach rzeczywistych, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

[H3] Małgorzata Szultka-Młyńska*, Sylwia Bajkacz, Magdalena Kaca, Irena Baranowska, Bogusław Buszewski, Electrochemical simulation of three novel cardiovascular drugs phase I metabolism and development of a new method for determination of them by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B., 1093-1094 (2018) 100-112.

IF=2,441; IF_{5-letni}=2,526; MNiSW=30 pkt.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus=0/0

Wkład w autorstwo 55%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu analiz, wykonaniu analiz na próbkach rzeczywistych, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

[H4] Małgorzata Szultka-Młyńska*, Bogusław Buszewski, Electrochemistry-mass spectrometry for in-vitro determination of selected chemotherapeutics and their electrochemical products in comparison to in-vivo approach, Talanta 160 (2016) 694-703.

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

IF=4,162; IF_{5-letni}=3,937; MNiSW=40 pkt.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus=3/3

Wkład w autorstwo 80%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

[H5] Ewa Wierzbicka, **Małgorzata Szultka-Młyńska**, Bogusław Buszewski, Grzegorz Sulka, Epinephrine sensing at nanostructured Au electrode and determination its oxidative metabolism, Sens. Actuators B 237 (2016) 206-215.

IF=5,401; IF_{5-letni}=5,118; MNiSW=40 pkt.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus=8/8

Wkład w autorstwo 45%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz za pomocą reaktora elektrochemicznego oraz chromatografii cieczowej i spektrometrii mas, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

[H6] Anna Petruczynik, Karol Wróblewski, **Małgorzata Szultka-Młyńska**, Bogusław Buszewski, Hanna Karakuła-Juchnowicz, Jacek Gajewski, Justyna Moryłowska-Topolska, Monika Waksmundzka-Hajnos, Determination of some psychotropic drugs in serum and saliva samples by HPLC-DAD and HPLC MS, J. Pharm. Biomed. Anal.127 (2016) 68-80.

IF=3,255; IF_{5-letni}=2,863; MNiSW=35 pkt.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus=7/9

Wkład w autorstwo 15%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy dotyczącej spektrometrii mas, zaplanowaniu analiz z zastosowaniem chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrem mas, dyskusji uzyskanych wyników, opracowaniu parametrów spektrometru mas, interpretacji chromatogramów i widm MS, identyfikacji metabolitów oznaczanych leków, redakcji całości pracy.

[H7] **Małgorzata Szultka-Młyńska***, Bogusław Buszewski, Chromatographic behavior of selected antibiotic drugs supported by quantitative structure-retention relationships, J. Chromatogr. A 1478 (2016) 50-59.

IF=3,981; IF_{5-letni}=3,713; MNiSW=40 pkt.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus=2/2

Wkład w autorstwo 80%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

[H8] **Małgorzata Szultka-Młyńska**, Paweł Olszowy, Bogusław Buszewski, Nanoporous conducting polymer-based coatings in microextraction techniques for environmental and biomedical applications, Crit. Rev. Anal. Chem. 46 (2016) 236-247.

IF=4,000; IF_{5-letni}=3,697; MNiSW=35 pkt.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus=5/5

Wkład w autorstwo 70%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym tematykę opisaną w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, napisaniu manuskryptu-rozdziałów poświęconych zastosowaniu technik mikroekstrakcyjnych dla próbek środowiskowych i biologicznych, redakcji całości pracy.

[H9] **Małgorzata Szultka-Młyńska***, Bogusław Buszewski, Study of in-vitro metabolism of selected antibiotic drugs in human liver microsomes by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 8273-8287.

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

IF=3,431; IF_{5-letni}=3,320; MNiSW=35 pkt.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus=1/0

Wkład w autorstwo 80%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości pracy, korespondencji z redaktorem czasopisma oraz recenzentami.

[H10] Paweł Pomastowski, **Małgorzata Szultka-Młyńska**, Wojciech Kupczyk, Marek Jackowski, Bogusław Buszewski, Evaluation of Intact Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Capillary Electrophoresis Detection of Controlled Bacterial Clumping, OMICS, J. Anal. Bioanal. Tech., S13 (2015) 1-7.

*IF=1,800 (wg. bazy Google Scholar); IF_{5-letni}=2,700 (wg. bazy Google Scholar);
MNiSW= brak danych.; Liczba cytowań Web of Science/Scopus= brak danych*

Wkład w autorstwo 65%

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz, dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, redakcji całości pracy.

Oświadczenia współautorów powyższych prac przedstawiono w formie odrębnego załącznika do wniosku (Załącznik numer 5).

PODUSMOWANIE

Publikacje [H1-H10] tworzące osiągnięcie habilitacyjne wykazują następujące wskaźniki bibliometryczne:

- sumaryczny współczynnik oddziaływania IF (wg. listy JCR): **33,356** (5-letni 31,637)
- średnia wartość IF (wg. listy JCR): **3,336** (5-letni 3,164)
- sumaryczna punktacja MNiSW: **325**
- średnia liczba punktów MNiSW: **32,5**
- całkowita liczba cytowań na dzień 5.11.2018 (Web of Science/Scopus): **27/28**
- średni udział % habilitantki: **62,5%**.

4.2. Autoreferat wraz z omówieniem osiągnięcia naukowego

Wprowadzenie

W 2007 roku ukończyłam studia licencjackie na Wydziale Chemii UMK w Toruniu, a następnie rozpoczęłam studia magisterskie na specjalności chemia środowiska. Przedmiotem pracy dyplomowej, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, była charakterystyka i ocena przydatności nowych rodzajów polimerowych włókien sorpcyjnych w analizie wybranych leków metoda mikroekstrakcji do ciała stałego (SPME) oraz wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas oraz detekcją spektrofotometryczną jako czułych i selektywnych technik ilościowego oznaczania (HPLC-UV-MS/MS). Podczas realizacji pracy magisterskiej odbyłam dwumiesięczny staż naukowy w Instytucie Farmakologii Klinicznej oraz Katedrze Anestezjologii i Intensywnej Terapii Uniwersytetu Medycznego w Rostocku w grupie badawczej Prof. Jochena Schuberta. Podczas pobytu poszerzyłam swoją wiedzę z zakresu metod rozdzielczych i spektroskopowych w bioanalizie, jak również metod pracy z próbkami rzeczywistymi (krew, tkanka). Tytuł magistra uzyskałam w czerwcu 2009 roku. Wyniki mojej pracy prezentowałam na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Ukazał się one także drukiem w formie publikacji naukowych [1,2].

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

W tym samym roku zostałam słuchaczką Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii, UMK. Podczas realizacji rozprawy doktorskiej podjęłam tematykę zastosowania zminiaturyzowanych układów sorpcyjnym w oznaczaniu i identyfikacji antybiotyków i ich metabolitów w próbkach biologicznych. Jednym z głównych moich osiągnięć było opracowanie szybkiego biotestu celem terapeutycznego monitorowania leków przeciwbakteryjnych w próbkach od pacjentów (krew, tkanka). Wynikiem prowadzonych badań było zgłoszenie patentowe (nr P.405083) oraz szereg publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym [3-12]. Są to jedne z pierwszych prac na świecie poświęcone temu tematowi. W realizacji badań dużą rolę odegrały granty, w których pełniłam rolę kierownika i wykonawcy. Był to m.in. grant NCN Preludium (2011/01/N/ST4/03178), granty UMK - 457-Ch, 1126-Ch, 1516-Ch oraz 3 Stypendia Marszałka Województwa Kujawsko-Pomorskiego, które w 85% przeznaczyłam na realizację badań. Tytuł doktora uzyskałam w grudniu 2014 roku. Rozprawa doktorska uzyskała szereg nagród i wyróżnień, m.in. nagroda firmy Perlan Technologies i Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą rozprawę doktorską z chemii analitycznej oraz wyróżnienie Komisji Analizy Chromatograficznej KChA PAN dla młodych pracowników nauki w dziedzinie rozdzielania.

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk chemicznych, zostałam zatrudniona na Wydziale Chemii UMK na stanowisku inżynierjno-technicznym (w okresie od IV.2015 do II.2016). W tym okresie do moich zadań należało opracowanie nowych ćwiczeń laboratoryjnych, jak również sprawowanie opieki nad pracownikami dydaktycznymi do realizacji zajęć dla studentów.

W lutym 2015 otrzymałam projekt MNiSW Iuventus Plus (IP2014 046673), z kolei w kwietniu 2015 roku otrzymałam stypendium Fundacji na Rzecz Nauki polskiej w ramach programu „Start”, następnie rozpoczęłam badania naukowe, które stanowią podstawę rozprawy habilitacyjnej.

Postanowiłam zmodyfikować oraz rozszerzyć tematykę badawczą, co przełożyło się na chęć zdobycia nowej wiedzy oraz rozpoczęcia nowych etapów pracy badawczej. Było to również związane z pojawieniem się w publikacjach naukowych znaczącego zainteresowania podejściem *in vitro* oraz *in vivo* w badaniu związków biologicznie aktywnych [13-17].

Następnie zostałam zatrudniona na stanowisku naukowo-technicznym na WCh UMK oraz adiunkta naukowego w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK (od III.2016 do I.2018). W tym okresie równolegle zajmowałam się pracownikami dydaktycznymi oraz brałam udział w badaniach w ramach grantów NCN Symfonia (2013/08/W/N28/00701) – wykonawca oraz Maestro (2013/08/W/N28/00701) – wykonawca. Efektem było opublikowanie kilku prac naukowych z tego zakresu [18-24].

W lutym 2018 roku zostałam przeniesiona na stanowisko asystenta na WCh UMK.

Celowana terapia farmakologiczna

Leczenie spersonalizowane to jedno z najważniejszych osiągnięć współczesnej medycyny. Aby dziedzina ta mogła się rozwijać niezbędna jest współpraca specjalistów z obszaru biologii, genetyki, biotechnologii, bioinformatyki, farmakologii ze środowiskiem lekarskim. Prowadzi to do innowacyjnego podejścia w profilaktyce czy leczeniu poprzez polepszenie bądź dostosowanie terapii farmakologicznej do indywidualnych potrzeb pacjentów, tzw. celowana terapia farmakologiczna, „*terapia szyta na miarę*” [25-27].

Terapeutyczne monitorowanie leków (*ang. Therapeutic Drug Monitoring, TDM*) to skuteczne narzędzie służące do polepszenia, dostosowania terapii farmakologicznej do indywidualnych potrzeb pacjenta, w oparciu o wiarygodne wyniki uzyskane przy stosowaniu starannie opracowanej procedury analitycznej. Znajomość poziomu stężenia leku w płynach ustrojowych pozwala na opracowanie farmakoterapii odpowiedniej dla danego pacjenta.

Istnieje wiele kryteriów spełnianych przez leki, które uzasadniają wprowadzenie monitorowania ich stężenia u pacjenta (np. wąski wskaźnik terapeutyczny, czyli mała różnica

między stężeniem toksycznym terapeutycznym) oraz klinicznych wskazań do TDM (np. zapobieganie nawrotom chorób w leczeniu długoterminowym, profilaktyce). Terapia monitorowana jest użytecznym narzędziem w procesie indywidualizacji leczenia lekami o zróżnicowanym działaniu farmakologicznym ze względu na znaczne międzyosobnicze różnice w farmakokinetyce leku, wynikające z wpływu licznych interakcji, chorób współistniejących, polimorfizmu genetycznego czy nieprzestrzegania przez pacjentów zalecanego schematu dawkowania. Monitorowanie stężenia leków w płynach ustrojowych jest szeroko stosowane w wielu specjalnościach klinicznych, dla przykładu neurologii, kardiologii, psychiatrii. Najczęściej monitorowane są stężenia takich leków jak antybiotyki, leki przeciwpadaczkowe, leki antyarytmiczne, leki przeciwbólowe, związki immunosupresyjne, leki przeciwnowotworowe czy trójpierścieniowe leki antydepresyjne.

Terapia celowana polega na doborze odpowiedniego leku. Przykładowo w przypadku antybiotykoterapii jest to możliwe na podstawie wyników badania mikrobiologicznego (posiewu z pobranego materiału od pacjenta-moczu, krwi, wydzieliny przyrannej). Komfortową sytuacją jest, gdy wskazania kliniczne są potwierdzone badaniem bakteriologicznym, co nie zawsze jest możliwe w rzeczywistości. Dodatkowym utrudnieniem jest oporność na antybiotyki, czyli zjawisko ograniczające ich skuteczność w diagnostyce biomedycznej [28-32].

Istotny problem w TDM stanowi występowanie metabolitów leków, które mogą mieć strukturę mniej lub bardziej zbliżoną do substancji macierzystej oraz zachowywać w mniejszym bądź większym stopniu jego aktywność farmakologiczną. Jeśli znaczna część leku ulega metabolizmowi, to konieczne jest podanie większej bądź wielokrotnej dawki dla osiągnięcia określonego efektu terapeutycznego. Innym możliwym skutkiem niepożądanym, a wynikającym z metabolizmu leku jest powstawanie toksycznych metabolitów. Badanie metabolizmu jest również niezbędne w celu określenia bezpieczeństwa stosowanych leków. Innymi słowy, bezpieczna ilość podanego leku będzie zależna od stopnia jego metabolizmu. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie badaniami, które pozwalają na coraz lepsze zrozumienie zjawisk patologicznych odpowiedzialnych za powstawanie i progresję różnych schorzeń. Dzięki nowym narzędziom diagnostycznym można aktualnie rozpoznać podłoża najbardziej złożonych anomalii. Notuje się również olbrzymi postęp w terapii wielu chorób, czego wymiernym rezultatem jest przedłużenie życia pacjenta.

Rozwój technik chromatograficznych i połączenie ich z czułymi metodami detekcji umożliwi oznaczanie oraz identyfikację związków biologicznie aktywnych w próbkach biologicznych celem klinicznego diagnozowania schorzeń oraz stanów chorobowych. Ponadto, metoda ta wykorzystywana jest w przedklinicznych badaniach toksyczności potencjalnych substancji leczniczych. Obecnie najbardziej popularną techniką w analizie leków i ich metabolitów jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC lub UHPLC) sprzężona ze spektrometrią mas (QqQ, TOF MS, MALDI). Połączenie to jest najczęściej stosowane ze względu na bardzo niską granicę wykrywalności, dobrą selektywność, dokładność oraz precyzję oznaczeń [33-38].

Cel badań, realizowanych w ramach habilitacji

Powodem podjęcia niniejszych badań realizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej oraz opisanych w pracach **H1-H10** [39-48] zgłoszonych do postępowania było opracowanie i optymalizacja metod izolacji oraz oznaczania leków i ich metabolitów należących do różnych grup terapeutycznych w oparciu o nowoczesne techniki ekstrakcyjne, rozdzielcze i spektralne. Inspiracją do przeprowadzonych badań była ścisła współpraca z zespołem lekarzy z Wojewódzkiego Szpitala Zespołowego Kliniki Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Onkologicznej Collegium Medicum UMK w Toruniu polegająca na opracowaniu narzędzi analitycznych dla wczesnej diagnostyki medycznej, a także monitorowanej terapii. Należy w

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

tym miejscu wspomnieć, iż na wszystkie prowadzone badania wydane zostały zgody Komisji Bioetycznej (nr 639/2010, nr 322/2017, nr 585/2017).

Mając na uwadze powyższe zagadnienia celem realizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej badań było:

1. Opracowanie selektywnych metod przygotowania próbek biologicznych (krew, mocz, osocze, ślina, tkanka) z zastosowaniem różnych technik przygotowania próbek celem izolacji związków biologicznie czynnych o różnych właściwościach fizyko-chemicznych, należących do różnych grup terapeutycznych (antybiotyki, leki kardiologiczne, leki immunosupresyjne, leki psychotropowe oraz ich metabolity). Systematyczne i kompleksowe badania nad doбором parametrów ekstrakcji mających wpływ na efektywność procesu. Leki, będące przedmiotem badań, stosowane są obecnie w leczeniu pacjentów dotkniętych najczęściej występującymi chorobami czy schorzeniami [**H1-H9**; 39-47].

2. Opracowanie selektywnych metod identyfikacji i oznaczania leków i ich metabolitów z zastosowaniem ultra- i wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu z różnymi układami detekcji, głównie spektrometrii mas. Systematyczne badania nad doбором warunków chromatograficznych oraz parametrów pracy spektrometru mas. Identyfikacja oraz analiza ilościowa na niskich poziomach stężeń. Uzyskane wyniki pozwoliły na opracowanie procedur analitycznych charakteryzujących się lepszymi parametrami walidacyjnymi w porównaniu do tych opisanych dotychczas w literaturze [**H1-H8,H10**; 39-46,48].

3. Zastosowanie opracowanych procedur analitycznych w oznaczaniu leków i ich metabolitów w próbkach biologicznych od pacjentów – krew, mocz, osocze, ślina, tkanka (*in vivo*). Wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych [**H1-H6,H9,H10**; 39-44,47,48].

4. Opracowanie modeli ilościowych zależności struktura-retencja, które umożliwiają obliczenie retencji badanych związków biologicznie aktywnych na podstawie deskryptorów strukturalnych oraz współczynników retencji, wyznaczonych dla poszczególnych faz stacjonarnych stosowanych podczas realizacji badań [**H7**; 45].

5. Zastosowanie systemu elektrochemicznego (metoda instrumentalna) oraz spektrometrii mas w oznaczaniu i identyfikacji produktów elektrochemicznych wybranych leków należących do różnych grup terapeutycznych (*off-line/on-line* (U)HPLC-EC-MS/MS). Kompleksowe badania nad doбором parametrów przeprowadzenia reakcji elektrochemicznych (I oraz II faza symulacji metabolizmu leków) [**H2-H5**; 40-43].

6. Opracowanie warunków przemian metabolicznych *in vitro* wybranych leków wobec enzymów cytochromu P450 frakcji mikrosomalnej komórek wątroby. Systematyczne i kompleksowe badania nad doбором parametrów inkubacji w mikrosomach ludzkich i szczurzych [**H4,H9**; 42,47].

7. Porównanie uzyskanych struktur dla produktów elektrochemicznych oraz potencjalnych metabolitów badanych leków należących do różnych grup terapeutycznych (*in vitro vs. in vivo*) [**H2-H5**; 40-43].

Opracowanie selektywnych metod przygotowania próbek

Do wykrywania i oznaczania leków w materiale biologicznym stosowane są nowoczesne techniki przygotowania próbek oraz nowe metody analityczne, pozwalające na identyfikację oraz analizę ilościową leku, a także ich metabolitów. Takie podejście umożliwia racjonalne korelowanie dawki leku oraz ułatwia planowanie odpowiedniej terapii w odniesieniu do oczekiwanych efektów farmakologiczno-klinicznych.

Matryce płynów fizjologicznych zawierały obok oznaczanych leków i ich potencjalnych metabolitów znaczne ilości związków towarzyszących (tzw. interferentów). Mogły one wpływać na końcowy wynik analizy, a tym samym powodować spadek selektywności oznaczania wybranych analitów. Z tego względu konieczne było oddzielenie zarówno leków,

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

jak i ich potencjalnych metabolitów (krew, mocz, tkanka ukrwiona) od substancji endogennych pochodzących z matrycy, które mogłyby zakłócać wyniki oznaczeń.

Stąd, jednym z głównych celów prac wchodzących w cykl publikacji **H1-H10** [39-48] było opracowanie prostych, szybkich oraz wpisujących się w założenia „zielonej chemii” metod ekstrakcji wybranych leków i ich metabolitów stosowanych w terapii infekcji bakteryjnych, w kardiologii w przypadku chorób sercowo-naczyniowych, w transplantologii czy stanach depresyjnych bądź zaburzeniach obsesyjno-kompulsyjnych.

W ramach przeprowadzonych badań zastosowano następujące rozwiązania metodyczne:

- ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz wspomagana wysalaniem (SALLE) – określono wpływ rodzaju (acetonitryl) oraz objętości rozpuszczalnika organicznego (300 µl), rodzaj oraz ilości związku wysalającego (chlerek sodu, siarczan amonu, siarczan magnezu; 300 mg/ml), pH (3-12) próbki oraz czas wytrząsania [**H3**] [41];
- mikroekstrakcja przez emulgację kroplą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami (USAEME) - określono wpływ rodzaju (1-oktanol) oraz objętości rozpuszczalnika organicznego (100 µl), wpływ wzrostu siły jonowej roztworu oraz zmiany pH (3) na wydajność ekstrakcji [**H3**] [41];
- ekstrakcja do fazy stałej (SPE) – określono dobór odpowiedniego sorbentu ekstrakcyjnego (sorbentu krzemionkowe oraz polimerowe o różnym wypełnieniu, masie i objętości), rozpuszczalnika do elucji, pH oraz objętość próbki [**H2,H3,H4,H6**] [40,41,42,44];
- mikroekstrakcja na upakowanym sorbencie (MEPS) – określono rodzaj sorbentu (C8, C18), rodzaj, pH i objętość rozpuszczalnika do elucji (metanol, mieszaniny), pH (>7) i objętość próbki (200-400 µl), liczbę cykli ekstrakcyjnych (3-5) oraz rodzaj rozpuszczalnika do przemywania złoża ekstrakcyjnego (metanol, woda) [**H3**] [41];
- mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME) – określono dobór odpowiedniego sorbentu ekstrakcyjnego (włókna SPME C₁₈), objętość roztworu do desorpcji (1,5 ml), czasu (10 min) oraz medium do desorpcji (5 mM AmFr MeOH/H₂O, 8:2, v/v) [**H1,H9**] [39,47].

Zastosowanie tychże technik pozwoliło na uzyskanie wysokiej wydajności ekstrakcji, dobrej odtwarzalności wyników, a także znacznie zmniejszyło zużycie rozpuszczalników. W zależności od zastosowanego wariantu uzyskano różną efektywność, selektywność oraz powtarzalność ekstrakcji w stosunku do wybranych leków należących do różnych grup terapeutycznych oraz ich metabolitów.

Pomimo dużego zainteresowania w literaturze lekami oraz ich potencjalnymi metabolitami z pełnym przekonaniem można stwierdzić, iż dotychczas nie opisano w sposób kompleksowy i systematyczny metod analitycznych pozwalających na oznaczanie związków z różnych grup terapeutycznych w materiale biologicznym pobranym od pacjenta pod kątem terapii celowanej.

Rozwój farmakokinetyki, ze szczególnym naciskiem na metabolizm farmaceutyków, zmienia podejście lekarzy do dawkowania leku. Coraz częściej przy ustalaniu dawkowania bierze się pod uwagę zdolności organizmu pacjentów do metabolizowania oraz wydalania leków. Stąd konieczność opracowywania nowych metod analitycznych mających na celu ułatwienie monitoringu płynów ustrojowych na zawartość leków i ich metabolitów.

Opracowanie selektywnych metod oznaczania i identyfikacji leków i ich metabolitów

Nacisk na rozwój procedur analitycznych umożliwiających analizę niskocząsteczkowych substancji organicznych jest coraz większy. Stąd, ważnym celem jest opracowywanie nowych metod oznaczania i identyfikacji dużej liczby związków biologicznie aktywnych, które będą stanowiły wygodne narzędzie dla potrzeb rutynowej terapii monitorowanej oraz badań farmakokinetycznych. Uwzględniając powyższe przesłanki, prowadzone badania

ukierunkowane były na opracowanie nowych metod wykrywania i oznaczania leków oraz ich metabolitów w materiale biologicznym.

Stąd, podczas pracy badawczej zastosowałam wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) [H1,H4-H6,H9] oraz ultra-sprawną chromatografię cieczową (UHPLC) [H2,H3] w połączeniu ze spektrometrem mas, jako selektywnej i czulej metody detekcji. Szczegółowym przedmiotem badań było opracowanie nowych, nieopisanych dotychczas procedur oraz metod analitycznych do oznaczania i identyfikacji leków z różnych grup terapeutycznych i ich metabolitów pod kątem terapii celowanej.

W celu detekcji leków i ich metabolitów w materiale biologicznym zastosowano dwa rodzaje detektorów: detektor spektrofotometryczny (UV-Vis) oraz spektrometr mas (ESI-MS/MS). Wykorzystanie tych detektorów umożliwiło identyfikację wybranych analitów w oparciu o następujące parametry: czas retencji, widma UV oraz wartości m/z jonów molekularnych i jonów fragmentacyjnych, powstałych w wyniku rozpadu cząsteczek analizowanych związków.

Dobór warunków pracy spektrometru mas prowadzony był z zastosowaniem roztworów substancji wzorcowych wszystkich objętych badaniami związków. W tym celu zastosowano technikę jonizacji opartą o elektrorozpraszanie (ESI). Uzyskane wyniki potwierdziły dane literaturowe, które wskazują, iż metoda ESI częściej polecana jest do bezpośredniej identyfikacji leków, z uwagi na wysoką czułość i prostą interpretację uzyskanych widm.

Oznaczenia analitów za pomocą spektrometru mas przebiegały w polaryzacji dodatniej w tzw. trybie pełnego przemieszczania widma (*Full Scan*), monitorowania pojedynczego jonu (*SIM*), poszukiwania jonów potomnych (*Product Ion*) oraz monitorowania wielu reakcji (*MRM*). Skanowanie w pełnym trybie przeprowadzono celem wyznaczenia wartości ilorazu m/z jonu pseudomolekularnego, czyli cząsteczki analitu o masie powiększonej o masę przyłączonego protonu. Za pomocą trybu monitorowania wybranego jonu dobrano wartość napięcia na fragmentorze, czyli napięcia na końcu kapilary kierującej jony do analizatora *Q1*. Z kolei za pomocą trybu *Product Ion* dla każdego jonu macierzystego na skutek jego fragmentacji uzyskano jony potomne. Na tym etapie skorzystano z wcześniej dobranej wartości napięcia na fragmentorze oraz dobrano odpowiednie wartości energii zderzeń w zależności od badanego związku. Podstawą identyfikacji analitów był czas retencji oraz dwa charakterystyczne przejścia *MRM*. Do analizy ilościowej wybierane było to przejście charakterystyczne dla poszczególnych analitów, które dawało bardziej intensywny sygnał.

Zastosowanie w badaniach trybu skanowania *MRM* znacznie zwiększyło selektywność oraz czułość metody, a tym samym wpłynęło na obniżenie granicy wykrywalności i oznaczalności opracowanej procedury analitycznej.

W ramach doboru warunków pracy spektrometru mas określono właściwe parametry pracy źródła jonów oraz odpowiednie parametry, zależne od właściwości badanych związków. Na etapie doboru parametrów pracy spektrometru mas dla badanych analitów po raz pierwszy zastosowano centralny plan kompozycyjny (CCD), co znacznie ułatwiło planowanie eksperymentu. Temperaturę gazu suszącego badano w zakresie 290-350°C, natomiast napięcie na fragmentorze od 70 do 150 V. Plan składał się z 9 eksperymentów, a wartości parametrów miały postać znormalizowaną -1, 0 i +1. Celem ułatwienia wyboru odpowiednich parametrów otrzymane wyniki przedstawiono w sposób graficzny na przestrzennych wykresach powierzchni odpowiedzi. Dla sprawdzenia poprawności uzyskanego modelu wykonano wykresy zależności wartości przewidywanej od wartości obserwowanej. Wszystkie punkty na krzywej ułożone były wzdłuż jednej prostej, z kolei błędy skorelowane zarówno ujemnie, jak i dodatnio, a otrzymane współczynniki dopasowania były stosunkowo wysokie (>0,9).

Ilościowe zależności struktura-retencja w badaniu leków

Jednym z celów prowadzonych badań było wykorzystanie po raz pierwszy dla wybranych leków ilościowych zależności struktura-retencja (QSRR) oraz chemometrycznej analizy danych do przewidywania retencji chromatograficznej HPLC analitów w odwróconym układzie faz metodą elucji izokratycznej [H7] [45]. Opracowując metodykę chromatograficznego oznaczania badanych leków, zwrócono uwagę na ich strukturę chemiczną. Bowiem, w przypadku analiz za pomocą RP HPLC mamy do czynienia z trzema podstawowymi zjawiskami: podziałem pomiędzy fazę stacjonarną i fazę ruchomą, adsorpcją analitów na powierzchni związanej fazy stacjonarnej oraz adsorpcją organicznego składnika fazy ruchomej na powierzchni adsorbentu i następujący kolejno podział analitów między fazę ruchomą a zaadsorbowaną warstwę rozpuszczalnika. Stąd, oddziaływanie fazy stacjonarnej z chromatografowanymi substancjami jest wypadkową działania następujących czynników: związanych podstawników organicznych, zaadsorbowanych cząsteczek rozpuszczalników oraz wolnych grup silanolowych [49-51]. Przebadano sześć różnych kolumn chromatograficznych, w celu wyboru odpowiedniej do oznaczeń badanych związków biologicznie aktywnych w próbkach rzeczywistych. Badania prowadzono w układzie chromatograficznym opartym o binarną hydroorganiczną fazę ruchomą zawierającą ACN oraz octan amonu (pH=6,5) w różnych wariantach składu procentowego rozpuszczalnika organicznego (od 10% do 55% (v/v)). Acetonitryl, jako najczęściej stosowany organiczny składnik eluentu, charakteryzuje się niską lepkością oraz absorpcją przy niskich długościach fali w zakresie UV. Ponadto, wpływa na lepszą selektywność oraz symetrię pików wskutek braku możliwości powstawania wiązań wodorowych z wolnymi silanolami oraz oddziaływania z grupami alkilowymi nośnika. W porównaniu z metanolem czy tetrahydrofuranem hamuje rozkład krzemionki dla pH > 9 [52-54].

Do określenia lipofilowości w chromatografii HPLC jako fazę stacjonarną głównie używa się fazy oktadecylosilanowej. W ostatnich latach duże zainteresowanie skupia się również na sztucznych membranach – liposomach, micelach i tak zwanej sztucznej błonie biologicznej, (IAM). Sztuczna błona IAM została wprowadzona jako faza stacjonarna w RP HPLC przez Pidgeona i jego współpracowników [55,56]. Faza taka jest otrzymywana poprzez kowalencyjne przyłączenie monowarstwy fosfolipidów (z polarną grupą czołową i niepolarnym łańcuchem węglowodorowym) do cząsteczki krzemionki. Na wzór biomembrany, polarne czołowe grupy wystają poza hydrofobową warstwę i są pierwszym miejscem kontaktu pomiędzy badanym związkiem a sztuczną błoną biologiczną, IAM. Badaniom zostały poddane anality o różnej hydrofobowości. Opierając się na liniowej zależności t_R od stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej dla wszystkich badanych związków, wyznaczono wartości parametru $\log k_w$ poprzez ekstrapolację do zerowej wartości acetonitrylu w fazie ruchomej. Następnie wartości te były korelowane z logarytmami współczynnika podziału ($\log P$), obliczonymi za pomocą programu komputerowego HyperChem. Wykorzystano w tym celu metodę mechaniki molekularnej z polem siłowym MM+ oraz metodę półempiryczną AM1. Obliczenia przeprowadzono wykorzystując algorytm Polak-Ribiere. Ponadto wyznaczono deskryptory molekularne opisujące liczbowo właściwości fizykochemiczne cząsteczek. Deskryptor molekularny z chemii obliczeniowej jest końcowym wynikiem logicznej i matematycznej procedury, która przekształca chemiczne informacje zakodowane w cząsteczce w liczbowy parametr strukturalny. Następnie spośród wyznaczonych deskryptorów wybrano te istotne statystycznie oraz dokonano analizy ich interkorelacji, wykorzystując w tym celu program Statistica. *Dzięki metodzie wieloparametrowej analizy regresji wyprowadzono równania QSRR przedstawiające ilościowe zależności struktura-retencja. Wykorzystanie przewidywań retencji analitów opartych na proponowanych równaniach QSRR potencjalnie umożliwia zwiększenie*

wiarygodności i identyfikacji analitów na podstawie danych uzyskanych z analizy LC-MS/MS.

W celu dokładniejszego poznania i scharakteryzowania różnic pomiędzy poszczególnymi fazami stacjonarnymi w badaniach zastosowano jednoparametrową analizę regresyjną. Różnice we właściwościach retencyjnych badanych wypełnień zostały potwierdzone poprzez różnice w hydrofobowości. Dane retencyjne $\log k_w$ opisano statystycznie w funkcji współczynnika podziału n-oktanol – woda ($\log P$). Na podstawie współczynników korelacji można stwierdzić, iż dla kolumny oktadecylowej oraz cholesterolowej przeważają procesy podziałowe nad adsorpcyjnymi. Adsorpcja ma miejsce na granicy fazy ciekłej oraz ciała stałego. Podział z kolei powoduje transport molekuł związku wbudowanego między łańcuchy fazy stacjonarnej między dwoma niemieszającymi się roztworami. Ponieważ powierzchnia fazy stacjonarnej powinna być zsolwatowana przez molekuly fazy ruchomej, nie można zatem opisać mechanizmu retencji tylko za pomocą podziału lub adsorpcji. Jest to zgodne z przeprowadzonymi badaniami. Przemawiają za tym wysokie wartości współczynnika R_{QSRR} – dla kolumny C18, END (2) wynosi on 0,9978, a dla kolumny CHOL wynosi 0,9921. W przypadku tej ostatniej hydrofobowy charakter przejawia się tutaj w mniejszym stopniu, gdyż wpływ ma na to obecność na powierzchni wypełnienia innych grup funkcyjnych poza alkilowymi (-OH, -NH₂, -Ph). Dla pozostałych kolumn zaobserwowano również odpowiednio wysokie wartości współczynników korelacji. Może to świadczyć o dominującym procesie podziałowym w mechanizmie retencji. Zatem, zachowanie retencyjne może być wyjaśnione przez założenie, iż trzy mechanizmy retencji są efektywne dla danego układu chromatograficznego: oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania π - π , jak również tworzenie wiązań wodorowych. Dodatkowo, w acetonitrylu, jako składowej fazy ruchomej, mają miejsce oddziaływania typu π - π , które mają istotny wpływ na wyżej wymienione mechanizmy. Gdy używamy acetonitrylu jako modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, oddziaływania π - π pomiędzy związkiem a fazą stacjonarną są osłabione przez cząsteczki tego związku. W ten sposób retencja w pierwszej kolejności determinowana jest przez oddziaływania hydrofobowe [52-54].

Na podstawie uzyskanych równań można stwierdzić, iż interesujących informacji dostarcza porównanie wartości kąta nachylenia rozpatrywanych prostych (współczynnik przy $\log P$). Współczynnik ten, bądź też gradient $d(\log k)/d(\log P)$, odzwierciedla stopień, w jakim analit jest otoczony przez ligandy fazy stacjonarnej i dla fazy związanej powinien być mniejszy niż dla n-oktanolu. Kontynuując przedstawiony sposób interpretacji, zakłada się, że im wartość kąta nachylenia jest zbliżona do jedności, tym system wykazuje większą zdolność do naśladowania układu z n-oktanołem. Najwyższy współczynnik przy $\log P$ dla fazy C18, END (2), dowodzi podziałowego mechanizmu rządzącego retencją oraz potwierdza złożoność zjawiska, jakim jest hydrofobowość. Zależność parametru hydrofobowości, będącej logarytmem współczynnika podziału ($\log P$) dla danego związku między fazą oktanolową i fazą wodną, od logarytmu chromatograficznego współczynnika podziału ($\log k_w$) dla 100% wody w fazie ruchomej, pozwala na głębsze poznanie mechanizmów retencji.

Współczynnik podziału między wodę i n-oktanol jest deskryptorem powszechnie używanym w badaniach QSRR i najczęściej stosowanym parametrem lipofilowości. Powinowactwo cząsteczek do środowiska lipofilowego ma wpływ na wszystkie trzy fazy działania leku: farmaceutyczną (forma, sposób podania i uwalniania leku), farmakokinetyczną (losy leku w organizmie – transport cząsteczek w obrębie organizmu, metabolizm i eliminacja) oraz fazę farmakodynamiczną (oddziaływanie z receptorem wywołujące pożądany efekt farmakologiczny) [57]. Jednakże największy wpływ wywiera lipofilowość na fazę farmakokinetyczną, ponieważ parametr ten decyduje o transporcie leku przez błony biologiczne, takie jak bariera krew-mózg czy bariera krew-łożysko, a więc o procesie dystrybucji leku.

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Oddziaływania biomolekuł z błoną komórkową jest powszechnym procesem biologicznym. Wraz z rozwojem nauk przyrodniczych i medycznych pojawiła się potrzeba prowadzenia badań w układach symulujących systemy naturalne. Możliwość taką daje wysokosprawna chromatografia cieczowa i zastosowanie faz stacjonarnych o określonych właściwościach. Wypełnienia te powinny posiadać strukturę zbliżoną do struktury błon komórkowych, co może pozwolić na przeprowadzenie i kontrolowanie procesów biologicznych w układach sztucznych. Zastosowanie tego typu faz stacjonarnych umożliwia zrozumienie procesów farmakokinetycznych zachodzących w organizmach żywych [57].

Dwuparametrowe równania QSRR wraz z współczynnikami (\pm SD) równań oraz parametrami statystycznymi dla badanych faz stacjonarnych przedstawiają najlepsze dopasowania (modele) charakteryzujące mechanizm retencji dla badanych związków. Opisują one podobieństwa oraz różnice w oddziaływaniach międzycząsteczkowych dla p -wartości $< 0,05$, co wskazuje na statystycznie istotne wyniki. Dla kolumn: C18, END (1), AP oraz IAM na mechanizm retencji największy wpływ ma współczynnik $\log P$. Interesującym jest ujemny wkład współczynników regresji (k_1 , k_2) dla kolumny C18, END (1) w przeciwieństwie do dwóch pozostałych z tej grupy (AP, IAM). Zjawisko to można tłumaczyć zróżnicowaną selektywnością tych faz stacjonarnych w stosunku do badanych związków, jak również ich odmienną budowę. W przypadku kolumny C18, END (2) oraz CHOL wkład w uzyskane statystycznie istotne równania QSRR wnoszą identyczne deskryptory molekularne. Uzyskane równania charakteryzują się możliwością przewidywania właściwości retencyjnych. W sensie fizycznym, wielkość SAS, określająca pole kontaktu z cząsteczkami formującymi układ chromatograficzny, wzrasta wraz ze wzrostem retencji. Parametr ten określa zdolność molekuł substancji analizowanej do uczestniczenia w niespecyficznym, dyspersyjnym oddziaływaniach międzycząsteczkowych (oddziaływania Londona). Są one silniejsze pomiędzy analitem i ligandami danej fazy stacjonarnej niż pomiędzy analitem a małymi cząsteczkami zastosowanego eluenta (wody, metanolu czy acetonitrylu). W związku z tym, natężenie oddziaływań dyspersyjnych powoduje wzrost retencji. Oddziaływania te są silniejsze pomiędzy cząsteczkami analitu a polarnymi molekułami eluenta niż pomiędzy analitem a daną fazą stacjonarną. Tym samym, wkłady δ_{\min} , podobnie jak P_{ch} mają znak ujemny.

Elektrochemiczna symulacja metabolizmu leków

Cały czas trwają poszukiwania nowych alternatywnych metod, w celu poznania nowych metabolitów związków biologicznie aktywnych. Opracowano różne układy modelowe, które naśladują procesy metaboliczne *in vitro*. Ustalono metody symulacji metabolizmu oksydacyjnego polegają na wykorzystaniu narządów ludzkich lub zwierzęcych, które posiadają enzymy z grupy cytochromu P450.

Jednakże, w ostatnim czasie w badaniach nad biotransformacją metaboliczną związków biologicznie aktywnych wyodrębniła się zupełnie nowa technika, która skupia na sobie połączenie elektrochemii (EC) oraz spektrometrii mas (MS). Technika ta pozwala na naśladowanie przebiegu wielu typowych reakcji fazy I i II metabolizmu, a także umożliwia identyfikację produktów elektrochemicznych, które mogą stanowić potencjalne metabolity.

Połączenie EC/MS obok ogólnie stosowanych i akceptowanych metod *in vitro* może być interesującym podejściem w badaniu degradacji związków biologicznie aktywnych (leków). Metoda ta zaliczana jest do technik instrumentalnych, w których nie stosuje się układów biologicznych. Pozwala na identyfikację produktów końcowych oraz pośrednich reakcji elektrochemicznych badanych związków [58-62].

Na podstawie uzyskanych wyników badań [H2,H3,H4,H5] [40,41,42,43] można stwierdzić, iż metoda ta może być skutecznie stosowana w celu przewidywania procesów utleniania, które zapoczątkowane zostają utlenieniem jednoelektronowym, takim jak N-dealkilacja, S-

oksydacja, P-oksydacja, utlenienie alkoholi, hydroksylacja układów aromatycznych oraz dehydrogenacja. Nie jest korzystna w przypadku reakcji zapoczątkowanych przez bezpośrednie pozyskiwanie atomu wodoru, jak na przykład O-dealkilacja czy alifatyczna hydroksylacja niepodstawionych pierścieni aromatycznych, z powodu zbyt wysokiego potencjału utleniającego wymaganego dla reakcji elektrochemicznego utlenienia.

Utlenianie związków przeprowadzane jest w cienkowarstwowej celi elektrochemicznej wyposażonej w pracującą elektrodę, elektrodę odniesienia Pd/H₂, HyREFTM oraz elektrodę pomocniczą wykonaną z grafitu z domieszką teflonu (Reactor CellTM). Potencjał elektrochemiczny wytwarzany jest za pomocą potencjostatu. W celu obserwacji otrzymanych produktów utlenienia celę elektrochemiczną łączy się bezpośrednio (*on-line/off-line*) ze źródłem jonów spektrometru mas. Zarejestrowane woltamperogramy masowe otrzymuje się poprzez zwiększanie liniowo potencjału elektrody pracującej od 0 do 3000 mV (dla elektrody diamentowej, MD) lub od 0 do 2000 mV (dla elektrody węglowej, GC; platynowej, Pt; złotej, Au) z szybkością 10 mV/s.

W wyniku reakcji utleniania danego leku w celi elektrochemicznej uzyskano woltamogramy masowe przedstawiające zmieniającą się intensywność sygnałów leku i jego produktów elektrochemicznych w zależności od przyłożonego napięcia. W efekcie otrzymano trójwymiarowe wykresy ilustrujące procesy elektrochemiczne badanej substancji. Analizy strukturalne potencjalnych produktów prowadzono po przyłożeniu charakterystycznego dla danego leku stałego napięcia. Do wyznaczenia najistotniejszych parametrów oraz interakcji między nimi, wpływającymi na stopień przereagowania/degradacji związku (leku) zastosowano centralny plan kompozycyjny (CCD).

Opracowywanie nowych metod analitycznych oraz ich zastosowanie w badaniach próbek klinicznych umożliwia monitorowanie zmian wczesnochorobowych, oznaczanie leków i ich metabolitów dla celów terapii monitorowanej, jak również wiele innych związków chemicznych, w tym hormonów. Jest to duża grupa związków biologicznie czynnych różniących się pod względem budowy chemicznej i funkcji fizjologicznych.

Stąd, za pomocą nowoczesnego systemu elektrochemicznego poddano weryfikacji mechanizm utleniania epinefryny (EP), który nie został dotychczas jednoznacznie ustalony, oraz stabilność i rodzaj tworzonych adduktów po dodaniu glutationu (GSH), czyli substancji współlistniejącej z EP w płynach ustrojowych.

Na podstawie badań zaprezentowanych w pracy **H5** [43] można skłaniać się ku przyjęciu mechanizmu ECE (transfer elektronu - reakcja chemiczna – transfer elektronu). W przypadku alternatywnego mechanizmu ECC (transfer elektronu – reakcja chemiczna – reakcja chemiczna), konieczne jest aby dwie cząsteczki będące produktami utleniania EP, czyli leukoadrenochrom (reduktor) oraz adrenochinon (utleniacz) spotkały się efektywnie w objętości roztworu i przereagowały. Obecność na widmach MS produktu pośredniego tej reakcji, jakim jest leukoadrenochrom-o-semichinon, świadczy, że reakcja ta zachodziłaby w dwóch etapach i efektywny kontakt musiałby nastąpić dwukrotnie, co zdaje się być mało prawdopodobne. Badania na temat wpływu dodatku GSH do układu pokazały, że addukty EP-GSH powstają poprzez redukcję produktów utleniania EP, na co wskazuje proporcjonalny wzrost ich stężenia do stężenia metabolitów EP. Potwierdza to, że tworzenie się adduktów EP-GSH nie wpływa na zdolność oznaczania EP, a jest indykatorem stężenia produktów jej utlenienia.

Wiele związków w organizmie ulega utlenieniu lub redukcji, gdyż posiadają właściwości redoks (ponad 90% z nich). Wyjaśnienie reakcji redoks metabolizmu jest kluczowym punktem w dziedzinie farmakologii leków. Elektrochemia od lat stosowana jest w chemii biomedycznej do badania właściwości utleniająco-redukujących dla farmaceutyków. Jednak dopiero w latach osiemdziesiątych podjęto próby wykorzystania tej dziedziny, jako alternatywnej metody do badania przebiegu modeli biologicznych. Połączenie elektrochemii

ze spektrometrią mas EC/MS zapewnia możliwość generowania i identyfikacji produktów elektrochemicznych różnych substancji. Dodatkowo wprowadzenie różnych modyfikacji, między innymi połączenie EC/MS z metodami separacyjnymi (chromatografii cieczowej LC oraz elektroforezy kapilarnej CE) *on-line* lub *off-line*, powoduje zwiększenie wydajności procesu, skrócenie czasu pomiędzy wytworzeniem a detekcją danego metabolitu, co wiąże się z identyfikacją związków reaktywnych o krótkim czasie życia.

Przemiany metaboliczne *in vitro* wybranych leków wobec enzymów metabolizujących obecnych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby

*Podstawowe pytanie dotyczące badań nad przemianami metabolicznymi związków biologicznie aktywnych w ludzkim organizmie to w jaki sposób skorelować z sobą wyniki z eksperymentów *in vitro* z badaniami *in vivo* w praktyce klinicznej. W metabolizmie leków zastosowanie znajdują liczne modele *in vitro*, jak hepatocyty, enzymy wątrobowe frakcji mikrosomalnej, pojedyncze frakcje cytoplazmatyczne czy rekombinowane systemy enzymatyczne.*

W praktyce stosuje się mikrosomy wyizolowane z ludzkiej wątroby, frakcję cytosolową oraz frakcję S9 ludzkiej wątroby, a także hepatocyty, głównie pierwotne ludzkie hepatocyty. Każdy z tych systemów ma jednak swoje wady. Najlepsze wyniki osiąga się wykorzystując pierwotne hepatocyty, które w pełni pozwalają odtworzyć szlaki biotransformacji, jakim podlega lek. Jednak krótki czas życia oraz genetyczna niestabilność pierwotnych hepatocytów uniemożliwia prowadzenie badań w szerszym zakresie. Z kolei w wyizolowanych komórkach wątroby lub mikrosomach nie zawsze dochodzi do ekspresji wszystkich enzymów metabolizujących lub ich poziom jest zbyt niski, by efektywnie badać ich rolę.

Do badania metabolizmu leków wygodnym modelem są systemy ekspresyjne, do których należą: bakterie, drożdże, komórki owadów oraz ssaków. Pierwszymi modelami komórkowymi, jakie posłużyły do otrzymania rekombinowanych enzymów cytochromu P450, były komórki bakteryjne. Później zastosowano również komórki drożdżowe i owadzie. Wadą tych systemów jest to, że w nieco inny sposób niż w komórkach ludzkich przebiegają w nich procesy transkrypcji, translacji oraz potranslacyjna modyfikacja białka. Ponadto poziom pozostałych enzymów metabolizujących leki jest również inny bądź zmieniony. Powszechnym stało się zatem stosowanie stabilnych linii komórek nowotworowych. Najczęściej stosowanymi liniami komórkowymi otrzymanymi z ludzkich nowotworów są linia HepG2, wyprowadzona z nowotworu wątroby oraz Caco-2, wyprowadzona z nowotworu okrężnicy.

Ze względu na brak doniesień literaturowych dotyczących zachowania się badanych analitów na działanie wątrobowych ludzkich enzymów frakcji mikrosomalnej podjęto badania z tego zakresu [H4,H9] [42,47]. Poszukując różnic w biotransformacji wybranych leków zbadano przebieg ich przemian metabolicznych w obecności enzymów mikrosomalnych komórek ludzkiej oraz zwierzęcej wątroby. Mikrosomy są to pęcherzyki błony retikulum endoplazmatycznego w komórce zawierające szereg enzymów I i II fazy metabolizmu, w tym kompleks monooksygenazy cytochromu P450 oraz NADPH/UDPGA – zależnej reduktazy cytochromu P450. Stąd, enzymy metabolizujące zawarte w mikrosomach ludzkich przyjęto w prezentowanej pracy jako model do badania i przewidywania przemian metabolicznych badanych związków w organizmie człowieka.

Badanie biotransformacji każdorazowo rozpoczynano od analizy chromatograficznej związku referencyjnego. Enzymatyczne transformacje wybranych związków w obecności enzymów mikrosomalnych prowadzono w dobranych warunkach dla aktywacji odpowiedniego leku. Spośród licznych enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby najbardziej zaangażowane w reakcje biotransformacji substancji obcych są izoenzymy cytochromu P450.

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Około 95% leków przyjmowanych obecnie przez pacjentów jest metabolizowanych przez tę grupę enzymów [63].

W metabolizmie leków biorą udział między innymi izoenzymy CYP2C9, CYP2C8, CYP3A4 oraz CYP1A2, które mogą również uczestniczyć w biotransformacji innych związków endogennych i egzogennych. Najistotniejszą rolę odgrywa izoenzym CYP2C9. Jego aktywność może być hamowana bądź pobudzana przez wiele substancji. Zahamowanie jego aktywności może wpływać na spowolnienie metabolizmu leku, a tym samym na zwiększenie jego stężenia w organizmie, co może prowadzić do wystąpienia działań niepożądanych. Przyspieszenie metabolizmu może natomiast spowodować szybszą eliminację substancji leczniczej, co uniemożliwi osiągnięcie stężenia terapeutycznego [64-67]. Podczas badań zastosowano frakcje mikrosomalnej ludzkich oraz zwierzęcych enzymów wątrobowych charakteryzujących się różnorodną aktywnością enzymatyczną.

Analizę przebiegu reakcji metabolicznej biotransformacji badanych związków prowadzono techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych z udziałem detektora UV-Vis. Analizy chromatograficznej składu mieszanin reakcyjnych dokonano bezpośrednio po zmieszaniu wszystkich składników mieszaniny reakcji oraz po odpowiednich czasach inkubacji. W celu określenia struktur chemicznych produktów metabolizmu badanych związków powstających wobec wybranych układów enzymatycznych zastosowano sprzężenie chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas (HPLC-ESI-MS/MS).

Ogrzewanie frakcji mikrosomalnej komórek wątroby bez obecności NADPH w temperaturze 37°C przez określony czas nie miało wpływu na ilość związku w mieszaninie reakcyjnej. Innymi słowy, uzyskane wyniki wskazują, iż badane leki były podatne na przemiany enzymatyczne w obecności kofaktora biotransformacji metabolicznych oraz stopień ich przereagowania zależał od stężenia NADPH, jak i czasu inkubacji. W celu dobrania odpowiednich warunków doświadczenia początkowo przeprowadzono inkubację badanych związków w obecności odpowiedniego kofaktora NADPH/UDPGA (0; 1,25; 2,5 oraz 3,75 mM) bądź enzymów frakcji mikrosomalnych (0; 1; 2 oraz 3 mg/ml). Stężenie substratu (leku) malało liniowo wraz z postępem reakcji. W przypadku inkubacji bez udziału kofaktora nie zaobserwowano podczas analiz sygnałów pochodzących od innych substancji.

Podczas badań sprawdzono również podatność wybranych analitów na przemiany wobec enzymów drugiej fazy metabolizmu obecnych w pęcherzykach mikrosomalnych komórek wątroby – transferaz glukuronianowych, UGT. Są one odpowiedzialne za metabolizm szerokiej gamy związków istotnych z klinicznego punktu widzenia. Enzymy z rodziny UGT występują w wielu odmianach w retikulum endoplazmatycznym i błonach jądrowych. Zlokalizowane są głównie w wątrobie, ale odgrywają też znaczącą rolę w metabolizmie poza komórkami wątroby – w przewodzie pokarmowym i nerkach [68].

Podczas pracy doświadczalnej podjęto próbę określenia struktur chemicznych powstałych produktów metabolicznej biotransformacji badanych leków. W tym celu zarejestrowano widma masowe dla każdego z badanych analitów (substratów) oraz potencjalnych metabolitów (produktów) stosując technikę HPLC-ESI/MS. Istnieje olbrzymia ilość poszczególnych składowych w ludzkich enzymach wątrobowych frakcji mikrosomalnej, które mogą eluować podczas analizy w tym samym czasie co związek docelowy. Jednakże, aby rozwiązać ten problem badania przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Mass Hunter Metabolite ID. Za pomocą tego narzędzia analitycznego sygnały pochodzące od badanego analitu w odniesieniu do próbek kontrolnych określano poprzez porównanie ich czasów retencji, widm MS oraz pól powierzchni. Ugrupowania jonowe $[M+H]^+$ dla proponowanych metabolitów zostały początkowo oznaczone i zidentyfikowane w trybie pełnego skanowania. Przy dobranych wcześniej warunkach analizy za pomocą spektrometru masowego, sygnały dla badanych leków zidentyfikowano jako $[M+H]^+$ o charakterystycznych m/z oraz czasach retencji (t_R). Wielostopniową fragmentację badanych leków

przeprowadzono celem uzyskania danych do interpretacji widm MS dla potencjalnych metabolitów wybranych związków.

Analiza chromatogramów i widm MS wskazuje, iż badane leki są podatne na przemiany enzymatyczne, a stopień ich przereagowania zależy od obecności i stężenia NADPH oraz czasu inkubacji. Biotransformacja wybranych leków należących do różnych grup terapeutycznych prowadzi do powstania wielu produktów-potencjalnych metabolitów I oraz II fazy reakcji biotransformacji. Dodatkowo eksperymenty dwustopniowej fragmentacji MS/MS dla wybranych sprotonowanych molekuł (potencjalnych metabolitów) potwierdziły proponowane dla nich struktury chemiczne.

Obserwacja ta jest zgodna z ogólną wiedzą, wskazującą, że ta grupa izoenzymów cytochromu P450 bierze udział w metabolizmie wielu leków. Problemem okazało się jednak trudne do jednoznacznego wyjaśnienia zjawisko niskiej intensywności pików niektórych produktów przy równoczesnym wysokim stopniu przereagowania substratu oraz obniżanie się stężenia produktów wraz z upływem czasu reakcji. Można przypuszczać, iż powstające reaktywne metabolity szybko wiążą się na powierzchni białek mikrosomalnych, których stężenie w mieszaninie jest wysokie.

Uzyskane wyniki wskazują, iż na skutek przemian badanych związków przez enzymy UGT zawarte w pęcherzykach mikrosomalnych ludzkich komórek wątroby powstaje jeden charakterystyczny pik produktu, o czasie retencji krótszym od czasu retencji związku wyjściowego. Dodatkowo, stopień ich przereagowania w wyniku metabolicznej reakcji glukuronidacji zależał od stężenia kofaktora UDPGA oraz stężenia białek frakcji mikrosomalnej. Na podstawie uzyskanych wyników nie zaobserwowano produktu II fazy reakcji metabolizmu dla kilku z badanych analitów. Prawdopodobnie, leki te nie ulegają reakcjom II fazy biotransformacji w obecności enzymów z grupy transferaz glukuronianowych zlokalizowanych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby. Aby potwierdzić zauważalny udział UGT w tworzeniu produktów reakcji II fazy biotransformacji dla pozostałych leków do mieszaniny reakcyjnej dodano β -glukuronidazę. Na skutek działania tego enzymu dochodzi do hydrolizy glukuronidów [69]. Podczas inkubacji w obecności enzymu bakteryjnego zaobserwowano zanik pików produktów metabolicznej reakcji glukuronidacji. Obserwacja ta stanowi również dowód na to, iż w organizmie żywym istnieje relacja pomiędzy I a II fazą metabolizmu. Ponadto, obecność oraz odpowiedni poziom NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450 w komórkach wątroby warunkuje prawidłowe działanie fizjologiczne jego izoenzymów.

Interpretacja zebranych widm mas (MS) pików uzyskanych metabolitów pozwala stwierdzić, iż pozostałe badane leki są podatne na przemiany enzymatyczne w obecności wybranych kosubstratów. Wartości m/z ich jonów masowych mogą odpowiadać strukturom chemicznym produktów, w których doszło do sprzężenia danego leku po pierwszej fazie przemian metabolicznych z resztą kwasu glukuronowego (Δ -176 Da) poprzez atom tlenu w cząsteczce leku. Obecność takich metabolitów potwierdza również przypuszczenia, iż produkt I fazy biotransformacji metabolicznej poddawany jest dalszym przekształceniom w II fazie przemian, w tym przypadku procesowi glukuronidacji.

Obserwując przemiany metaboliczne wybranych leków wobec ludzkich i zwierzęcych enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby stwierdzono, iż związki te wykazywały zróżnicowaną zdolność do transformacji. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, iż mikrosomy wątrobowe są odpowiednim modelem do badania, jak również przewidywania przemian metabolicznych badanych analitów, jakie mogą mieć miejsce w organizmie pacjenta.

Ostatecznie wskazano dla większości badanych leków charakterystyczne reakcje I i II fazy metabolicznej biotransformacji z myślą, aby pomóc oraz ułatwić identyfikację nowych związków dla spersonalizowanej terapii celem zaawansowanych dalszych badań. Wszystkie

zaproponowane reakcje I fazy metabolizmu są typowe dla procesów katalizowanych przez izoenzymy z grupy cytochromu P450.

Znając możliwe kierunki przemian metabolicznych badanych leków w układzie enzymatycznym, w kolejnym etapie badań postanowiono poznać obraz ich biotransformacji także w innym miejscu oczekiwanego działania terapeutycznego, czyli komórkach nowotworowych linii Caco-2. Proponowane badania przeprowadzono stosując linię komórkową ludzkiego nowotworu jelita grubego, która ze względu na obecność enzymów metabolizujących I i II fazy metabolizmu jest powszechnie stosowana w badaniach przemian metabolicznych wielu leków i kesnobiotyków [69,70]. Badania przemian metabolicznych wymagały początkowo określenia odpowiednich warunków prowadzenia reakcji poprzez dobór: ilości komórek, stężenia badanego związku oraz czasu jego inkubacji z komórkami. Badania wpływu ekspozycji w czasie kultury Caco-2 na testowane związki dowiodły, iż komórki nabłonka jelitowego mogą uaktywniać procesy prowadzące do biotransformacji leku. W badaniu zastosowano specjalne naczynie hodowlane zbudowane w formie zamkniętego, dwukomorowego pojemnika. Między górną a dolną komorą umieszczona jest poziomo porowata membrana, na której rozwija się kultura komórek nabłonkowych. Zarówno górna (apikalna) komora, jak również dolna (podstawna) wypełniona jest pożywką hodowlaną. Pożywka po stronie apikalnej miała pH=6,5, z kolei po stronie podstawnej 7,4, co lepiej symuluje warunki *in vivo*.

Komórki Caco-2 wytwarzają enzymy disacharydazy, peptydazy, izoenzymy CYP450, transferazę-S-glutationową, sulfotransferazę i glukuronidazę oraz białka transportowe, wytwarzane przez komórki absorbujące nabłonka, biorące udział w transporcie cukrów, aminokwasów, peptydów i witamin, jak również P-glikoproteinę oraz białka oporności wielolekowej, związane z transportem i metabolizmem leków. Ponadto komórki tej linii produkują na swojej powierzchni od strony apikalnej niewielkie ilości śluzu jelitowego [70]. Hodowle komórek nabłonkowych przeprowadza się w temperaturze 37°C w specjalnych inkubatorach z regulowaną atmosferą gazów tak, aby zawierały one 5% CO₂, co imituje stężenie tego gazu we krwi. Odpowiednia wilgotność zabezpiecza kulturę przed wysychaniem.

Pojawienie się nowych metabolitów, którego nie zaobserwowano podczas przemian wybranych leków wobec ludzkich bądź zwierzęcych mikrosomów wątrobowych, podkreśliło fakt występowania różnic w zdolności związków do przemian metabolicznych w obecności białek mikrosomalnych obecnych w różnych modelach do badań in vitro. Wiedza ta może być pomocna w przewidywaniu wpływu badanych związków na aktywność enzymów metabolizujących oraz planowaniu terapii celowanej. Jednak oddziaływania te mogą być odmienne w warunkach in vivo.

Analiza próbek rzeczywistych na zawartość leków i ich potencjalnych metabolitów

Opracowane i zwalidowane procedury zastosowano do wykrywania i oznaczania leków i ich potencjalnych metabolitów należących do różnych grup terapeutycznych w próbkach biologicznych (mocz, krew, osocze, ślina, tkanka ukrwiona) z oddziałów klinicznych [H1,H2,H3,H4,H6,H9] [39,40,41,42,44,47]. próbki pobierane były w różnych odstępach czasu od momentu podania leku. Produkty metabolizmu powstałe w I fazie są dostępne komercyjnie jednakże koszt syntezy jednego wzorca jest stosunkowo drogi. Z kolei metabolity wybranych związków, które powstają w II fazie są w większości niedostępne. Dlatego w prowadzonych badaniach etapem poprzedzającym analizę próbek rzeczywistych był eksperyment z zastosowaniem enzymów wątrobowych frakcji mikrosomalnej.

W ramach badań, identyfikację oznaczanych związków przeprowadzono w oparciu o porównanie czasów retencji, maksimów absorpcji oraz kształtów ich widm absorpcyjnych z uzyskanymi danymi dla wzorców. Dodatkowo w celu potwierdzenia

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

obecności danego analitu do każdej próbki dodawano roztworu wzorcowego związku, którego obecność stwierdzono na podstawie czasów retencji i widma MS. Zgodność wszystkich danych oraz wzrost intensywności pików stanowiły podstawę wnioskowania o obecność oznaczonych związków w próbkach pochodzących od pacjentów.

Analiza z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas prowadzona była w trybie MRM, a w trakcie badań analizowano jony fragmentacyjne protonowanych i deprotonowanych jonów pseudomolekularnych każdej oznaczanej substancji. Identyfikację związków w próbkach rzeczywistych prowadzono na podstawie trzech wybranych jonów dla każdego analitu – jeden jon macierzysty i dwa jony potomne. W celu analizy ilościowej dla każdego z badanych związków identyfikowano 2 jony: jon macierzysty i jon fragmentacyjny. Dodatkowo dla pełnej identyfikacji związków porównywano uzyskane dane z czasami retencji substancji wzorcowych.

Wyniki uzyskane podczas monitorowania stężenia leków w różnych odstępach czasu od doustnego podania leku zostały także wykorzystane do obliczenia podstawowych parametrów farmakokinetycznych. W dostępnej literaturze na ogół parametry te wyznaczane są w oparciu o dane otrzymane po analizie osocza i charakteryzują los leku w ustroju po jego podaniu (LADME). Składają się na to procesy, które zachodzą w czasie od podania leku do jego wydalania, stąd skrót LADME, czyli: L – *libertyn* (uwolnienie), A – *absorption* (wchłanianie), D – *distribution* (rozmieszczenie), M – *metabolizm* (metabolizm, biotransformacja) oraz E – *extrection* (wydalanie). Aby w pełni wykorzystać otrzymane na podstawie analiz próbek rzeczywistych wyniki, określono podstawowe parametry farmakokinetyczne oznaczanych leków, takie jak czas stężenia maksymalnego (T_{max}), stężenie maksymalne leku we krwi (C_{max}), pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku w czasie (AUC) oraz stała szybkości wchłaniania (K_{e1}).

Znaczenie kliniczne farmakokinetyki wynika z potrzeby stosowania indywidualnego leczenia dla każdego pacjenta, dla którego znajomość stężenia leku we krwi oraz wyznaczonych parametrów fizykochemicznych są bardzo pomocne w ustawieniu schematu dawkowania.

Właściwy etap badań obejmował przeprowadzenie analizy ilościowej i jakościowej badanych leków i ich metabolitów w próbkach rzeczywistych pobieranych w różnych odstępach czasu od momentu podania leku (dla przykładu w przypadku osocza/krwii po 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 godzinach). Wyniki analiz badanych próbek wskazały na różnice w zawartości odpowiedniego leku oraz jego metabolitu. Wyznaczono średnie stężenie leku i jego metabolitów w uzyskanych ekstraktach.

W całej grupie pacjentów przyjmujących badane leki wykryto oznaczane substancje na poziomach stężeń umożliwiających ich ilościowe oznaczenie. Różnice w oznaczonych wielkościach są najprawdopodobniej spowodowane indywidualnymi zdolnościami metabolizowania i wydalania powyższych substancji leczniczych przez organizmy pacjentów. Uzyskane wyniki wskazują, iż opracowane w ramach niniejszej rozprawy metody analityczne pozwalają wyznaczyć podstawowe parametry farmakokinetyczne na podstawie ilościowego oznaczania leku we krwi. Ponadto, opracowane metody chromatograficzne umożliwiają oznaczanie badanych leków wraz z ich metabolitami w jednym układzie chromatograficznym. Czas potrzebny na wykonanie analizy chromatograficznej nie przekracza 15 minut, ponadto anality są dobrze rozdzielone. Co więcej, nie występują interferencje matrycowe, dzięki odpowiednio dobranej metodzie prekoncentracji.

Aplikacja opracowanych metod chromatograficznych wraz z etapem przygotowania próbek rzeczywistych stanowi podstawę do monitorowania terapii badanymi lekami [H1,H2,H3,H4,H6,H9] [39,40,41,42,44,47]. Przedstawione rozwiązania metodyczne z zastosowaniem technik separacyjnych mogą stanowić narzędzie niezbędne do uzyskania wiarygodności informacji dotyczących zależności między metabolizmem a przyswajalnością

leków należących do różnych grup terapeutycznych, a także potencjalnie pozwolą na określenie ich biodostępności.

Mając na uwadze fakt, iż leki docierają do różnych tkanek i narządów w różnym stężeniu, zależnie od właściwości danej tkanki i cech farmakokinetycznych leku, stężenie leku, jakie po określonym czasie wytworzy się w poszczególnych narządach i tkankach, zależy od intensywności przepływu krwi. Narządy bogato ukrwione (wątroba, nerki), przez które przepływa więcej krwi, otrzymują więcej leku. Przenikanie leku do narządów słabo ukrwionych jest wolniejsze, a więc ilość leku, która się do nich dostanie, będzie niewielka. Inaczej przedstawia się sytuacja, gdy lek musi dostać się do dalszego punktu uchwytu (rana pooperacyjna, owrzodzenie troficzne), pokonując dodatkowe bariery. Wówczas stężenie leku w takiej sytuacji często jest bardzo niskie, a niekiedy w ogóle nie uzyskuje się wartości terapeutycznych.

Z klinicznego punktu widzenia, w przypadku badań nad próbkami rzeczywistymi od pacjentów z oddziałów szpitalnych, w ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zainteresowaniem zakażeniami bakteryjnymi. Można tu wskazać podział na zakażenia egzogenne wywołane drobnoustrojami pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego oraz endogenne, spowodowane florą bakteryjną pacjenta. Identyfikacja lekoopornych patogenów jest niezbędna podczas wdrożenia celowanej antybiotykoterapii. Stąd, nadrzędnym celem pracy **H10** [48] było porównanie dwóch metod – biochemicznej (Vitek 2) oraz spektrometrii mas (MALDI TOF MS) opartej na analizie profili białek wewnątrzkomórkowych charakterystycznych dla poszczególnych rodzajów i gatunków drobnoustrojów. Metodą służącą do bardzo szybkiej i poprawnej identyfikacji okazała się spektrometria mas, oparta na analizie unikatowego profilu białkowego drobnoustroju, określanego jako molekularny „odcisk palca”. Przebadano 13 szczepów wzorcowych pochodzących z kolekcji ATCC, uzyskując charakterystyczną identyfikację do gatunku. *Niewątpliwą zaletą uzyskanych wyników jest bardzo krótki czas przeprowadzenia badania oraz możliwość szybkiego uzyskania wyniku celem identyfikacji drobnoustrojów, co w przypadku stanu zagrożenia życia pacjenta bądź ostrej reakcji organizmu na infekcję wywołaną przez patogeny (sepsa) umożliwia włączenie właściwej celowanej terapii farmakologicznej.*

Podsumowując należy stwierdzić, iż badania zostały realizowane na kilku płaszczyznach. Mianowicie, poprzez elektrochemiczną symulację metabolizmu (reakcje I i II fazy biotransformacji) wybranych leków należących do różnych grup terapeutycznych (antybiotyki, leki nasercowe, immunosupresyjne oraz psychotropowe) za pomocą reaktora elektrochemicznego w połączeniu on-line/off-line ze spektrometrem mas (QqQ MS, MALDI-TOF MS) [H2,H3,H4,H5] [40,41,42,43]. Ponadto, przeprowadzono przemiany metaboliczne in vitro wybranych analitów wobec enzymów metabolizujących, obecnych we frakcjach mikrosomalnych ludzkich oraz zwierzęcych komórek wątroby [H4,H9] [42,47]. Co więcej, dokonano korelacji otrzymanych wyników z danymi uzyskanymi dla próbek rzeczywistych pobranych od pacjentów z różnych oddziałów klinicznych (mocz, osocze, krew, ślina, tkanka) [H1,H2,H3,H4,H6,H9] [39,40,41,42,44,47]. Poznanie szlaków przemian metabolicznych mogących mieć miejsce w organizmie różnych pacjentów jest niezbędne dla każdego związku biologicznie aktywnego. Wynika to ze zjawiska polimorfizmu genu enzymu metabolizującego, który powoduje, że metabolizm leków u każdego pacjenta przebiega w sposób odmienny i specyficzny. Przeprowadzone w ramach rozprawy habilitacyjnej badania *in vitro* oraz *in vivo* nad metabolizmem wybranych leków zachodzących wobec enzymu metabolizującego obecnego w komórkach wątroby, a także implementacji elektrochemicznego reaktora do generowania metabolitów stwarzają podstawy do poznania możliwych kierunków przemian aktywacyjnych i/lub detoksykacyjnych jakim związki te ulegają *in vivo* w organizmie pacjenta, co stanowi nowość na skalę światową.

Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego

Wyniki badań przedstawione w monotematycznym cyklu publikacji **H1-H10** pozwalają na następujące podsumowanie mojego osiągnięcia naukowego:

(1) Podczas systematycznych i kompleksowych badań przy zastosowaniu centralnego planu kompozycyjnego (**CCD**) opracowałam parametry izolacji i wzbogacania leków należących do różnych grup terapeutycznych i ich metabolitów z próbek rzeczywistych (**mocz, krew, osocze, ślina, tkanka ukrwiona**). Oceeniłam różne sposoby oczyszczania ekstraktów z pozostałości przeszkadzających substancji egzo- i endogennych, a pochodzących z matryc biologicznych. Ponadto, określiłam przydatność i zakres zastosowania różnych technik przygotowania próbek. Na podstawie otrzymanych odzysków (**>95%**) oznaczanych związków wybrałam te, które pozwoliły na najbardziej efektywne przeprowadzenie procesu ekstrakcji oraz na jak najlepsze usunięcie wpływów matrycowych (**<15%**).

(2) Opracowałam i dobrałam warunki identyfikacji i oznaczania chromatograficznego badanych leków i ich metabolitów (około **100 związków**). Mając na uwadze zróżnicowane właściwości fizykochemiczne badanych analitów, wzięłam pod uwagę rodzaj fazy stacjonarnej, skład, natężenie przepływu oraz pH fazy ruchomej. Podczas badań prowadzonych z zastosowaniem **kilkunastu** kolumn chromatograficznych wybrałam w większości analiz kolumnę z wypełnieniem oktadecylosilanowym, której właściwości gwarantowały najlepszą selektywność, zachowując przy tym stosunkowo krótki czas analiz.

(3) Po raz pierwszy, podczas systematycznych i kompleksowych badań przy zastosowaniu centralnego planu kompozycyjnego (**CCD**), przeprowadziłam dobór warunków pracy spektrometru mas. Przy zastosowaniu połączenia chromatografu cieczowego z tandemowym spektrometrem mas oraz jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (**ESI-MS/MS**) dokonałam identyfikacji leków i ich potencjalnych metabolitów na podstawie dwóch wybranych jonów charakterystycznych dla każdego analitu. Użyłam trybu **MRM**, który pozwolił na oznaczenie i identyfikację wybranych związków w próbkach klinicznych na niskim poziomie stężeń, zapewniając przy tym wysoką selektywność.

(4) Po raz pierwszy opracowałam modele ilościowych zależności struktura-retencja (**QSRR**) na wybranych kolumnach chromatograficznych dla serii strukturalnie zróżnicowanych związków.

(5) Określiłam podatność badanych analitów na transformacje metaboliczne wobec enzymów obecnych we frakcji mikrosomalnej komórek ludzkiej i zwierzęcej wątroby. Przeprowadzone badania *in vitro* miały na celu poznanie potencjalnych ścieżek przemian jakim dany związek prawdopodobnie będzie ulegał w organizmie pacjenta. Tego typu podejście potencjalnie może przyczynić się do planowania terapii farmakologicznej z udziałem badanych leków ukierunkowanej na poszczególnych pacjentów (transfer i korelacja wyników z *in vitro* do *in vivo*).

(6) Dla potrzeb medycyny spersonalizowanej wykazałam możliwość zastosowania zwalidowanych procedur analitycznych w oznaczaniu i identyfikacji badanych leków i ich metabolitów z **różnych grup terapeutycznych** z próbek rzeczywistych. Uzyskane dane pomiarowe mogą stanowić źródło informacji odnośnie **parametrów farmakokinetycznych** oznaczanych leków.

(7) Po raz pierwszy opracowałam metodę przewidywania potencjalnego metabolizmu badanych związków za pomocą reaktora elektrochemicznego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas (**EC-MS/MS**). **Porównując uzyskane wyniki, stwierdziłam, iż zidentyfikowane produkty elektrochemiczne znajdują swoje odzwierciedlenie w potencjalnych metabolitach dla próbek enzymów frakcji mikrosomalnej oraz próbek rzeczywistych od pacjentów.**

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Zakończenie

Realizacja przeprowadzonych badań była możliwa dzięki przyznanym środkom finansowym, tj. grantowi MNiSW Iuventus Plus (IP2014 046673), w których pełniłam rolę kierownika i wykonawcy. Ponadto, przy pomocy realizowanych wówczas i obecnie projektów Narodowego Centrum Nauki Sonata (2016/23/D/ST4/00305) oraz Opus (2016/21/B/ST4/02130), w których pełnię funkcję kierownika i wykonawcy.

W latach 2015-2018 brałam także udział w badaniach z zakresu identyfikacji mikroorganizmów za pomocą sprzężonych technik separacyjnych, analizy związków biologicznie aktywnych w żywności, charakterystyki i oceny właściwości przeciwbakteryjnych nanocząstek srebra wytwarzanych przez promieniowce acidofilne czy zastosowaniu technik łączonych w badaniach metabolomicznych i poszukiwaniu wskaźników chorób nowotworowych.

W latach 2016-2018 regularnie uzyskiwałam nagrody zespołowe bądź wyróżnienia JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej. Ponadto, w 2015 roku zostałam wyróżniona trzyletnim Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców (na lata 2015-2018).

Szczegółowy wykaz całkowitego dorobku naukowego

Dane bibliometryczne:

- Całkowita liczba publikacji ze współczynnikiem IF: **35**
- Sumaryczny IF publikacji (wg roku wydania): **101,243**
- Sumaryczna liczba punktów wg klasyfikacji MNiSW: **963**
- Liczba cytowań (baza Web of Science): **512** (bez autocytowań)
- Indeks Hirscha: **15**

Literatura

- [1] **M. Szultka**, R. Kegler, P. Fuchs, P. Olszowy, W. Miekisch, J.K. Schubert, B. Buszewski, R.G. Mundkowsky, Polypyrrole solid phase microextraction: A new approach to rapid sample preparation for the monitoring of antibiotic drugs, *Anal. Chim. Acta* 667(1-2) (2010) 77-82.
- [2] P. Olszowy, **M. Szultka**, P. Fuchs, R. Kegler, R. Mundkowsky, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, New coated SPME fibers for extraction and fast HPLC determination of selected drugs in human blood, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53(4) (2010) 1022-1027.
- [3] B. Buszewski, P. Olszowy, T. Ligor, **M. Szultka**, J. Nowaczyk, M. Jaworski, M. Jackowski, Determination of adrenolytic drugs by SPME-LC-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 397(1) (2010) 173-179.
- [4] P. Olszowy, **M. Szultka**, T. Ligor, J. Nowaczyk, B. Buszewski, Fibers with polypyrrole and polythiophene phases for isolation and determination of adrenolytic drugs from human plasma by SPME-HPLC, *J. Chromatogr. B* 878(24) (2010) 2226-2243.
- [5] B. Buszewski, **M. Szultka**, P. Olszowy, S. Bocian, T. Ligor, A novel approach to the rapid determination of amoxicillin in human plasma by solid phase microextraction and liquid chromatography, *Analyst* 136(12) (2011) 2635-2642.
- [6] **M. Szultka**, J. Szeliga, M. Jackowski, B. Buszewski, Development of novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fibers and their application for the determination of antibiotic drugs in biological samples by SPME-LC/MSⁿ, *Anal. Bioanal. Chem.* 403(3) (2012) 785-796.
- [7] B. Buszewski, **M. Szultka**, Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 42(3) (2012) 198-213.

- [8] **M. Szultka**, R. Krzemiński, J. Szeliga, M. Jackowski, B. Buszewski, A new approach for antibiotic drugs determination in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1272 (2013) 41-49.
- [9] **M. Szultka**, R. Krzemiński, M. Jackowski, B. Buszewski, Simultaneous determination of selected chemotherapeutics in human whole blood by molecularly imprinted polymers coated solid phase microextraction fibers and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 940 (2013) 66-76.
- [10] **M. Szultka**, R. Krzemiński, J. Walczak, M. Jackowski, B. Buszewski, Pharmacokinetic study of amoxicillin in human plasma by solid Phase microextraction followed by high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *Biomedical Chromatography* 28 (2014) 255-264.
- [11] **M. Szultka**, R. Krzemiński, M. Jackowski, B. Buszewski, Identification of in vitro metabolites of amoxicillin in human liver microsomes by LC-ESI/MS, *Chromatographia* 77 (2014) 1027-1035.
- [12] **M. Szultka**, P. Pomastowski, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski, Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis, *J. Sep. Science* 37 (2014) 3094-3105.
- [13] H. Kataoka, New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 232-244.
- [14] L. Novakova, H. Vlckova, A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: chromatography and sample preparation, *Anal. Chem. Acta* 656 (2009) 8-35.
- [15] C.B. Lietz, E. Gemperline, L. Lingjun, Qualitative and quantitative mass spectrometry imaging of drugs and metabolites, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1074-1085.
- [16] W.B. Dunn, D.I. Ellis, Metabolomics: current analytical platforms and methodologies, *TrAC-Trend Anal. Chem.* 24 (2005) 285-294.
- [17] A. Rostami-Hodjegan, G.T. Tucker, Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 140-148.
- [18] V. Railean-Plugaru, P. Pomastowski, M. Wypij, **M. Szultka-Młyńska**, K. Rafińska, P. Golińska, H. Dahm, B. Buszewski, Study of silver nanoparticles synthesized by acidophilic strain of Actinobacteria isolated from the of *Picea sitchensis* forest soil, *J. Appl. Microbiol.* 120(5) (2016) 1250-1263.
- [19] A. Petruczynik, K. Wróblewski, **M. Szultka-Młyńska**, B. Buszewski, H. Karakuła-Juchnowicz, J. Gajewski, J. Moryłowska-Topolska, M. Waksmundzka-Hajnos, Determination of venlafaxine, vilazodone and their main active metabolites in human serum by HPLC-DAD and HPLC-MS, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 74(3) (2017) 765-775.
- [20] B. Buszewski, V. Railean-Plugaru, P. Pomastowski, K. Rafińska, **M. Szultka-Młyńska**, T. Kowalkowski, Antimicrobial effectiveness of bioactive silver nanoparticles synthesized by Actinomycetes HGG16n strain, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 18(2) (2017) 168-176.
- [21] L. Rivoira, S. Studzińska, **M. Szultka-Młyńska**, M.C. Bruzzoniti, B. Buszewski, New approaches for extraction and determination of betaine from *Beta vulgaris* samples by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 409(21) (2017) 5133-5141.
- [22] K. Wróblewski, A. Petruczynik, B. Buszewski, **M. Szultka-Młyńska**, H. Karakuła-Juchnowicz, M. Waksmundzka-Hajnos, Determination of vortioxetine in human serum and saliva samples by HPLC-DAD and HPLC-MS, *Acta Chromatogr.* 29(3) (2017) 325-344.
- [23] B. Buszewski, V. Railean-Plugaru, P. Pomastowski, K. Rafińska, **M. Szultka-Młyńska**, P. Golinska, M. Wypij, D. Laskowski, H. Dahm, Antimicrobial activity of biosilver nanoparticles produced by a novel *Streptacidiphilus durhamensis* strain, *J. Microb. Immunol. Infect.* 51(1) (2018) 45-54.

- [24] A. Rogowska, P. Pomastowski, M. Złoch, V. Railean-Plugaru, A. Król, K. Rafińska, **M. Szultka-Młyńska**, B. Buszewski, The influence of different pH on the electrophoretic behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* modified by calcium ions, *Scientific Reports* 8(1) (2018) Art. No. 7261 DOI: 10.1038/s41598-018-25024-4.
- [25] J.B. Houston, Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance., *Biochem Pharmacol.* 47 (1994) 1469-1479.
- [26] G.T. Tucker, J.B. Houston, S.M. Huang, Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential toward a consensus, *Clin. Pharmacol. Ther.* 70 (2001) 103-114.
- [27] L.C. Wienkers, T.G. Heath, Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov.* 4 (2005) 825-833.
- [28] J. Sahi, S. Grepper, C. Smith, Hepatocytes as a tool in drug metabolism, transport, and safety evaluations in drug discovery, *Curr. Drug Discov. Technol.* 7 (2010) 188-198.
- [29] R.S. Obach, J.G. Baxter, T.E. Liston, B.M. Silber, B.C. Jones, F. Macintyre, The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283 (1997) 46-58.
- [30] M. Ingelman-Sundberg, M. Oscarson, R.A. McLellan, Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment, *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999) 342-349.
- [31] S. Cholerton, A.K. Daly, J.R. Idle, The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response, *Trends Pharmacol. Sci.* 13 (1992) 434-439.
- [32] A. Bugrim, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, Early prediction of drug metabolism and toxicity: systems biology approach and modeling, *DDT* 9 (2004) 127-135.
- [33] W.M. Mullett, Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 263-273.
- [34] **M. Szultka**, B. Buszewski, K. Papaj, W. Szeja, A. Rusin, Determination of flavonoids and their metabolites by chromatographic techniques, *Trends Anal. Chem.* 47 (2013) 47-67.
- [35] R.N. Xu, L. Fan, M.J. Rieser, T.A. El-Shourbagy, Recent advances in highthroughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 342-355.
- [36] J.J.A. van Kampen, P.C. Burgers, R. Groot, T.M. Luiders, Qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical compounds by MALDI-TOF mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5403-5411.
- [37] L.H. Cohen, A.I. Gusev, Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 571-586.
- [38] A. Wieser, L. Schneider, J. Jung, S. Schubert, MALDI- TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganism and beyond (mini review), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 965-974.
- [39] **[H1] M. Szultka-Młyńska**, P. Pomastowski, B. Buszewski, Application of solid phase microextraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry in the determination of antibiotic drugs and their metabolites in human whole blood and tissue samples, *J. Chromatogr. B* 1086 (2018) 153-165.
- [40] **[H2] M. Szultka-Młyńska**, S. Bajkacz, I. Baranowska, B. Buszewski, Structural characterization of electrochemically and in vivo generated potential metabolites of selected cardiovascular drugs by EC-UHPLC/ESI-MS using an experimental design approach, *Talanta* 176 (2018) 262-276.
- [41] **[H3] M. Szultka-Młyńska**, S. Bajkacz, M. Kaca, I. Baranowska, B. Buszewski, Electrochemical simulation of three novel cardiovascular drugs phase I metabolism and development of a new method for determination of them by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.*, 1093-1094 (2018) 100-112.

- [42] [H4] **M. Szultka-Młyńska**, B. Buszewski, Electrochemistry-mass spectrometry for in-vitro determination of selected chemotherapeutics and their electrochemical products in comparison to in-vivo approach, *Talanta* 160 (2016) 694-703.
- [43] [H5] E. Wierzbicka, **M. Szultka-Młyńska**, B. Buszewski, G. Sulka, Epinephrine sensing at nanostructured Au electrode and determination its oxidative metabolism, *Sens. Actuators B* 237 (2016) 206-215.
- [44] [H6] A. Petruczynik, K. Wróblewski, **M. Szultka-Młyńska**, B. Buszewski, H. Karakuła-Juchnowicz, J. Gajewski, J. Moryłowska-Topolska, M. Waksmundzka-Hajnos, Determination of some psychotropic drugs in serum and saliva samples by HPLC-DAD and HPLC MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127 (2016) 68-80.
- [45] [H7] **M. Szultka-Młyńska**, B. Buszewski, Chromatographic behavior of selected antibiotic drugs supported by quantitative structure-retention relationships, *J. Chromatogr. A* 1478 (2016) 50-59.
- [46] [H8] **M. Szultka-Młyńska**, P. Olszowy, B. Buszewski, Nanoporous conducting polymer-based coatings in microextraction techniques for environmental and biomedical applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 46 (2016) 236-247.
- [47] [H9] **M. Szultka-Młyńska**, B. Buszewski, Study of in-vitro metabolism of selected antibiotic drugs in human liver microsomes by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 8273-8287.
- [48] [H10] P. Pomastowski, **M. Szultka-Młyńska**, W. Kupczyk, M. Jackowski, B. Buszewski, Evaluation of Intact Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Capillary Electrophoresis Detection of Controlled Bacterial Clumping, *OMICS, J. Anal. Bioanal. Tech.*, S13 (2015) 1-7.
- [49] Y.V. Kazakevich, High-performance liquid chromatography retention mechanisms and their mathematical descriptions, *J. Chromatogr. A*, 1126, 2006, 232-243.
- [50] S. Bocian, A. Felinger, B. Buszewski, Comparison of solvent adsorption on chemically bonded stationary phases in RP-LC, *Chromatogr.*, 68, 2008, 19-26.
- [51] S. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, B. Buszewski, Effect of end-capping and surface coverage on the mechanism of solvent adsorption, *Chromatogr.*, 71, 2010, 5-11.
- [52] D.V. McCalley, Influence of organic solvent modifier and solvent strength on peak shape of some basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column, *J. Chromatogr. A*, 708, 1995, 185-194.
- [53] D.V. McCalley, Effect of organic solvent modifier and nature of solute on the performance of bonded silica reversed-phase columns for the analysis of strongly basic compounds by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 38, 1996, 169-179.
- [54] J.J. Kirkland, M.A. Van Straten, H.A. Claessens, High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns, *J. Chromatogr. A*, 691, 1995, 3-19.
- [55] C. Pidgeon, U.V. Venkatarum, Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids, *Anal. Biochem.*, 16, 1989, 36-47.
- [56] C. Pidgeon, S. Ong, H. Liu, X. Qiu, M. Pidgeon, A.H. Dantzig, J. Munroe, W.J. Hornback, J.S. Kasher, L. Glunz, T. Szczerba, , IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability, *J. Med. Chem.*, 38, 1995, 590-594.
- [57] R. Mannhold, *Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction*, Wiley/VCH, Weinheim, 2008.
- [58] S. Jahn, U. Karst, Electrochemistry coupled to (liquid chromatography/) mass spectrometry – Current state and future perspectives, *J. Chromatogr. A*, 1259, 2012, 16-49.

Załącznik numer 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

- [59] M. Lu, Ch. Wolff, W. Cui, H. Chen, Investigation of some biologically relevant redox reactions using electrochemical mass spectrometry interfaced by desorption electrospray ionization, *Anal. Bioanal. Tech.*, 403, 2012, 355-365.
- [60] W. Lohmann, A. Baumann U. Karst, Electrochemistry and LC-MS for metabolite generation and identification: tools, technologies and trends, *LC GC Europe*, 23, 2010, 8-16.
- [61] H. Faber, M. Vogel, U. Karst, Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies - A review, *Anal. Chim. Acta*, 834, 2014, 9-21.
- [62] H. Oberacher, F. Pitterl, J.P. Chervet , 'Omics' Applications of electrochemistry coupled to mass spectrometry — A Review, *LC-GC Europe*, 28, 2015, 138-150.
- [63] L.C. Wienkers, T.G. Heath, Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4, 2005, 825-833.
- [64] S. Kanamura, J. Watanabe, Cell biology of cytochrome P-450 in the liver, *Inter. Rev. Cyt.*, 198, 2000, 109-152.
- [65] R.C. Zangar, D.R. Davydov, S. Verma, Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450, *Toxicol. App. Pharm.*, 199, 2004, 316-331.
- [66] M. Ingelman-Sunberg, The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research, *Toxicol. App. Pharm.*, 207, 2005, 52-56.
- [67] M.B. Fisher, M.F. Paine, T.J. Strelevitz, S.A. Wrighton, The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism, *Drug. Metab. Rev.*, 33, 2001, 273-29.
- [68] J.D. McCarter, S.G. Withers, Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 1994, 885-892.
- [69] F.P. Guengerich, Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity, *AAPS J.*, 8, 2006, 101-111.
- [70] P. Artursson, K. Palm, K. Luthman, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46, 2001, 2-43.

Margarete Sultke-Mijiskic