



PODPIS ZAUFANY

KAMILA JOLANTA

BOROWCZYK

15.12.2023 12:30:34 (GMT+1)

Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii...  
ul. Tamka 12, 91-403 Łódź  
tel: 42/635 57 44, 42/635 57 43  
fax: 42/635 57 44

(nazwa i dane adresowe podmiotu habilitującego,  
wybranego do przeprowadzenia postępowania)

za pośrednictwem:

**Rady Doskonałości Naukowej**

pl. Defilad 1

00-901 Warszawa

(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

.....Kamila Borowczyk.....  
(imię i nazwisko wnioskodawcy)

Katedra Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki  
(miejsce pracy/jednostka naukowa)

## Wniosek

z dnia ...13.12.2023.....

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie<sup>1</sup> nauki chemiczne.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

*Upraszczenie procedur analitycznych dedykowanych chromatograficznemu oznaczaniu  
wybranych, biologicznie ważnych związków siarki*

Wniosuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym**\*<sup>2</sup>.

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: [kancelaria@rdn.gov.pl](mailto:kancelaria@rdn.gov.pl), tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art.

232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie [www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html](http://www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html)

.....Kamila Borowczyk.....  
(podpis wnioskodawcy)

<sup>1</sup> Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

<sup>2</sup> \* Niepotrzebne skreślić.

Załączniki:

- Z1a Wniosek przewodni – dokument UŁ
- Z2 Dane wnioskodawcy
- Z3 Kopia dyplomu potwierdzającego posiadanie stopnia doktora
- Z4 Autoreferat
- Z5 Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych
- Z6 Kwestionariusz osobowy - dokument UŁ
- Z7 Oświadczenia współautorów



PODPIS ZAUFANY

KAMILA JOLANTA  
BOROWCZYK

15.12.2023 12:45:03 [GMT+1]  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym



WYDZIAŁ  
CHEMII

Uniwersytet Łódzki



# Autoreferat

## do wniosku habilitacyjnego

(załącznik Z4)

Upraszczenie procedur analitycznych dedykowanych  
chromatograficznemu oznaczaniu wybranych, biologicznie ważnych  
związków siarki

**dr Kamila Borowczyk**

Łódź 2023

## Spis treści

<b>1. Dane personalne.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu .....</b>	<b>3</b>
3.1. Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora .....	4
3.2. Przebieg pracy po uzyskaniu stopnia doktora .....	5
<b>4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....</b>	<b>9</b>
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:.....	9
4.3. Parametry naukometyczne .....	11
4.4. Spis skrótów i symboli.....	12
4.5. Wprowadzenie .....	13
4.6. Cel badań obejmujących cykl habilitacyjny .....	15
4.7. Merytoryczne ujęcie przedmiotowych osiągnięć w cyklu publikacji.....	16
4.8. Indywidualny wkład w powstanie prac H1–H10 .....	57
<b>5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. ....</b>	<b>60</b>
5.1. Lista staży naukowych i efekty aktywności realizowanej w innych ośrodkach badawczych .....	60
5.2. Lista publikacji z afiliacją uczelni macierzystej i dodatkową afiliacją uczelni zagranicznej .....	61
<b>6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....</b>	<b>62</b>
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne .....	62
6.2. Osiągnięcia organizacyjne .....	64
<b>7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej. ....</b>	<b>65</b>
7.1. Wyróżnienia i nagrody.....	65
7.2. Recenzje prac i wniosków badawczych .....	66

---

### **1. Dane personalne**

dr Kamila Jolanta Borowczyk

### **2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe**

2014 – dyplom ukończenia 2-semestralnych studiów podyplomowych w zakresie  
Komerccjalizacja nauki i technologii,  
Wydział Zarządzania, Uniwersytet Łódzki i University of Texas at Austin

2012 – doktor nauk chemicznych w dyscyplinie: chemia  
Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

Tytuł rozprawy doktorskiej:

*„Homocysteina jako składnik białek człowieka i innych ssaków, badania chromatograficzne”*

*(Homocysteine as a component of humans and other mammals proteins; chromatographic studies)*

Promotor: prof. dr hab. Rafał Głowacki

Współpromotor: prof. dr hab. Hieronim Jakubowski

2008 – magister chemii, specjalność: chemia analityczna,  
Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

Tytuł pracy dyplomowej:

*„Zastosowanie postkolumnowej reakcji jodo-azydkowej do oznaczania wybranych tyreostatyków i cytostatyków w moczu za pomocą HPLC”*

*(Application of postcolumn iode-azide reaction for some thyreostatics and cytostatic determination in urine with HPLC)*

Promotor: dr hab. Robert Zakrzewski, prof. UŁ

### **3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu**

12.2022 – nadal – adiunkt w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych, Katedra  
Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki,

12.2021 – 12.2022 – urlop macierzyński

10.2012 – 12.2021 – adiunkt w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych, Katedra  
Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki,

09.2011 – 09.2012 – asystent w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych, Katedra  
Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki.

---

**3.1. Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora**

Studia magisterskie na kierunku Chemia na Wydziale Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego rozpoczęłam w roku 2003. Pracę dyplomową zatytułowaną „Zastosowanie postkolumnowej reakcji jodo-azydkowej do oznaczania wybranych tyreostatyków i cytostatyków w moczu za pomocą HPLC” przygotowałam w Zakładzie Analizy Instrumentalnej pod kierunkiem dr. hab. Roberta Zakrzewskiego, prof. UŁ i obroniłam 26.06.2008 r. W czerwcu 2008 roku ukończyłam z wyróżnieniem studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, uzyskując tytuł magistra chemii w specjalności chemia analityczna oraz wyróżnienie Medalem za Chlubne Studia. Praca magisterska dotyczyła opracowania metody oznaczenia 6-merkaptopuryny, leku stosowanego w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej, i jej metabolitów w próbkach moczu człowieka. Wyniki opisane w mojej pracy magisterskiej ukazały się drukiem w formie publikacji naukowej [P5].

W 2008 roku rozpoczęłam Studia Doktoranckie w Katedrze Chemii Środowiska, Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego (UŁ) pod opieką prof. dr. hab. Edwarda Balda. Tematyka badań realizowanych w ramach mojej rozprawy doktorskiej obejmowała: (i) ocenę zawartości homocysteiny (Hcy) w tkankach miękkich i twardych ssaków, (ii) wyjaśnienie mechanizmów chroniących organizm ssaków przed wbudowaniem cząsteczek Hcy w strukturę łańcuchów białkowych i (iii) określenie wpływu tego procesu na właściwości białek ssaków. Do oceny toksycznego działania Hcy i jej metabolitu - tiolaktonu homocysteiny – wykorzystywałam wysokosprawną chromatografię cieczową. Badania prowadziłam na materiale biologicznym takim jak: osocze, mocz, sierści, tkanki mózgu, nerek, wątroby i śledziony pozyskanych od myszy, typu dzikiego – *wild type* (WT) i myszy z deficytem enzymu hydrolaza bleomycyny *knockout* (BLH *-/-*) lub enzymu poraoksonaza 1 *knockout* (PON 1 *-/-*), podstawa genetyczna C57BL/6J, pochodzących z Purina Mills International, St. Loius, MO.

Opisane w mojej pracy doktorskiej eksperymenty przeprowadzone na myszach *knockout* BLH *-/-*, PON 1 *-/-* i dzikich WT stanowiły pierwszy bezpośredni dowód świadczący o toksycznym działaniu tiolaktonu-Hcy *in vivo* w patologiach związanych z hiperhomocysteinemią. Uzyskane wyniki potwierdziły, że enzymy BLH i PON 1 uczestniczą w metabolizmie tiolaktonu-Hcy i jednocześnie chronią organizm myszy przed negatywnymi konsekwencjami N-homocysteinylacji białek. Udowodniłam, że enzym

---

BLH pomimo właściwości aminopeptydazowych nie posiada zdolności degradacji białek modyfikowanych przez Hcy, tzw. N-homocysteinylowanych białek. W badaniach chromatograficznych stanowiących część pracy doktorskiej wykazałam, że Hcy jest składnikiem keratyn włosów i sierści ssaków, oraz udowodniłam, że poziom Hcy w białku włosa zależy od jego wieku i wpływa na pogorszenie zdolności rozpuszczania keratyn.

Badania z udziałem myszy zrealizowałam w trakcie 16-miesięcznego stażu naukowego w Department of Microbiology and Molecular Genetics, International Center for Public Health, UMDNJ – New Jersey Medical School, NJ, USA pod opieką prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego. Uzyskane w trakcie realizacji doktoratu wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, w tym w JAD i Amino Acids [P3, P4].

W trakcie studiów doktoranckich byłam stypendystką projektu „Stypendia wspierające innowacyjne badania naukowe doktorantów”, realizowanego w roku 2009, oraz kierownikiem grantu przyznanego w roku 2011 przez Narodowe Centrum Nauki w konkursie Preludium (grant nr 2011/01/N/ST4/01834). Rozprawę doktorską zatytułowaną „*Homocysteina jako składnik białek człowieka i innych ssaków, badania chromatograficzne*” przygotowaną pod kierunkiem prof. dr. hab. Rafała Głowackiego i prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego obroniłam z wyróżnieniem w lipcu 2012, uzyskując tytuł doktora nauk chemicznych w dziedzinie chemia.

### **3.2.Przebieg pracy po uzyskaniu stopnia doktora**

Od września 2012 do dnia dzisiejszego jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych w Katedrze Chemii Środowiska zlokalizowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.

Moja działalność naukowa dotyczy opracowywania nowych narzędzi analitycznych wykorzystujących technikę HPLC z detekcją UV lub FL, w szczególności w kontekście:

1. upraszczania procedur przygotowania próbek biologicznych ciekłych i stałych do analizy chromatograficznej poprzez zmniejszenie liczby kolejnych etapów,
2. redukcji ilości materiałów zużywalnych, takich jak polipropylenowe próbówki, czy końcówki do pipet automatycznych, stosowanych na etapie przygotowania i analizy próbek biologicznych,

3. ograniczania ilości odczynników wykorzystywanych w procesie rozdzielania chromatograficznego,
4. minimalizowania kosztów analiz dedykowanych oznaczeniom biologicznie ważnych związków siarki, takich jak: albumina, cysteina, cysteinyloglicyna, N-acetylocysteina, glutation, homocysteina, metionina i kwas  $\alpha$ -liponowy.

Podjęmowaną tematykę realizowałam m.in. w oparciu o 12 grantów badawczych, finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, jak i przez Uniwersytet Łódzki, w których to projektach pełniłam funkcję kierownika (7) lub wykonawcy (5). Zasadniczą część badań była finansowana z projektów, w których pełniłam funkcję kierownika. Były to: grant SONATA nr 2013/09/D/ST5/03909 zatytułowany „*N-homocysteinyłacja jako czynnik uszkodzania struktury i funkcji keratyn – potencjalny związek ze starzeniem*”, przyznany przez Narodowe Centrum Nauki na lata 2014-2017 oraz wewnątrzuniwersytecki (UŁ) grant IDUB nr 8/IDUB/DOS/2021 „*Identyfikacja i oznaczanie N $\epsilon$ -homocysteinyłolizyny - produktu enzymatycznego rozkładu N-homocysteinyłowanych białek w osoczu myszy z deficytem hydrolazy bleomycyny*” oraz granty przyznane na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w ramach dofinansowania prac badawczych młodych naukowców, w tym: grant nr 545/336 „*1,3-tiazynowe produkty reakcji witaminy B6 i tiolaktonu homocysteiny jako potencjalne markery chorób układu krążenia*”, przyznany na rok 2012; grant nr B131110000039.02 „*Tiazolidynowe pochodne fosforanu 5'-pirydoksalu jako potencjalne markery chorób*”, przyznany w roku 2013; grant nr B1411100000470.02 „*Zastosowanie technik separacji w fazie ciekłej do badania związków aktywnych biologicznie*”, przyznany w roku 2014 i grant nr B1711100001599.02 „*Zastosowanie technik separacyjnych w oznaczaniu biologicznie aktywnych związków w preparatach farmaceutycznych i próbkach biologicznych*”, realizowany w roku 2017.

Doświadczenie w oznaczaniu biologicznie ważnych tioli z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej zaowocowało udziałem, w charakterze wykonawcy, w innych projektach badawczych finansowanych ze źródeł Narodowego Centrum Nauki. Były to: grant OPUS nr 2012/07/B/NZ7/01178 „*Determinanty tiolaktonu homocysteiny u człowieka*”, grant OPUS nr 2013/09/B/NZ5/02794 „*Rola homocysteiny w patogenezie zakrzepicy*”, grant OPUS nr 2013/11/B/NZ1/00091 „*Mechanizmy i konsekwencje inkorporacji homocysteiny do białek u ludzi*”, grant OPUS nr 2016/23/B/NZ5/00573

---



„Odpowiedź autoimmunologiczna i liza skrzepów fibrynowych w chorobach sercowo-naczyniowych”, grant OPUS nr 2017/27/B/ST4/01476 „Stworzenie chromatograficznych narzędzi do badania tiazolidynowych pochodnych witaminy B6”.

Ponadto byłam:

- stypendystką programu „Top 500 Innovators – Science, Management, Commercialization” ogłoszonego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w 2015 roku,
- stypendystką programu im. Bekkera ogłoszonego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej w roku 2018,
- laureatką nagrody InnoTechAkademia II BioTechScience – droga do własnych marzeń przyznanej w roku 2013 przez Centrum Transferu Technologii Uniwersytetu Łódzkiego oraz Centrum Innowacji i Transferu Technologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za projekt zatytułowany „Innowacyjna, szybka i tania metoda oznaczania związków tiolowych w próbkach biologicznych”, a także
- laureatką „Nagrody za wybitne osiągnięcia przyczyniające się do rozwoju nauki dla młodych uczonych pracujących na terenie województwa łódzkiego za rok 2019” – nagroda indywidualna przyznana przez Polską Akademię Nauk, Oddział w Łodzi.

W okresie zatrudnienia w Uniwersytecie Łódzkim współpracowałam z ośrodkami badawczymi, zarówno krajowymi jak i zagranicznymi. Uczestniczyłam także w trzech kilkumiesięcznych wyjazdach naukowych do zagranicznych instytucji badawczych, takich jak: Stanford University, Kalifornia, USA (wrzesień – listopad 2015), Rutgers University, Medical School, New Jersey, USA (lipiec - październik 2018 oraz lipiec - październik 2019), podczas których rozwijałam i poszerzałam wiedzę dotyczącą zastosowania technik separacyjnych w badaniach udziału hydrolazy bleomycyny w powstawaniu deficytów neurologicznych u myszy.

Mój dorobek naukowy zgromadzony po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje: 27 publikacji naukowych w czasopismach z listy filadelfijskiej; 2 publikacje w czasopismach popularno-naukowych, 3 zgłoszenia patentowe, kierowanie 1 projektem badawczym finansowanymi przez Narodowe Centrum Nauki i 5 projektami badawczymi finansowanymi przez Uniwersytet Łódzki, udział w realizowaniu 5 projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Wyniki uzyskane w trakcie prowadzonych badań przedstawione zostały także w formie 37 komunikatów lub posterów

---

prezentowanych na międzynarodowych konferencjach naukowych, 30 komunikatów lub posterów prezentowanych na krajowych konferencjach naukowych oraz w formie 4 wykładów na zaproszenie.

Drugim obszarem mojej aktywności jako nauczyciela akademickiego była praca dydaktyczna. Pracując w Katedrze Chemii Środowiska prowadziłam zajęcia laboratoryjne dla Studentów kierunku Ochrona Środowiska. Uczestniczyłam ponadto w tworzeniu programu studiów oraz prowadzę zajęcia wykładowe, seminaryjne i laboratoryjne na kierunku Analityka Chemiczna. Pełniłam funkcję kierownika prac licencjackich oraz opiekuna lub kierownika prac magisterskich realizowanych przez Studentów tego kierunku. W latach 2018-2023 pełniłam funkcję promotora pomocniczego przewodu doktorskiego dr Patrycji Olejarz. Brałam także czynny udział w projekcie Akademia Ciekawej Chemii, realizowanym na Wydziale Chemii UŁ, przedstawiając popularno-naukowe wykłady dotyczące technik separacyjnych. Część dydaktyczna mojej pracy obejmuje realizowanie wykładów i ćwiczeń związanych z tematyką pobierania i przygotowania próbek biologicznych do analizy technikami separacyjnymi, takimi jak wysokosprawna chromatografia cieczowa i elektroforeza żelowa.

**Informacje naukometryczne o wszystkich publikacjach**

Sumaryczny IF publikacji (zgodnie z rokiem opublikowania)	129,152
Sumaryczny IF publikacji na podstawie listy z roku 2022	147,734
Suma punktów MNiE (wg wykazu z 2023 r.)	3040
Sumaryczna liczba cytowań	467
Liczba publikacji, w których wnioskodawca jest pierwszym autorem	9
Liczba publikacji, w których wnioskodawca jest autorem korespondencyjnym	7
H - index	13

---

**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl (**H1–H10**) powiązanych tematycznie artykułów zatytułowany:

**Upraszczenie procedur analitycznych dedykowanych chromatograficznemu oznaczaniu wybranych, biologicznie ważnych związków siarki**

Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zgodnie z *Regulaminem określającym szczegółowy tryb postępowania w sprawie nadania stopnia doktora i doktora habilitowanego w Uniwersytecie Łódzkim* (Załącznik do uchwały nr 660 Senatu UŁ z dnia 27 stycznia 2020 r.) zostały umieszczone w Załączniku 7.

**4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

*Współczynniki IF zostały podane zgodnie z rokiem opublikowania artykułów; współczynnik oddziaływania IF podano również za rok 2022; punkty MEiN podano wg wykazu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 18 lipiec 2023r.; cytowania podane wg bazy Scopus z dn. 06.10.2023*

*Cykl publikacji przedstawiłam w sposób chronologiczny*

**H1 Borowczyk, K.,** Wyszczelska-Rokiel, M., Kubalczyk, P., Głowacki, R.,  
*Simultaneous determination of albumin and low-molecular-mass thiols in plasma by HPLC with UV detection*  
**Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 57 (2015) 981.

IF<sub>2015</sub> = 2,687

IF<sub>2022</sub> = 3,000

MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt.

Liczba cytowań: 28

**H2 Borowczyk K.,** Krawczyk M., Kubalczyk P., Chwatko G.,  
*Determination of lipoic acid in biological samples*  
**Bioanalysis**, 7 (2015) 1785.

IF<sub>2015</sub> = 2,813

IF<sub>2022</sub> = 1,800;

MEiN<sub>2023</sub> = 70 pkt.

Liczba cytowań: 13

- 
- H3 **Borowczyk K.\***, Chwatko G., Kubalczyk P., Jakubowski H., Kubalska J., Głowacki R.  
*Simultaneous determination of methionine and homocysteine by on-column derivatization with o-phthaldialdehyde*  
**Talanta**, 161 (2016) 917-924.  
IF<sub>2016</sub> = 4,162  
IF<sub>2022</sub> = 6,1; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 24
- H4 Kamińska A., Olejarz P., **Borowczyk K.**, Głowacki R., Chwatko G.  
*Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC*  
**Journal of Separation Science**, 41 (2018) 3241–3249.  
IF<sub>2018</sub>=2,516;  
IF<sub>2022</sub> = 3,100; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. Liczba cytowań: 45
- H5 **Borowczyk K.**, Suliburska J., Jakubowski H.  
*Demethylation of methionine and keratin damage in human hair*  
**Amino Acids**, 50 (2018) 537-546.  
IF<sub>2018</sub>=2,520;  
IF<sub>2022</sub> = 3,500; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. Liczba cytowań: 10
- H6 **Borowczyk K.**, Wróblewski J., Suliburska J., Akahoshi N., Ishii I., Jakubowski H.,  
*Mutations in homocysteine metabolism genes increase keratin N-Homocysteinylation and damage in mice*,  
**International Journal of Genomics**, Article ID 7570850, 7 pages (2018).  
IF<sub>2018</sub>=2,303;  
IF<sub>2022</sub> = 2,900; MEiN<sub>2023</sub> = 70 pkt. Liczba cytowań: 4
- H7 **Borowczyk K.\***, Olejarz P., Chwatko G.  
*Application of simultaneous separation and derivatization for the determination of α-lipoic acid in urine samples by high-performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection*  
**Biomedical Chromatography**, 2019 ,e4576, 10 pages.  
IF<sub>2019</sub>=1,728;  
IF<sub>2022</sub> = 1,800; MEiN<sub>2023</sub> = 40 pkt. Liczba cytowań: 3
- H8 **Borowczyk K.\***, Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., Chwatko G.,  
*Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples*  
**International Journal of Molecular Sciences**, 20 (13) 3340 (2019).  
IF<sub>2019</sub>=4,556;  
IF<sub>2022</sub> = 5,600; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 2
-

- H9 **Borowczyk, K.\***, Olejarz, P., Chwatko, G., Szyłberg, M., Głowacki, R.  
*A simplified method for simultaneous determination of  $\alpha$ -lipoic acid and low-molecular-mass thiols in human plasma*  
**International Journal of Molecular Sciences**, 21(3),1049 (2020).  
IF<sub>2020</sub>=5,924;  
IF<sub>2022</sub> = 5,600; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 10
- H10 **Borowczyk, K.\***, Głowacki, R.  
*The influence of UV varnishes on the content of cysteine and methionine in women nail plates - chromatographic studies*  
**International Journal of Molecular Sciences**, 21(3),1049 (2021).  
IF<sub>2021</sub>=6,208;  
IF<sub>2022</sub> = 5,600; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 1

### 4.3. Parametry naukometryczne

#### Informacje naukometryczne o cyklu publikacji H1–H10

Sumaryczny IF publikacji (zgodnie z rokiem opublikowania)	35,417
Sumaryczny IF publikacji na podstawie listy z roku 2022	39,000
Suma punktów MNiE (wg wykazu z 2023 r.)	1040 pkt
Sumaryczna liczba cytowań prac z cyklu publikacji H1-H10	140
Liczba publikacji, w których wnioskodawca jest pierwszym autorem	9
Liczba publikacji, w których wnioskodawca jest autorem korespondencyjnym	5

**4.4. Spis skrótów i symboli**

B-NH <sub>2</sub>	– butyloamina
BCPB	– bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy
CMQT	– tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy
Cys	– cysteina
Cys-Gly	– cysteinyloglicyna
detekcja FL	– detekcja spektrofotometryczna
DHLA	– kwas dihydroliponowy
DTT	– ditiotreitol
FDA	– U.S. Food and Drug Administration
GSH	– glutation
Hcy	– homocysteina
HHcy	– hiperhomocysteinemia
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSA	– albumina
LA	– kwas $\alpha$ -liponowy
MeCN	– acetonitryl
Met	– metionina
NAC	– N-acetylocysteina
OPA	– aldehyd <i>o</i> -ftalowy
PB	– bufor fosforanowy
PCA	– kwas chlorowy(VII)
TCA	– kwas trichlorooctowy
TCEP	– <i>tris</i> (2-karboksyetylo)fosfina

#### **4.5. Wprowadzenie**

W chemii analitycznej coraz większą uwagę zwraca się na rozwijanie metod charakteryzujących się prostotą wykonania, jak najniższą czasochłonnością i kosztochłonnością oraz jak najmniejszą ilością zużywanych odczynników. Zasady te są zgodne z wytycznymi tzw. „zielonej chemii”. W nurt ten wpisują się metody oparte na technikach separacyjnych, pośród których wiodącą rolę pełni wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Aktualne trendy w analizie próbek biologicznych zmierzają w kierunku udoskonalania procedur ich przygotowania do analizy, redukcji ilości odpadów laboratoryjnych wytwarzanych na etapie przygotowania próbek, minimalizowania ilości materiału potrzebnego do badań oraz skracania całkowitego czasu trwania procesu analitycznego. W przypadku oznaczania niskocząsteczkowych związków tiolowych najczęściej wykorzystuje się 3-etapową procedurę obejmującą redukcję wiązań disiarczkowych, derywatyzację z wykorzystaniem uwolnionych grup tiolowych oraz usunięcie białek obecnych w próbce. Głównym celem działań opisanych w załączonym cyklu publikacji (H1-H10) było **opracowanie uproszczonych procedur analitycznych dedykowanych chromatograficznemu oznaczeniu ważnych fizjologicznie związków siarki w próbkach biologicznych.**

Do fizjologicznie ważnych związków siarki zaliczane są m.in.: albumina (HSA),  $\alpha$ -kwas liponowy (LA), cysteina (Cys), cysteinylglicyna (Cys-Gly), glutation (GSH), homocysteina (Hcy), metionina (Met) i N-acetylocysteina (NAC). Struktury chemiczne niskocząsteczkowych związków siarki przedstawiłam na rysunku 2. Związki takie jak Cys, GSH, LA, czy NAC mogą być stosowane jako czynniki terapeutyczne w chorobach cywilizacyjnych, do których zaliczane są cukrzyca, choroby układu krążenia i nowotwory. Z drugiej strony podwyższone stężenie Hcy może powodować problemy zdrowotne i jest wskazywane jako niezależny czynnik ryzyka chorób układu krążenia i przyspieszonej miażdżycy. Z tych powodów dokładne oznaczanie w/w związków w organizmie człowieka jest niezbędne do zrozumienia ich roli w regulowaniu funkcji życiowych i ocenie ich powiązania z rozwojem procesów chorobowych.

Wśród technik separacyjnych HPLC stanowi kluczowe narzędzie w ocenie zawartości biologicznie ważnych związków siarki w tkankach i płynach ssaków. Coraz częściej jednak procedury analityczne wykorzystujące tę technikę podlegają weryfikacji w kontekście wymagań tzw. „zielonej chemii”. Wychodząc naprzeciw stawianym

oczekiwaniom środowiskowym i ekonomicznym wprowadzane są nowe rozwiązania zarówno na etapie chromatograficznego rozdzielania składników próbki, jak i w procesie jej przygotowania do analizy. W analizach chromatograficznych dąży się do zmniejszania ilości zużywanych toksycznych rozpuszczalników organicznych, tworzenia nowych wypełnień kolumn umożliwiających wykorzystanie jako fazy ruchomej wody bez modyfikatora organicznego, czy stosowania etanolu jako zamiennika toksycznych rozpuszczalników. W procedurach przygotowania próbki uwagę kieruję się z kolei na miniaturyzację, redukcję liczby poszczególnych etapów oraz działania, które umożliwiają oznaczenie większej liczby analitów w jednej analizie, tzw. analizy wieloskładnikowe. Ważnym aspektem jest także dążenie do zmniejszania ilości odpadów laboratoryjnych, w tym polipropylenowych materiałów jednorazowego użytku.

Przygotowanie próbek biologicznych takich jak osocze, mocz, tkanki miękkie i twarde, w tym tkanki mózgu i paznokci lub włosów, przeznaczonych do analizy chromatograficznej dedykowanej oznaczaniu HSA, LA, Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, Met i NAC, przysparza wielu trudności. Kluczowe problemy wynikają z:

- niestabilności i niskiego stężenia analitów występujących endogennie i/lub egzogennie,
- zróżnicowania stanu skupienia próbki, zmienności jej składu wywoływanej stanem zdrowia dawcy,
- obecności dużej liczby innych składników w próbce.

Rozwiązanie tych problemów oraz sprośanie wspomnianym wyżej wymaganiom tzw. „zielonej chemii” stanowi bardzo duże wyzwanie dla chemika analityka.

Znajomość istniejących procedur analitycznych pozwalających na oznaczenie fizjologicznie ważnych związków siarki w próbkach biologicznych umożliwiły mi zaplanowanie i połączenie/ lub wyeliminowanie wybranych etapów przygotowania próbki w nowo opracowanych procedurach. Doświadczenie w pobieraniu, przechowywaniu i przygotowywaniu materiału biologicznego o różnym stanie skupienia do analizy z wykorzystaniem techniki HPLC stały się punktem wyjścia do rozwinięcia tańszych, szybszych i dokładniejszych procedur analitycznych. Opracowane przeze mnie metody z powodzeniem zostały zastosowane do oznaczenia HSA, LA, Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, Met i NAC w próbkach takich mocz, osocze, paznokcie i włosy człowieka, sierść zwierząt oraz tkanka mózgu świni. Metody te zostały opublikowane i stanowią podstawę cyklu rozprawy habilitacyjnej.

---



**4.6. Cel badań obejmujących cykl habilitacyjny**

Głównym celem badań realizowanych w ramach osiągnięcia habilitacyjnego było *opracowanie uproszczonych procedur analitycznych do oznaczania fizjologicznie ważnych związków siarki w próbkach biologicznych, z wykorzystaniem techniki HPLC z detekcją spektrofotometryczną lub spektrofluorymetryczną*. Opracowując nowe metody uwzględniałam wymagania stawiane przez tzw. „zieloną chemię”, zwracając jednocześnie uwagę na zachowanie jak najlepszych wartości parametrów wali

dacyjnych. Różny stopień płynności badanych przeze mnie próbek wymagał zastosowania odmiennych działań. Wykorzystywane w rozwijanych przeze mnie procedurach: hydroliza, homogenizacja, redukcja wiązań disiarczkowych, derywatywacja grup tiolowych, odbiałczenie, ekstrakcja i odparowanie są etapami najbardziej czasochłonnymi i energochłonnymi w całym postępowaniu analitycznym. Ich stosowanie wiąże się z możliwością popełnienia błędów, co wpływa na końcowy wyniki oraz powtarzalność i odtwarzalność metody. Stosowanie w/w kroków jest uzależnione od rodzaju analitu, charakteru próbki oraz techniki detekcji sprzężonej z HPLC, a ich przeprowadzenie wiąże się z koniecznością stosowania dodatkowych materiałów laboratoryjnych jednorazowego użytku.

Wychodząc naprzeciw wymaganiom stawianym przez tzw. „zieloną chemię” podjęłam próbę opracowania protokołów analitycznych pozwalających na zmniejszenie liczby etapów przygotowania próbki i zredukowania ilości odpadów laboratoryjnych wykorzystywanych w eksperymentach. W tym kontekście, podczas rozwijania nowych procedur analitycznych służących oznaczaniu HSA, LA, Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, Met lub NAC, w próbkach takich jak mocz, osocze, tkanki miękkie i twarde ssaków, przeprowadziłam eksperymenty, których zasadnicze cele przedstawiłam poniżej.

1. **Wyeliminowanie etapu odbiałczania próbki** osocza poprzez zastosowanie kolumny dedykowanej do rozdzielania białek, w procedurze przeznaczonej do jednoczesnego oznaczania HSA, Cys, Cys-Gly, GSH i Hcy w próbkach osocza człowieka [H1].
2. Zmniejszenie liczby etapów przygotowania próbki do analizy i ilości odpadów laboratoryjnych poprzez **połączenie reakcji redukcji i derywatywacji** wiązań disiarczkowych w procedurze dedykowanej oznaczaniu LA, Cys, Cys-Gly, GSH i Hcy w próbkach osocza człowieka [H9].

3. **Zastosowanie reakcji derywatywacji w kolumnie z jednoczesnym rozdzieleniem wytworzonej pochodnej** w procedurach przeznaczonych do oznaczania Met lub Met i Hcy, lub GSH i NAC lub LA w próbkach takich jak: osocze, mocz, włosy, paznokcie człowieka, sierść zwierząt lub tkanki mózgu świni [H2, H3, H5, H6, H7, H8, H10].
4. Zminimalizowanie ilości odczynników stosowanych w etapie upłynnienia próbki stałej w procedurach przeznaczonych do oznaczania Cys, GSH, Hcy i NAC w próbkach tkanek mózgu świni lub Cys i Met w próbkach paznokci człowieka [H4, H5, H7, H10].
5. **Opracowanie procedur wieloskładnikowych**, pozwalających na oznaczenie większej liczby analitów w trakcie jednej analizy w próbkach osocza i moczu człowieka lub w tkankach mózgu świni [H1, H4, H10].

#### **4.7. Merytoryczne ujęcie przedmiotowych osiągnięć w cyklu publikacji**

##### **Obiekty badań**

Albumina (HSA), produkowana w wątrobie, jest głównym białkiem krwi człowieka, stanowiąc ponad 50% wszystkich białek osocza [1]. Odgrywa ważną rolę w regulacji ciśnienia osmotycznego, buforowaniu pH osocza, transporcie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, leków, hormonów oraz ditlenku węgla. Działa także jako skuteczny zewnątrzkomórkowy przeciwutleniacz [2]. Właściwości przeciwutleniające HSA wynikają z obecności grupy tiolowej pochodzącej z cysteiny 34, która jako jedyna nie jest zaangażowana w tworzenie trzeciorzędowej struktury białka. Chociaż grupa -SH w cząsteczce HSA pod względem chemicznym zachowuje się analogicznie do tych obecnych w tiolach o małej masie cząsteczkowej, to reaktywność biochemiczna tego białka jest znacznie bardziej skomplikowana ze względu na zawadę steryczną, rozkład ładunku i powinowactwo grup nukleofilowych cząsteczki do rozpuszczalnika. W przeciwieństwie do większości tioli o małej masie cząsteczkowej obecnych w osoczu, pKa grupy tiolowej w HSA (Cys34) jest niskie (~5) [3], co powoduje, że w warunkach fizjologicznych HSA występuje zarówno w formie zredukowanej (HSA-SH) jak i utlenionej (HSA-SR-R) [2].

Aminokwasy zawierające w strukturze cząsteczkowej atom siarki odgrywają ważną rolę w metabolizmie człowieka. Cysteina (Cys), endogeny aminokwas tiolowy, jest metabolicznie spokrewniona z metioniną (Met), homocysteiną (Hcy) i glutationem (GSH). Bierze udział między innymi w syntezie białek i detoksykacji organizmu. Jest

uznawana za prekursor ograniczający szybkość syntezy GSH i tauryny, co może być pomocne w ochronie wątroby i mózgu przed uszkodzeniem [4-7]. Cys obecna jest nie tylko w moczu i osoczu, ale także we włosach, paznokciach i skórze. Aminokwas ten odgrywa ważną rolę w produkcji kolagenu i keratyn oraz odpowiada za trwałość i elastyczność struktur przez nie tworzonych [8]. Ze względu na wysoką toksyczność w postaci zredukowanej Cys może powodować zmiany neurodegeneracyjne, takie jak ekscytotoksyczne uszkodzenie mózgu, udar lub niektóre choroby neurodegeneracyjne [4].

GSH jest głównym tripeptydem wewnątrzkomórkowym występującym w tkankach. Uczestniczy w transporcie aminokwasów przez „cykl glutamylowy”, detoksykacji leków, a także odgrywa kluczową rolę w ochronie komórek przed niszczącym działaniem wolnych rodników [9, 10]. GSH jest zaangażowany w odtwarzanie innych przeciwutleniaczy i ma duże znaczenie w detoksykacji ksenobiotyków poprzez udział w szlaku kwasu merkapturowego [11]. GSH często osiąga poziomy milimolarne wewnątrz komórek, co czyni go jednym z najsilniej reprezentowanych, w kontekście zawartości, przeciwutleniaczy wewnątrzkomórkowych [12].

NAC jest acetylowanym prekursorem Cys, endogennie obecnym w organizmie ssaków. Od ponad 50. lat jest używana w zastosowaniach klinicznych do leczenia zaburzeń mukolitycznych, stanów zapalnych dróg oddechowych oraz, w przypadkach zatrucia paracetamolem, w celu inaktywacji toksycznych metabolitów tego leku [13, 14]. NAC wykazuje również działanie przeciwzapalne oraz neuroprotekcyjne i wpływa na poprawę pamięci i proces długotrwałego uczenia się. Wykazano, że NAC w wyniku zmniejszenia zewnątrzkomórkowego stężenia cystyny lub jej redukcji do Cys, a także jako dawca grupy sulfhydrylowej, stymuluje syntezę GSH, wszechobecnego źródła grupy tiolowej w organizmie ssaków [5, 13].

Cysteinyloglicyna (Cys-Gly) to naturalnie występujący dipeptyd składający się z Cys i glicyny. Pochodzi z rozkładu GSH. W osoczu Cys-Gly występuje w postaci zredukowanej, utlenionej i związanej z białkami. Związek ten zapewnia komórce siłę redukującą i odgrywa ważną rolę w metabolizmie organizmu. Wykazano m.in., że Cys-Gly może być stosowana jako nowy potencjalny biomarker do różnicowania komórek nowotworu wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych, pierwotnych kamieni dróg żółciowych i torbieli dróg żółciowych [15].

---

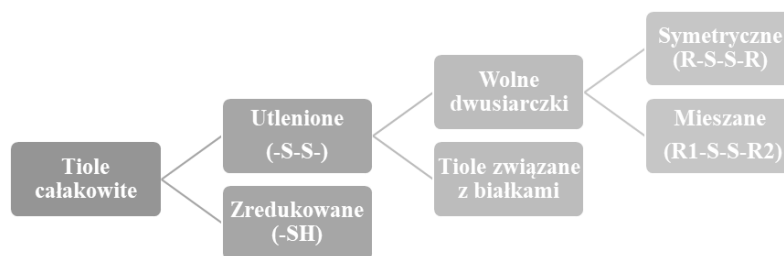
Kolejnym aminokwasem siarkowym związanym w szlaku metabolicznym z Cys jest Hcy. Podwyższony poziom Hcy w mózgu może mieć działanie neurotoksyczne, a w osoczu jest czynnikiem ryzyka chorób naczyń wieńcowych i udaru mózgu. Poziom jej jest regulowany przez witaminy B6, B12 i kwas foliowy. W wyniku remetylacji Hcy jest przekształcana do Met. Zaburzenia genetyczne lub błędy żywieniowe prowadzą do hiperhomocysteinemii (HHcy), a ta z kolei może powodować uszkodzenia w układzie sercowo-naczyniowym, nerwowym i w mózgu [16].

Met jest aminokwasem siarkowym dostarczającym do organizmu człowieka w diecie. W metabolizmie aminokwasów siarkowych związek ten pełni kluczową funkcję. Biorąc bowiem udział w reakcjach metylacji i remetylacji jest prekursorem powstawania Cys i Hcy. Jej obecność w organizmie ssaków potwierdzono w osoczu, moczu, skórze, włosach i paznokciach. Jest niezbędna do prawidłowego wzrostu i naprawy uszkodzonych tkanek. Wpływa na elastyczność skóry, wytrzymałość włosów i paznokci [8].

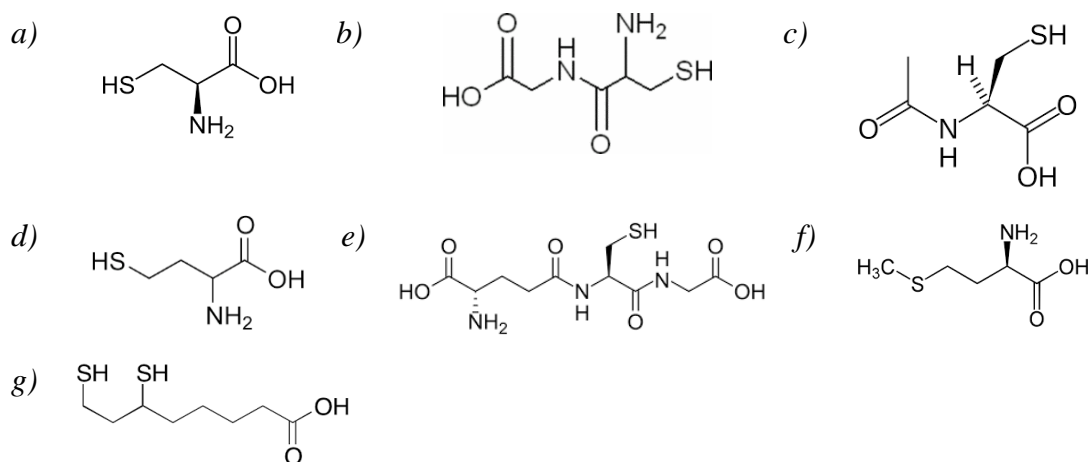
Ostatnim ważnym biologicznie, choć nie będącym aminokwasem, związkami siarki oznaczanym w ramach prowadzonych przeze mnie badań jest kwas  $\alpha$ -liponowy (LA). Disiarczek ten jest naturalnie występującym koenzymem, który działa ochronnie na mitochondria i ma kluczowe znaczenie w procesie wytwarzania energii ATP i prawidłowym metabolizmie [17]. W przeciwieństwie do innych endogennie występujących związków siarki, takich jak GSH czy Cys – LA jest szybko wchłaniany przez organizm z pożywienia, transportowany do komórek i redukowany do kwasu dihydroliponowego (DHLA) w różnych tkankach [18, 19]. Para LA i DHLA stanowi uniwersalny przeciwutleniacz redoks dla wielu układów biologicznych [20]. LA ochrania organizm przed toksycznym działaniem metali ciężkich poprzez chelatowanie żelaza, miedzi, rtęci, arsenu i kadmu [21]. Stosowany jest również jako środek terapeutyczny w leczeniu cukrzycy [22, 23], ciężkiego zatrucia metalami, chorób neurodegeneracyjnych i ludzkiego wirusa nabytego niedoboru odporności [24].

Łatwość utleniania grup tiolowych skutkuje różnorodnością występowania w organizmach żywych form disiarczkowych. Redukowane i utlenione – wolne i związane z białkami formy Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, LA i NAC określają stan redoks tiolu w osoczu. W prowadzonych przeze mnie oznaczeniach termin tiol całkowity, odnosi się do sumy stężeń form zredukowanej i utlenionej, w tym symetrycznych i niesymetrycznych disiarczków, których rozróżnienie w formie ogólnej przedstawiłam na rysunku 1.

---

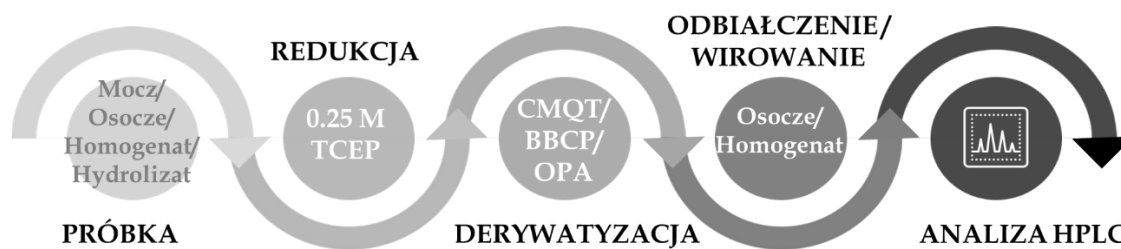


**Rys. 1.** Poglądowe rozróżnienie form redoks związków tiolowych obecnych w organizmie człowieka. Schemat przygotowany w oparciu o rysunek z pracy [9].



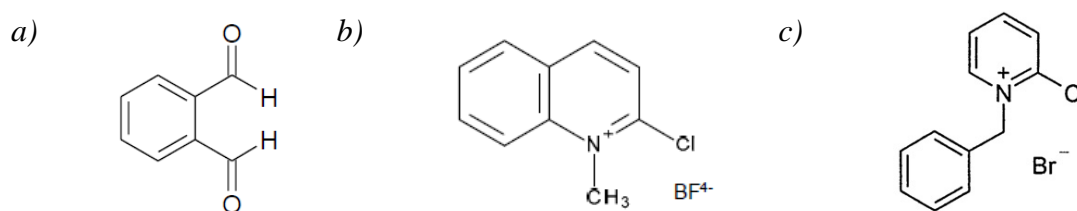
**Rys. 2.** Wzory strukturalne zredukowanych form niskocząsteczkowych związków siarki opisanych w pracy; a) cysteina, b) cysteinyloglicyna, c) N-acetylcysteina, d) homocysteina, e) glutation, f) metionina, g) kwas dihydroliponowy.

Niskocząsteczkowe związki siarki będące przedmiotem moich badań (Rys. 2) nie posiadają w swej strukturze ugrupowań zdolnych do wytworzenia sygnałów możliwych do zarejestrowania przez stosowane przeze mnie detektory spektrofotometryczny lub spektrofluorymetryczny. Dodatkowo występują one często w formie disiarczków. Z tych powodów typowa procedura przygotowania próbki do oznaczania Cys, Hcy, GSH, Cys-Gly, NAC, Met, czy LA w próbkach osocza lub moczu obejmuje redukcję wiązań disiarczkowych, derywatyzację uwolnionych grup tiolowych i odbiałczenie próbki (w przypadku próbek osocza, krwi, śliny, czy tkanek miękkich) (Rys. 3). Są to procedury wieloetapowe, wymagające wielokrotnego dodawania kolejnych porcji odczynników lub przenoszenia próbki do kolejnych probówek.



**Rys. 3.** Schemat typowego postępowania analitycznego podczas oznaczania tioli niskocząsteczkowych w próbce biologicznej.

W eksperymentach zastosowałam odczynniki derywatyzujące takie jak aldehyd *o*-ftalowy (OPA) - w przypadku detekcji FL oraz tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinolinyowy (CMQT) lub bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy (BBCP) podczas detekcji UV (Rys. 4). Wybór podyktowany był dobrą dostępnością tych związków oraz ich wysoką reaktywnością i selektywnością w stosunku do oznaczanych związków.



**Rys. 4.** Wzory strukturalne odczynników derywatyzujących zastosowanych w opracowanych metodach analitycznych, a) aldehyd *o*-ftalowy (OPA), b) tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinolinyowy (CMQT), c) bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy (BBCP).

### Rodzaje próbek biologicznych

Opracowywane przeze mnie metody analityczne obejmowały oznaczanie fizjologicznie ważnych związków siarki w materiale biologicznym o różnym stanie skupienia, pochodzącym od ssaków. Próbki biologiczne, takie jak mocz, osocze, a także tkanki miękkie i twarde zawierają dużą liczbę pojedynczych związków o podobnych do analitów właściwościach fizykochemicznych i niskiej stabilności. Prowadzi to do wielu problemów na etapie chromatograficznego rozdzielania analitów. Dodatkowo, trudność przygotowania próbki do analizy techniką HPLC zwiększa się wraz ze zmniejszeniem stopnia jej płynności. W konsekwencji płyny ustrojowe są łatwiejsze w przygotowaniu, niż paznokcie, włosy, czy kości.

Płyny biologiczne najczęściej wykorzystywane podczas oznaczania LA i niskocząsteczkowych aminokwasów tiolowych to mocz [9, 25–27], osocze/surowica

[9, 20], rzadziej pełna krew [9, 28]. Próbkki moczu pobrane od zdrowych ochotników są wolne od białka, ale stężenie obecnych w nich substancji zależy między innymi od stanu nawodnienia, poziomu aktywności, wagi, diety, stanu zdrowia i średniej objętości produkcji moczu. Z tego powodu wykrywanie i oznaczanie składników moczu takich jak tiol jest bardzo trudne.

Najbardziej wiarygodne wyniki oznaczania badanych przez mnie związków siarki można uzyskać w moczu zbieranym przez 24 godziny. Niestety tak długi czas zbiórki próbki jest trudny i mało komfortowy dla dawcy. Z tego powodu wyznaczone wartości stężeń badanych związków są znormalizowane względem zawartości kreatyniny. Daje to możliwość kompensacji fluktuacji stężeń badanych związków powodowanych zmiennością objętości moczu [9].

Osocze jest jednym z najczęściej analizowanych płynów ustrojowych człowieka. Dotyczy to także badań obejmujących niskocząsteczkowe związki siarki. Krew pełna zawiera cukry, hormony, witaminy, rozpuszczone białka, lipidy i śladowe ilości składników mineralnych. Osocze stanowi około 55-59% płynów krwi, zawiera 90% wody, 9% związków organicznych takich jak białka i lipidy i 1% składników mineralnych. Z praktycznego punktu widzenia, osocze i krew są bardziej kłopotliwe w badaniach analitycznych niż mocz, z uwagi na obecność białek, które mogą utrudniać analizę i modyfikować właściwości wypełnień kolumn chromatograficznych.

Kolejny rodzaj materiału, w którym oznaczałam fizjologicznie ważne związki siarki to próbki stałe [9, 29], które jak już wspominałam są bardziej kłopotliwe w przygotowaniu niż płyny ustrojowe. Do oznaczania LA i niskocząsteczkowych związków siarki można zastosować próbki stałe zmielone na proszek [29], homogenizowane w wodzie lub roztworach buforowych [9, 29], bądź też próbki poddane hydrolizie kwasowej. Celem tych działań jest doprowadzenie do fragmentacji i ujednoczenia struktury próbki oraz jej upłynnienie.

W prowadzonych eksperymentach dążyłam do stworzenia uproszczonych procedur przygotowania próbek do chromatograficznego oznaczania niskocząsteczkowych związków siarki i HSA w materiale biologicznym. Moim celem było zmniejszenie liczby etapów, ograniczenie ilości zużywanych odczynników, skrócenie procedury analitycznej i zminimalizowanie jednorazowych odpadów laboratoryjnych. Jednocześnie ważne było utrzymanie już istniejących lub uzyskanie jeszcze lepszych parametrów walidacyjnych,

---

w tym granic wykrywalności i oznaczalności, powtarzalności i odtwarzalności oraz zakresów liniowości. W pierwszym kroku badań obejmujących cykl habilitacyjny podjęłam próbę wyeliminowania etapu odbiałczania próbki z procedury dedykowanej oznaczaniu różnych form HSA oraz Hcy, GSH, Cys-Gly i Cys w próbkach osocza człowieka.

### **Eliminowanie etapu odbiałczania próbki osocza podczas oznaczania niskocząsteczkowych tioli i HSA (H1)**

W rutynowych oznaczeniach tioli w materiale biologicznym stosuje się etap usunięcia białka z próbki. Wynika to z faktu, że białka mogą niekorzystnie wpływać na parametry rozdzielania, powodując modyfikację złoża kolumny chromatograficznej, jego uszkodzenie lub mechaniczne zablokowanie. W celu wyeliminowania białka z próbki osocza lub homogenatu tkanki najczęściej wykorzystuje się środki chemiczne takie jak: kwasy, np. kwas chlorowy(VII), sole, np. siarczan(VI) amonu, siarczan(VI) sodu, siarczan(VI) magnezu lub rozpuszczalniki organiczne, np. acetonitryl, metanol, etanol, aceton [30-32]. We wszystkich przypadkach należy sprawdzić efektywność wytrącenia oraz zbadać możliwość utraty części analitu wywołaną zjawiskiem współstrącania. Należy również wziąć pod uwagę fakt, iż dodawanie kolejnych odczynników do próbki powoduje jej rozcieńczenie, co może wpływać na pogorszenie ilościowych parametrów metody. Innymi sposobami usuwania białek są wirowanie na filtrach membranowych, typu *cut-off*, ekstrakcja ciecz-ciecz lub dializa. Sposoby te wiążą się jednak z wydłużeniem czasu i zwiększeniem kosztów procedur, wywołanych zastosowaniem kolejnych odczynników i materiałów. W tym miejscu należy również zaznaczyć, że wymienione powyżej rozwiązania są użyteczne w sytuacji, kiedy białko nie stanowi obiektu badań. Sytuacja zmienia się, gdy HSA obecna w osoczu podlega oznaczeniu.

Chromatograficzne metody oznaczania tioli całkowitych zwykle obejmują redukcję wiązań disiarczkowych, modyfikację chemiczną i odbiałczenie, a następnie rozdzielanie i oznaczenie techniką HPLC [9]. Wieloetapowość procedury prowadzi do wydłużenia jej czasu i zwiększa ryzyko błędów. Z tego powodu podjęłam próbę opracowania rozwiązań, które zmniejszą liczbę etapów procedury, skrócą czas i koszty analizy, a jednocześnie rozszerzą gamę wykrywanych substancji. Przykładem takiego rozwiązania jest opracowana przeze mnie metodologia oznaczania różnych form HSA oraz

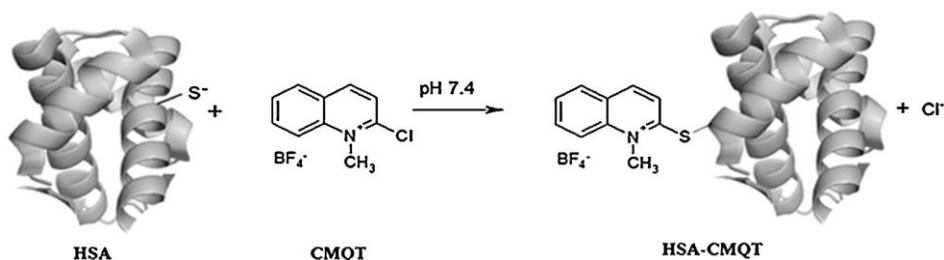
---



Hcy, GSH, Cys-Gly i Cys w osoczu człowieka. W metodzie tej etap przygotowania próbki jest uproszczony i polega jedynie na redukcji wiązań disiarczkowych za pomocą *tris*(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP) i derywatywacji związków tiolowych, w tym HSA, za pomocą CMQT [H1]. Możliwość oznaczenia HSA eliminuje etap usunięcia białek z próbki, wiąże się jednak ze wspomnianym wcześniej ryzykiem uszkodzenia złoża kolumny chromatograficznej. W opracowanej metodzie problem ten rozwiązałam poprzez zastosowanie dedykowanej do analizy białek kolumny chromatograficznej Aeris WIDEPOR XB-C18 (150 × 4,6 mm, 3,6 μm) firmy Phenomenex, która pozwala na wprowadzenie próbki zawierającej białko. Zastosowanie w opracowanej procedurze odpowiedniego odczynnika derywatyzującego (CMQT) umożliwiło dodatkowo jednoczesne rozdzielenie i oznaczenie HSA oraz niskocząsteczkowych tioli w próbce osocza. Zaproponowana procedura zawiera mniej etapów przygotowania próbki, co znacznie przyspiesza całą procedurę analityczną. Eliminacja etapu odbiałczenia skróciła procedurę o 15 minut w porównaniu do wcześniej opublikowanych metod, w których białka usuwano z osocza poprzez ich wytrącanie za pomocą kwasu chlorowego(VII) i wirowanie próbki [33] lub dializę [34].

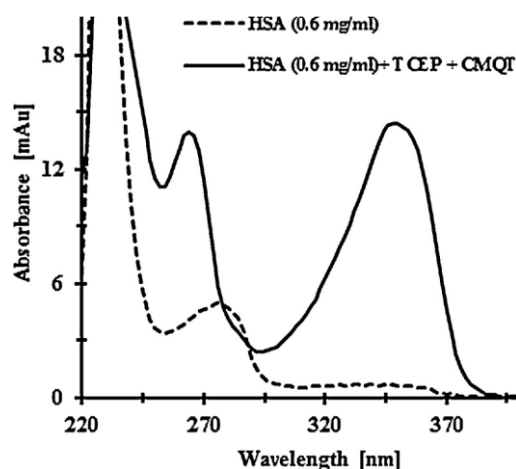
Główne wyzwania, z którymi mierzymy się podczas oznaczania biologicznych tioli, dotyczą ich właściwości fizykochemicznych, w tym dużej reaktywności [35, 36]. Z tego powodu drugim ważnym zadaniem, realizowanym w trakcie rozwijania metody dedykowanej oznaczaniu HSA i niskocząsteczkowych tioli w próbce osocza, było dobranie odpowiedniego odczynnika derywatyzującego, który umożliwiłby ich wykrywanie z użyciem detektora UV. Choć sama HSA posiada zdolność absorbowania promieniowania UV przy długości fali 280 nm, to pozostałe badane związki w postaci niezmienionej są praktycznie niewykrywalne. W opracowanej metodzie wykorzystałam wysoce reaktywny i selektywny względem grupy tiolowej odczynnik - CMQT. Związek ten jest szeroko stosowany do derywatywacji hydrofilowych aminotiole [9, 33-36]. Derywatywacja HSA za pomocą CMQT jest reakcją jednoetapową (Rys. 5), wykorzystującą możliwość podstawienia atomu chloru w pierścieniu heterocyklicznym atomem siarki. Ułatwia to duża nukleofilowość anionu tiolanowego HSA w lekko zasadowych warunkach. Dodatkowo znaczna hydrofilowość CMQT umożliwia jego skuteczną reakcję z grupą tiolową białka. Przykład zastosowania odczynnika CMQT do reakcji poprzez grupę tiolową Cys-34 w cząsteczce HSA przedstawiłam na rysunku 5.

---



**Rys. 5.** Schemat reakcji derywacji chemicznej albuminy z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinolinyowym. Rysunek 4. z pracy **HI**.

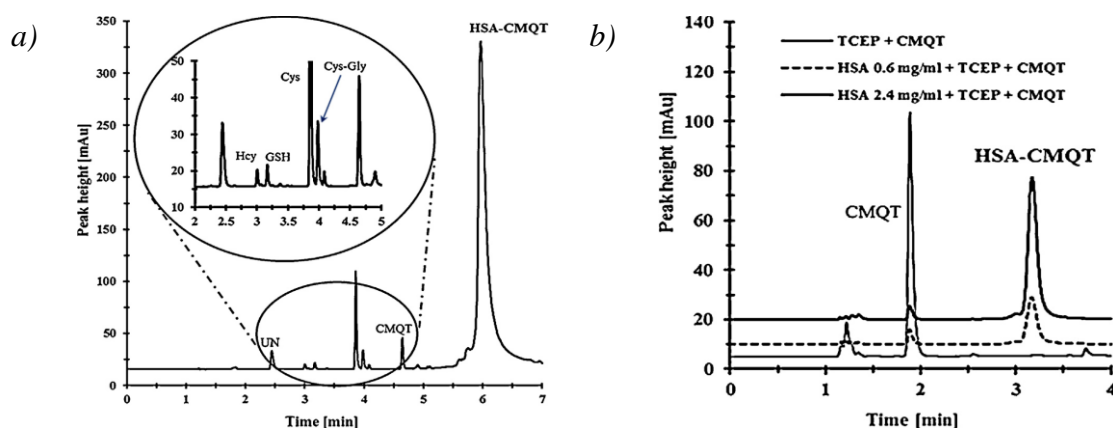
Reakcja derywacji z CMQT zatrzymuje się po zakwaszeniu próbki, a powstała 2-S-chinoliniowa pochodna wykazuje maksimum absorpcji przy 355 nm. Po reakcji obserwuje się istotne różnice widm 2-S-chinoliniowej pochodnej HSA i białka natywnego, a także korzystny wzrost zdolności absorpcyjnej (Rys. 6). Z uwagi na zastosowanie 50-krotnego nadmiaru molowego CMQT w stosunku do analitu bardzo korzystne jest zatem zaistnienie przesunięcia batochromowe na widmie utworzonej pochodnej.



**Rys. 6.** Porównanie widm absorpcyjnych albuminy i jej 2-S-chinoliniowej pochodnej. Rysunek 5. z pracy **HI**.

W badaniach dotyczących kinetyki reakcji derywacji HSA z CMQT kształt uzyskanej krzywej świadczy o tym, że reakcja wymaga stosunkowo krótkiego czasu (2 min). Jest to sytuacja analogiczna do tej, jaką zaobserwowano podczas derywacji tioli o niskiej masie cząsteczkowej [33, 34, 36]. Chinoliniowa pochodna HSA, podobnie jak pochodne tiolowe, jest stabilna w kwaśnym środowisku przez co najmniej 24 godziny.

Dzięki temu próbka nie musi być poddawana badaniom chromatograficznym bezpośrednio po jej przygotowaniu. W zaproponowanej procedurze reakcji derywatywacji ulegają również inne tiole obecne w próbce, tworząc odpowiednie pochodne z CMQT. W konsekwencji metoda umożliwiła jednocześnie oznaczanie HSA, Cys, Hcy, GSH i Cys-Gly w osoczu przy tej samej analitycznej długości fali. Odpowiednie dobranie warunków rozdzielania chromatograficznego umożliwiło obserwowanie wszystkich 5 analitów (Rys. 7a) lub ocenę obecności jedynie HSA, powodując skrócenie czasu analizy (Rys. 7b).



**Rys. 7.** Przykładowe chromatogramy osocza człowieka po redukcji tris(2-karboksyetylo)fosfiną i derywatywacji tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym. Warunki chromatograficzne: kolumna chromatograficzna Aeris WIDEPORE XB-C18 (150 × 4,6 mm, 3,6 μm) firmy Phenomenex, faza ruchoma o składzie 0,2% TCA pH 2,25 (A) i acetonitryl (B), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,0 m/min, analityczna długość fali detektora 355 nm, elucja gradientowa: (a) (0–6 min 7–62% B, 6–8 min 62–7% B, 8–10 min 7% B; dla oznaczenia HSA i tioli, (b) 0–3 min 30% B, 3–4 min 30–70% B, 4–5 min 70–30% B, 5–7,5 min 30% B; dla oznaczania wyłącznie HSA. Rysunki 1. i 2. z pracy **HI**.

Walidację metody przeprowadziłam w oparciu o wytyczne zawarte w przewodniku przygotowanym przez U.S. Food and Drug Administration (FDA) [37]. Obejmowała ona określenie zakresów liniowości badanych związków w osoczu, wyznaczenie dokładności i precyzji wewnątrz- oraz międzydniowej oraz badanie krótko i długoterminowej trwałości analitów w różnych temperaturach przechowywania. Część wyników uzyskanych na etapie walidacji metody zebrałam w poniższej tabeli (Tabela 1).

**Tabela 1.** Wybrane parametry walidacyjne metody oznaczania tioli i albuminy w osoczu człowieka.  
**Tabela 2.** z pracy *HI*.

Analit	Równanie krzywej kalibracyjnej	Zakres liniowości [ $\mu\text{mol/L}$ ]	$R^2$	Precyzja (%)		Dokładność (%)	
				min	max	min	max
<b>Tiole całkowite</b>							
Hcy	$y=0,212x+2,02$	1,0-40	0,997	0,0	10,8	89,6	102,7
GSH	$y=0,297x+1,75$	1,0-40	0,999	4,0	12,5	96,0	112,2
Cys	$y=0,414x+84,55$	20-300	0,999	1,3	11,8	97,3	113,2
Cys-Gly	$y=0,262x+15,5$	5,0-100	0,995	0,7	14,0	96,7	103,3
HAS	$y=150,5x+104$	3,1-37,5	0,994	1,2	13,8	88,0	105,2
<b>Tiole S-związane z białkiem</b>							
Hcy	$y=0,186x+1,88$	0,5-30	0,994	0,0	3,1	92,3	104,5
GSH	$y=0,287x+1,33$	0,5-30	0,992	1,8	7,5	88,3	104,1
Cys	$y=0,455x+77,4$	5-200	0,994	1,2	3,9	92,0	107,7
Cys-Gly	$y=408x+13,24$	2,5-60	0,999	0,7	4,6	87,3	109,5
HSA-SH	$y=139,3x+45,96$	3,1-37,5	0,998	3,3	14,7	91,0	104,7

Podsumowując, opracowana i zwalidowana metoda okazała się szybka, selektywna i wygodna do jednoczesnego oznaczania różnych form HSA i tioli o niskiej masie cząsteczkowej w osoczu człowieka. Największą zaletą prezentowanej metodologii jest to, że umożliwia ona rozdzielenie i detekcję przy tej samej analitycznej długości fali związków o bardzo różnych właściwościach fizykochemicznych, w jednej analizie chromatograficznej. Usprawniona obróbka próbki, obejmująca jedynie redukcję wiązań disiarczkowych (dla tioli całkowitych i związanych z białkami) i derywatyzację oraz zastosowanie odpowiednich warunków chromatograficznych, umożliwiają bezpośrednie wprowadzenie próbki zawierającej białko do kolumny chromatograficznej. Metoda jest czuła, precyzyjna i wykazuje bardzo dobrą liniowość zarówno przy niskich, jak i wysokich stężeniach analitów. Może być skutecznie stosowana do ilościowego oznaczania stanu redoks HSA w osoczu i powinna być pomocna w wyjaśnieniu mechanizmów regulujących S-tiolację białek. Prostota przygotowania próbek, szybkość analizy i niskie koszty opracowanej metody czynią ją wygodnym narzędziem dla laboratoriów analitycznych lub grup badawczych. Korzystne jest również zastosowanie detektora UV znanego ze swojej stabilności, łatwości obsługi i niskich wymagań konserwacyjnych.

**Połączenie reakcji redukcji i derywatywacji**

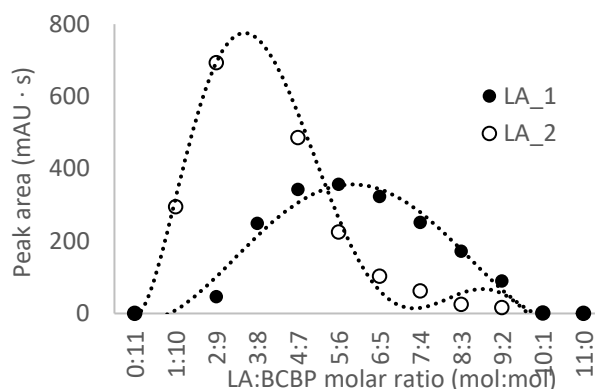
Duża liczba pojedynczych związków obecnych w próbce biologicznej, prowadzi do trudności w rozdzielaniu analitów tiolowych. Jak przedstawiłam na przykładzie pierwszej opracowanej metody, większość procedur bioanalitycznych nie wykorzystuje tylko jednego etapu, ale obejmuje kilka kroków wstępnej obróbki próbki. Ich zadaniem jest uproszczenie matrycy oraz nadanie analitom odpowiednich właściwości detekcyjnych. W przypadku niskocząsteczkowych związków siarki wykrywanych w próbkach biologicznych przy pomocy detektora UV konieczne jest przeprowadzenie reakcji derywatywacji wprowadzającej do struktury cząsteczki analitu odpowiedni chromofor. Nie mniej ważne jest w tym przypadku zwiększenie hydrofobowości analitów, gdyż jej brak stanowi największą przeszkodę na etapie potencjalnej ekstrakcji i/lub rozdzielania z wykorzystaniem chromatografii w odwróconym układzie faz. Przedstawiony wcześniej na rysunku 3. schemat przygotowania próbki do oznaczania tioli w próbce biologicznej obejmuje redukcję wiązań disiarczkowych, derywatywację i usunięcie białek. W opracowanej przeze mnie metodzie chromatograficznej sprzężonej z detekcją UV, dla potrzeb oznaczania LA i niskocząsteczkowych tioli w próbce osocza człowieka etapy te zostały połączone [H9].

Sole takie jak tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylolepidyniowy (CMLT), jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI) i jodek 2-chloro-1-propylopirydyniowy (CPPI), CMQT, BBCP to powszechnie stosowane odczynniki derywatywujące wykorzystywane do oznaczania endogennych i egzogennych tioli, w różnych próbkach rzeczywistych [14, 28, 30–34], przy użyciu techniki HPLC–UV. W trakcie opracowywania metody oznaczania LA i niskocząsteczkowych tioli przetestowane zostały trzy z najczęściej używanych substancji, tj. CMLT, CMQT i BBCP. Wstępne badania wykazały, że po reakcji derywatywacji z każdym z nich uzyskuje się nie jedną, a dwie pochodne, których sygnały są obserwowane na chromatogramie w różnym czasie. Jest to spowodowane obecnością dwóch grup tiolowych w zredukowanej formie LA, które są zdolne do reagowania z zastosowanymi odczynnikiem derywatywującymi. Do dalszych badań nad jednoczesnym oznaczaniem LA i niskocząsteczkowych tioli wykorzystałam odczynnik BBCP. W środowisku wodnym związek ten reaguje specyficznym poprzez grupę –SH, tworząc stabilne 2-S-pirydiniowe pochodne, efektywnie absorbujące promieniowanie z

---

zakresu UV (274 nm dla odczynnika i 321 nm dla pochodnej) i może być stosowany w szerokim zakresie pH [27, 38].

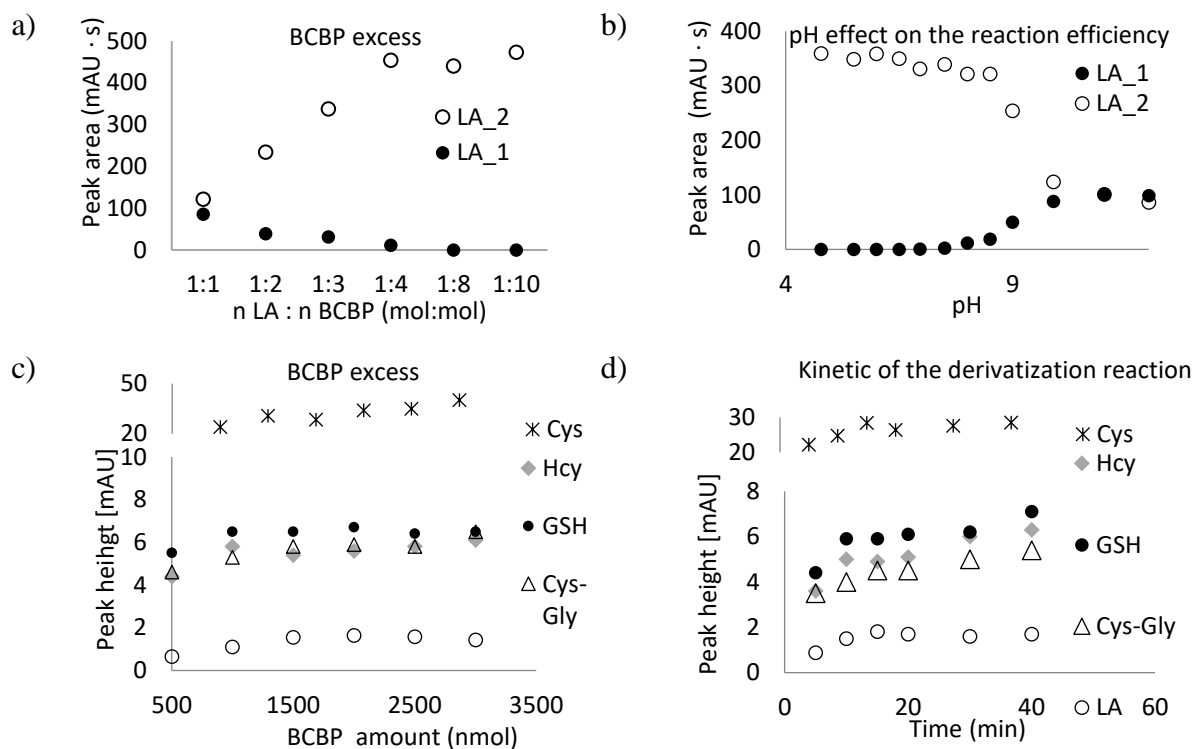
W celu ustalenia optymalnych warunków derywatywacji LA i tioli, badaniom poddałam środowisko reakcji, nadmiar BBCP względem LA i czas reakcji derywatywacji. Oszacowanie stechiometrii reakcji LA z BBCP i stosunku molowego odczynników przeprowadziłam z zastosowaniem metody zmian ciągłych. W badaniach potwierdziłam obecność dwóch różnych form pochodnych LA i wykazałam, że substraty reagują w stosunku molowym 1:1 (LA 1) i 1:2 (LA 2) (Rys. 8).



**Rys. 8.** Oszacowanie stechiometrycznego stosunku molowego metodą zmian ciągłych dla reakcji kwasu  $\alpha$ -liponowego z bromkiem 1-benzyl-2-chloropirydyniowym. Reakcję prowadzono w 0,2 mol/L, buforze fosforanowym, pH = 9. Rysunek 3. z pracy **H9**.

Dodatkowo potwierdziłam, że odpowiedni nadmiar BBCP (Rys. 9a) i pH mieszaniny reakcyjnej (Rys. 9b) wpływają na skuteczność derywatywacji i sprzyjają reakcji, w której obie grupy  $-SH$  w strukturze DHLA są blokowane przez odczynnik derywatyzujący. Wysoki nadmiar odczynnika wpłynął także pozytywnie na derywatywację wszystkich analitów będących przedmiotem zainteresowania (Rys. 9c). Badania kinetyki potwierdziły, że reakcja derywatywacji zachodzi w czasie 10 min w pH 7,8 (Rys. 9d).

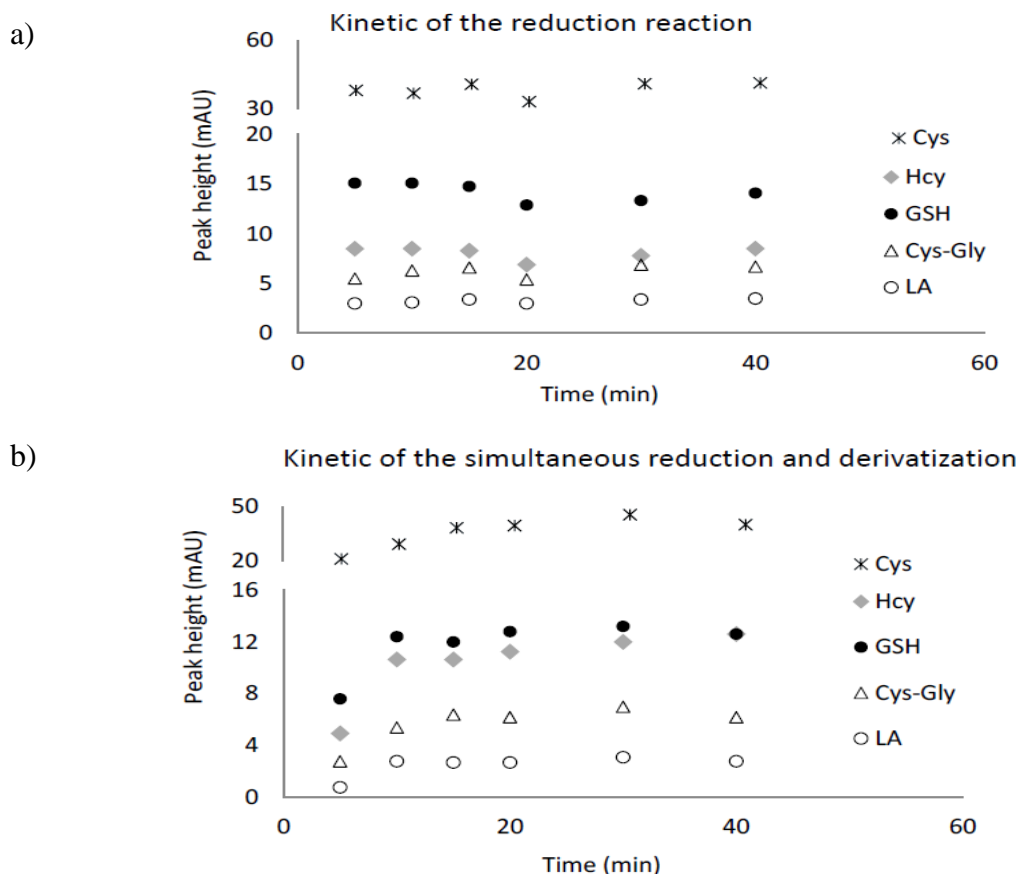
Z uwagi na powstawanie dwóch pochodnych LA z BBCP, wszystkie badania dotyczące optymalizacji parametrów reakcji derywatywacji były realizowane na próbkach poddanych wcześniej reakcji redukcji wiązań disiarczkowych przy użyciu powszechnie stosowanego odczynnika - TCEP. Taki wybór był podyktowany faktem, iż związek ten wykazuje bardzo dobre właściwości redukujące w środowisku wodnym o łagodnym pH i w temperaturze pokojowej. Nie posiada, jak np. ditiotreitól, ugrupowań tiolowych, zatem nie wchodzi w reakcję z odczynnikiem derywatyzującym, a w konsekwencji nie wymaga jego usuwania lub stosowania nadmiernych ilości [**H2**, **H9**, 9, 35].



**Rys. 9.** Wpływ ilości, pH mieszaniny reakcyjnej i czasu na wydajność reakcji derywatywacji z BCBP; (a) badanie wpływu nadmiaru odczynnika derywatydującego względem kwasu liponowego; (b) wpływ pH na wydajność reakcji derywatywacji kwasu liponowego; (c) badanie wpływu nadmiaru odczynnika derywatydującego względem kwasu dihydroliponowego, zredukowanego glutationu, cysteiny, cysteinyloglicyny i homocysteiny, (d) kinetyka reakcji derywatywacji kwasu dihydroliponowego, zredukowanego glutationu, cysteiny, cysteinyloglicyny i homocysteiny. Rysunek 4. z pracy **H9**.

Po zoptymalizowaniu parametrów reakcji derywatywacji podjęłam próbę przetestowania możliwości równoczesnego prowadzenia reakcji redukcji i derywatywacji. Celem takiego połączenia było zmniejszenie liczby etapów procedury przygotowania próbki do oznaczenia niskocząsteczkowych aminokwasów tiolowych i LA w osoczu człowieka. Oczekiwany efektem zaplanowanego postępowania było skrócenie czasu przygotowania i zmniejszenie rozcieńczenia próbki oraz zredukowanie ilości jednorazowych odpadów laboratoryjnych zastosowanych w procedurze. Dla potwierdzenia optymalnej wydajności połączenia reakcji redukcji i derywatywacji, badanie kinetyki reakcji redukcji przeprowadziłam dwoma sposobami, pierwszym - standardowym, tj. z dwoma etapami i drugim - łączącym obydwa rodzaje reakcji. Badanie kinetyki prowadziłam dla przedziałów czasowych 0, 5, 10, 15, 20, 0 i 40 minut. Koniec reakcji był determinowany zakwaszeniem próbki za pomocą HCl.

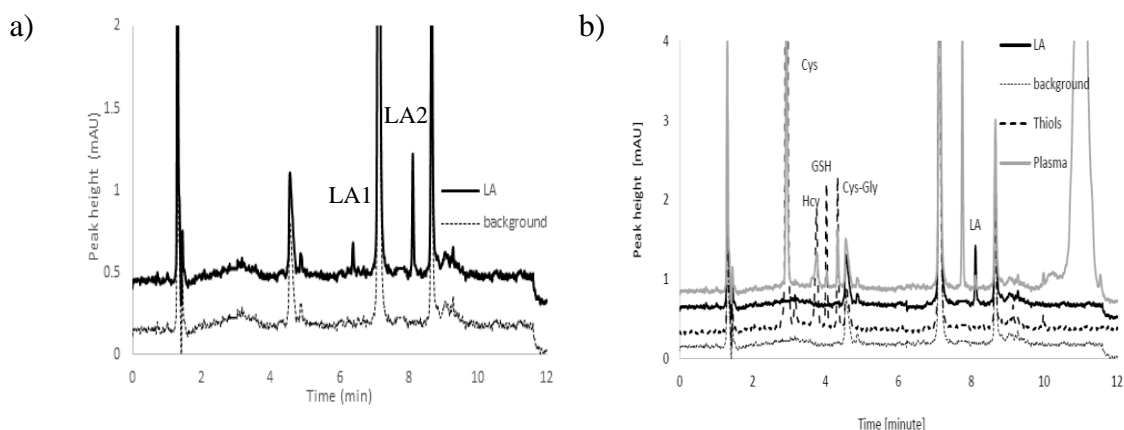
Przygotowanie próbki w postępowaniu standardowym obejmowało dodanie do 50  $\mu\text{L}$  osocza, 150  $\mu\text{L}$  buforu fosforanowego o stężeniu 0,2 mol/L i pH 7,8 oraz 5  $\mu\text{L}$  TCEP o stężeniu 0,125 mol/L, inkubację w temperaturze pokojowej przez 10 minut, dodanie 5  $\mu\text{L}$  BBCP o stężeniu 0,1 mol/L i inkubację w temperaturze pokojowej przez 15 minut oraz ostateczne zakwaszenie próbki i jej odwirowanie (15 minut). W procedurze „połączonej”, do 50  $\mu\text{L}$  osocza dodawałam 150  $\mu\text{L}$  buforu fosforanowego o stężeniu 0,2 mol/L i pH 7,8, 5  $\mu\text{L}$  mieszaniny 0,2 mol/L BBCP i 0,25 mol/L TCEP zmieszanych w stosunku objętościowym 1:1. Po 15 minutach każdą z próbek zakwaszałam poprzez dodanie HCl o stężeniu 1 mol/L w MeCN. Próbki poddawałam analizie chromatograficznej i porównałam wysokości powstałych sygnałów analitycznych (Rys. 10). Uzyskane wyniki potwierdziły możliwość prowadzenia jednoczesnej redukcji i derywatyzacji LA oraz aminotioli w próbkach osocza, co było zgodne z pierwotnymi założeniami eksperymentu.



**Rys. 10.** Wpływ czasu na wydajność reakcji redukcji z wykorzystaniem tris(2-karboksyetylo)fosfiny i derywatyzacji za pomocą bromku 1-benzyl-2-chloropirydyniowego następujących związków: kwas liponowy, utleniony glutation, cystyna, cysteinylglicyna i homocystyna; (a) reakcje redukcji i derywatyzacji prowadzone kolejno po sobie; (b) reakcje redukcji i derywatyzacji prowadzone w tym samym czasie (sprzężone). Rysunek 5. z pracy **H9**.



Koniec reakcji redukcji i derywatywacji determinowany jest poprzez zakwaszenie próbki. Z tego powodu, po wyznaczonym czasie, do mieszaniny reakcyjnej dodawałam HCl o stężeniu 1 mol/L i MeCN. Taki zabieg znacząco obniżał pH, lecz nie powodował wytrącenia białek obecnych w próbce osocza. Przygotowane w ten sposób próbki, w ilości 5  $\mu$ L były wprowadzane do kolumny Aeris WIDEPOR XB-C18 (150  $\times$  4,6 mm, 3,6  $\mu$ m), czyli takiej samej jak ta, którą wcześniej wykorzystywałam do oznaczania HSA [H1] (Rys. 11). Zastosowane rozwiązanie umożliwiło wyeliminowanie etapu usuwania białka na drodze wirowania próbek, co dodatkowo skróciło czas przygotowania o 15 minut. Połączenie reakcji redukcji i derywatywacji oraz pominięcie etapu wirowania próbki skróciło czas jej przygotowania o 25 minut (wcześniej wynosił on 40 minut). Brak konieczności oddzielania supernatantu od osadu białkowego wytworzonego po wirowaniu umożliwił zmniejszenie liczby końcówek i probówek wykorzystywanych w procedurze. Co ważne, wykazałam, że próbka może być przygotowywana bezpośrednio w fiolece dedykowanej do stosowanego w chromatografii podajnika próbek. Eliminuje to konieczność stosowania dodatkowych probówek, co zmniejsza kosztocłonność metody.



**Rys. 11.** Przykładowe chromatogramy (a) dwóch form pochodnych kwasu  $\alpha$ -liponowego po derywatywacji bromkiem 1-benzyl-2-chloropirydyniowym, (b) tioli i kwasu  $\alpha$ -liponowego po redukcji tris(2-karboksyetylo)fosfiną i derywatywacji bromkiem 1-benzyl-2-chloropirydyniowym. Warunki chromatograficzne: kolumna Aeris WIDEPOR XB-C18 (150  $\times$  4,6 mm, 3,6  $\mu$ m) firmy Phenomenex, faza ruchoma o składzie 0,1% TCA, pH 2,25 (A) i acetonitryl (B), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,0 m/min, analityczna długość fali detektora 321 nm, elucja gradientowa: 0–5 min, 10–20% (B); 5–9 min, 20–45% (B), 9–11 min, 45–10% (B). Rysunki 2. i 7. z pracy H9.

Opracowaną metodę poddałam procesowi walidacji zgodnie z wytycznymi wskazanymi w przewodniku przygotowanym przez FDA [37]. Wybrane parametry zebrałam w poniższej tabeli (Tabela 2).

**Tabela 2.** Wybrane parametry walidacyjne metody oznaczania kwasu liponowego i niskocząsteczkowych aminokwasów tiolowych w osoczu człowieka. Tabel 1 z pracy H9.

Analit	Równanie krzywej kalibracyjnej	Zakres liniowości [ $\mu\text{mol/L}$ ]	$R^2$	Precyzja (%)		Dokładność (%)	
				min	max	min	max
Cys	$y = 3,78x + 16,80$	40,0–400,0	0,999	0,2	6,5	99,1	100,8
Hcy	$y = 0,24x + 1,76$	2,0–20,0	0,999	1,5	9,7	94,0	105,5
GSH	$y = 0,24x + 0,87$	2,0–20,0	0,998	1,2	8,4	98,4	106,2
Cys-Gly	$y = 0,17x + 2,15$	2,0–20,0	0,999	0,6	13,4	100,3	105,2
LA	$y = 0,38x + 0,04$	0,12–5,0	0,999	2,3	14,7	97,2	101,4

Opracowana metoda umożliwia jednoczesne rozdzielanie i oznaczanie metabolicznie ważnych aminokwasów tiolowych oraz LA. Jest to pierwsza procedura analityczna, która łączy oznaczenie Cys, Hcy, GSH Cys–Gly i LA w osoczu człowieka w jednej analizie chromatograficznej, wykorzystującej detekcję spektrofotometryczną. Parametry walidacji, w tym liniowość, precyzja i dokładność odpowiadają zakresom wskazanym przez FDA. Co istotne, opracowana procedura z powodzeniem została zastosowana do oznaczania wybranych analitów w próbkach osocza pobranych od zdrowych ochotników a uzyskane wyniki potwierdziły przydatność opracowanej metody do analizy tego rodzaju materiału [H9].

### Zastosowanie reakcji derywatyzacji w kolumnie przy jednoczesnym rozdzielaniu utworzonych pochodnych [H3, H5, H6, H7, H8, H10]

Badane przeze mnie niskocząsteczkowe aminokwasy tiolowe nie posiadają w swej strukturze ugrupowań chemicznych, które umożliwiają ich bezpośrednie wykrycie przy użyciu detektorów UV lub FL. Z tego powodu wymagane jest zastosowanie reakcji chemicznej, w wyniku której wytworzona pochodna uzyska wymagane właściwości spektroskopowe. W metodach chromatograficznych najczęściej wykorzystywana jest reakcja derywatyzacji prowadzona poza układem chromatograficznym, przed wprowadzeniem próbki do kolumny. Taki sposób określany jest mianem derywatyzacji przedkolumnowej. Został on zastosowany w metodach bazujących na derywatyzacji z CMQT lub BBCP [H1, H2, H4, H9, H10]. Innym, choć rzadziej stosowanym

rozwiązaniem jest prowadzenie reakcji upochodnienia analitu po uprzednim rozdzielaniu składników próbki. W tym wypadku odczynnik derywatyzujący jest wprowadzany do eluatu za kolumną chromatograficzną, a sposób ten nosi nazwę derywatywacji pokolumnowej. Najczęściej stosuje się w tym przypadku specjalny trójnik łączący eluat ze strumieniem roztworu odczynnika derywatyzującego. W porównaniu do derywatywacji prowadzonej w trybie przedkolumnowym ten sposób prowadzenia reakcji skutkuje znacznym poszerzeniem pasma (szerszymi pikami).

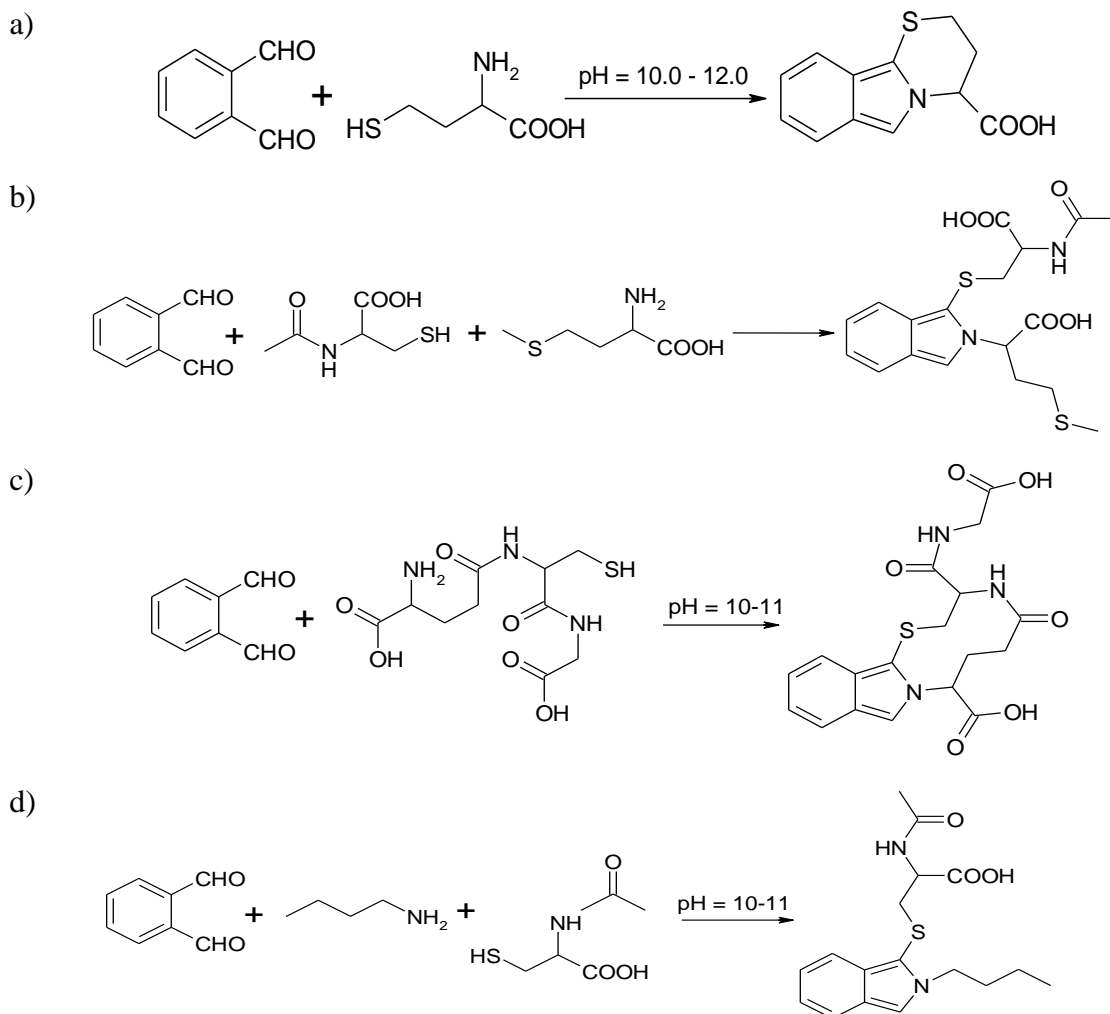
Ostatni sposób, tzw. derywatywacja w kolumnie, umożliwia prowadzenie reakcji bezpośrednio w kolumnie chromatograficznej, w czasie trwania procesu rozdzielania składników próbki. W trybie tym odczynnik derywatyzujący jest składnikiem fazy ruchomej, dzięki czemu etap dodawania go do próbki zostaje wyeliminowany z procedury. Rozwiązanie to opracowano dla aldehydu *o*-ftalowego - odczynnika derywatyzującego dedykowanego do detekcji FL, przy oznaczaniu Hcy i HTL w płynach biologicznych [P15].

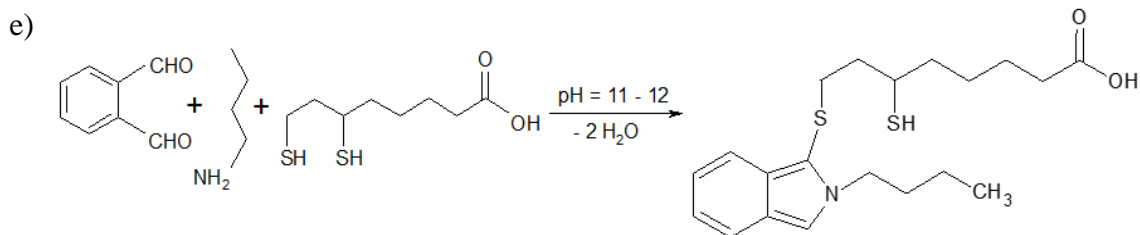
Niewątpliwą zaletą derywatywacji w kolumnie jest możliwość wyeliminowania etapu dodawania odczynnika derywatyzującego do próbki. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji prowadzenia kilkudziesięciu czy kilkuset analiz lub ograniczonej trwałości odczynnika derywatyzującego. Zabieg ten zmniejsza liczbę etapów postępowania analitycznego, ale również ilość zużywalnych materiałów laboratoryjnych, a przy tym skraca całkowity czas analizy. Z tego powodu, podjęłam próbę zastosowania derywatywacji w kolumnie do oznaczania innych niż Hcy i jej tiolakton, niskocząsteczkowych związków siarki. Derywatywację w kolumnie z OPA zastosowałam do oznaczenia Met i Hcy w próbkach moczu, osocza [H3] oraz Met we włosach i paznokciach człowieka [H5, H10] oraz sierści zwierząt [H6]. Ponadto wykorzystałam ją podczas oznaczania LA w moczu człowieka [H7] oraz GSH i NAC w próbkach moczu, osocza i homogenacie mózgu świni [H8].

Wśród metod analitycznych opisanych w literaturze odnotowuje się ograniczoną liczbę narzędzi, które umożliwiają jednoczesne oznaczanie metabolicznie najbliższych spokrewnionych związków, tj. Hcy i Met. Istniejące metody dotyczą oznaczeń prowadzonych w próbkach osocza [39,40]. Z tego powodu w pierwszej kolejności zdecydowałam się na zastosowanie derywatywacji w kolumnie do oznaczania Met i Hcy w próbkach moczu i osocza ludzi oraz myszy. W badaniach zastosowałam znany ze swojej

---

stabilności oraz wysokiej czułości i selektywności detektor FL. Z tego powodu do upochodnienia analitów zastosowałam OPA, odczynnik dedykowany detekcji FL, zdolny do tworzenia pochodnych z aminami, w obecności grupy tiolowej, oraz z tiolami w obecności grupy aminowej. W zależności od struktury analitu (obecności grupy tiolowej lub aminowej) do przeprowadzenia reakcji derywatywacji wymagane jest zastosowanie odczynnika sprzęgającego, będącego donorem brakującej grupy. W przypadku Met takim odczynnikiem jest NAC – donor grupy -SH [H3]. W przypadku oznaczeń LA i NAC jako odczynnik sprzęgający zastosowałam butyloaminę (B-NH<sub>2</sub>), donor grupy -NH<sub>2</sub> [H7, H8]. Związkami, które nie wymagają stosowania odczynnika sprzęgającego są natomiast Hcy i GSH [H3, H8]. Oba związki posiadają w swych strukturach wymagane ugrupowania, a dodatkowo liczba atomów węgla w łańcuchu daje możliwość utworzenia z OPA stabilnego pierścienia. Struktury produktów reakcji badanych związków z OPA przedstawiłam na rysunku 12.





**Rys. 12.** Schemat reakcji derywatywacji (a) homocysteiny z aldehydem *o*-ftalowym, (b) metioniny z aldehydem *o*-ftalowym w obecności *N*-acetylo-cysteiny, (c) glutationu z aldehydem *o*-ftalowym (d) *N*-acetylo-cysteiny z aldehydem *o*-ftalowym w obecności butyloaminy, (e) kwasu dihidroliponowego z aldehydem *o*-ftalowym w obecności butyloaminy. Połączenie Rysunku 2. z pracy **H3** (a, b); Rysunku 1. z pracy **H8** (c, d); Rysunku 1. z pracy **H7** (e).

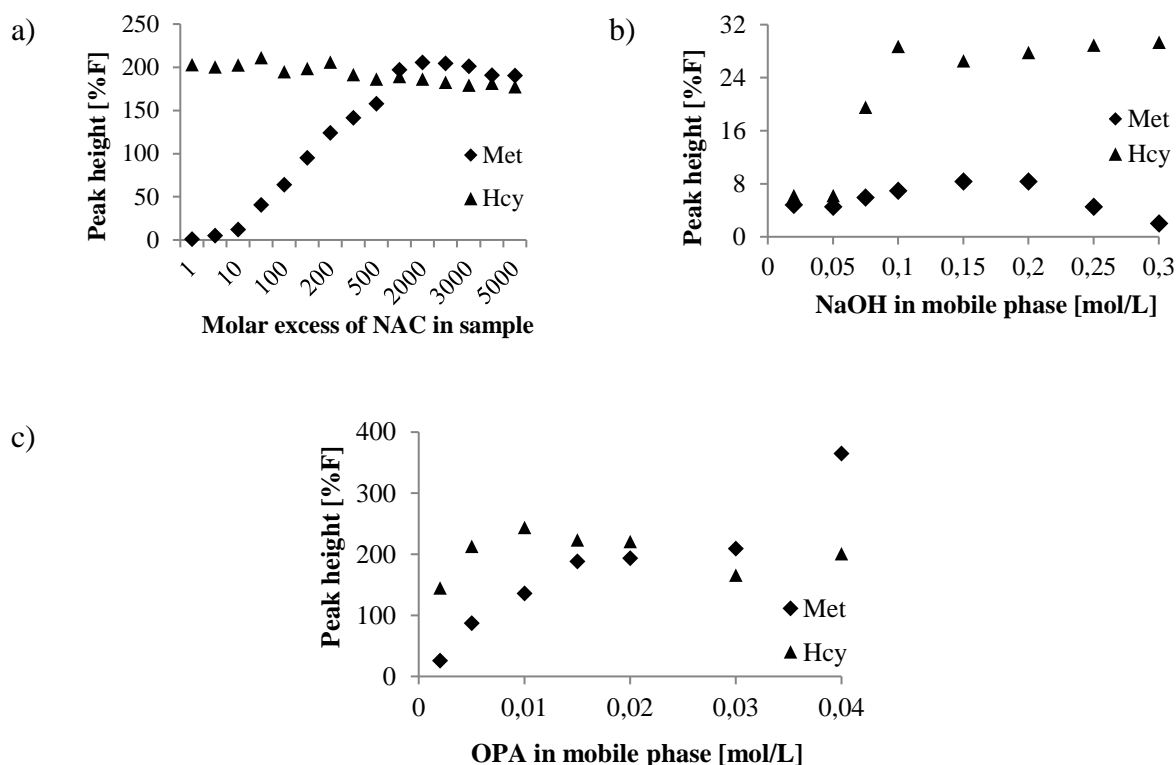
W momencie, w którym rozpoczynałam badania nad opracowaniem metody oznaczania Met i Hcy w płynach biologicznych istniała tylko jedna metoda, wykorzystująca derywatyzację w kolumnie z OPA. Była ona dedykowana oznaczaniu Hcy lub tiolaktonu Hcy w moczu i osoczu człowieka. W zaproponowanym przeze mnie rozwiązaniu etapy derywatywacji i rozdzielania na kolumnie zostały połączone. Odczynnik derywatyżujący został dodany do fazy ruchomej, zaś odczynnik sprzęgający był wprowadzany do próbki. Ważny element wpływający na wydajność reakcji derywatywacji z użyciem OPA stanowi pH. Najwyższe wydajności reakcji osiąga się stosując alkaliczne środowisko (pH 11-12). Z tego powodu podczas rozdzielania mieszaniny konieczne było zastosowanie jako składnika fazy ruchomej roztworu NaOH.

W zaproponowanych procedurach jednoczesnego oznaczania Met i Hcy [**H3**], lub GSH i NAC [**H8**] lub LA [**H7**] reakcja derywatywacji zachodzi bezpośrednio w kolumnie podczas rozdzielania, a stężenie odczynnika sprzęgającego i derywatyżującego wpływają na jej wydajność. Z tego powodu optymalizacja warunków derywatywacji i rozdzielania chromatograficznego badanych związków oznacza dobór tych samych parametrów fazy ruchomej. Proces ten obejmował zbadanie nadmiaru molowego czynnika sprzęgającego w próbce, z jednoczesnym określeniem stężenia OPA, NaOH, i MeCN w fazie ruchomej. Badania prowadziłam w odwróconym układzie faz, stosując kolumnę chromatograficzną PRP-1 (150×4.6 mm, 5 μm) Hamilton (Energy Way, Reno, NV, USA), przystosowaną do pracy w zakresie pH od 1 do 13. Eksperymenty optymalizacyjne prowadziłam zarówno na próbkach roztworów standardów jak i próbkach biologicznych.

W metodzie oznaczania Met i Hcy w próbkach osocza i moczu potwierdziłam, że najwyższe wartości wysokości i pola powierzchni pików uzyskanych pochodnych

otrzymuje się stosując 2000-krotny nadmiar molowy NAC w porównaniu do Met i fazę ruchomą zawierającą OPA o stężeniu 0,01 mol/L rozpuszczony w NaOH o stężeniu 0,1 mol/L oraz MeCN (Rys. 13). Wykazałam również, że NAC nie przeszkadza w oznaczaniu Hcy [H3].

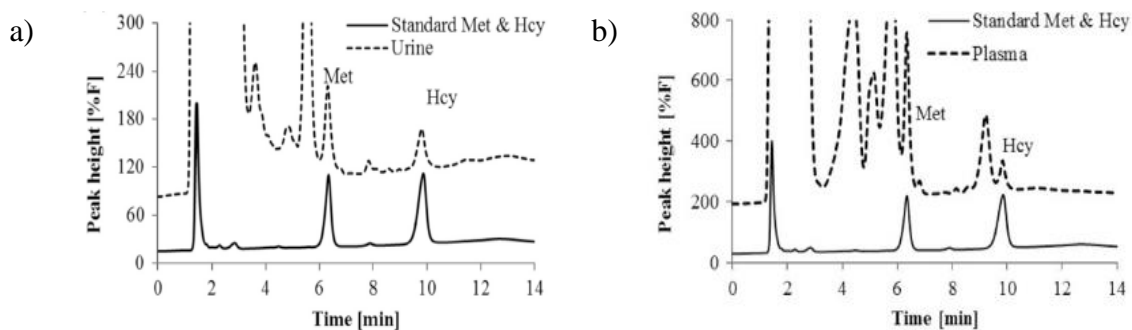
W celu lepszego rozdzielenia analitów od pozostałych składników próbki zastosowałam gradient składu fazy ruchomej oraz gradient długości fali. Najwyższe sygnały uzyskałam stosując długość fali wzbudzenia 348 nm i długość fali emisji 438 nm w czasie od 0,0 do 7,2 min podczas wykrywania Met, którego czas retencji wyniósł 6,2 min. Optymalnymi dla wykrywania Hcy, której czas retencji wyniósł 9,8 min okazały się długość fali wzbudzenia 370 nm i długość fali emisji 480 nm. Przy takich ustawieniach detektora sygnał był rejestrowany pomiędzy 7,2 i 14 minutą. Całkowity czas analizy wynosił 14 minut. Zastosowanie dwóch różnych długości fal w jednej analizie znacząco poprawiło czułość metody [H3].



**Rys. 13.** Optymalizacja warunków derywatywacji Met z OPA i NAC oraz Hcy z OPA prowadzonej w kolumnie chromatograficznej; (a) Nadmiar molowy NAC względem Met, (b) Stężenie NaOH w fazie ruchomej, (c) Stężenie OPA w fazie ruchomej. Rysunek 4. z pracy H3.

Głównym celem działań dotyczących opracowania metody oznaczania Met i Hcy w moczu i osoczu było uproszczenie etapu przygotowania próbki, jednoczesne oznaczenie dwóch analitów oraz skrócenie całkowitego czasu analizy. W opracowanej procedurze dedykowanej próbkom pochodzącym od ludzi w badaniach zużywałam co najmniej 200  $\mu\text{L}$  materiału biologicznego, co umożliwiało wykonywanie minimum trzech powtórzeń. Do przeprowadzenia jednej analizy niezbędne było wykorzystanie 50  $\mu\text{L}$  moczu lub osocza. Większy problem związany z ilością materiału dostępnego do analizy pojawił się w przypadku badań próbek pobranych od myszy. W tym przypadku do badań otrzymałam próbki o całkowitej objętości 40 - 60  $\mu\text{L}$ .

Problem ograniczonej objętości próbki dotyczy nie tylko badań z udziałem małych zwierząt, ale także noworodków i niemowląt. Z tego powodu w nowych rozwiązaniach analitycznych dąży się do minimalizowania ilości materiału potrzebnego do badań. W prowadzonych eksperymentach, wychodząc naprzeciw temu problemowi, podjęłam próbę przeskalowania analiz. W konsekwencji osiągnęłam 5-krotne zmniejszenie ilości materiału niezbędnego do badań. Do finalnych oznaczeń w przypadku próbek pobranych od zwierząt wykorzystywałam 10  $\mu\text{L}$  zarówno osocza jak i moczu. Uzyskane przykładowe chromatogramy przedstawiłam na rysunku 14.



**Rys. 14.** Przykładowe chromatogramy moczu (A) i osocza (B) człowieka po redukcji za pomocą TCEP i derywatywacji w kolumnie w obecności OPA i NAC. Warunki chromatograficzne: kolumna chromatograficzna PRP-1 (150×4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) Hamilton (Energy Way, Reno, NV, USA, faza ruchoma o składzie 0,01 mol/L OPA rozpuszczony w 0,1 mol/L NaOH (A) i acetonitryl (B), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,0 m/min, elucja gradientowa: 0–8 min 14–25% B, 8–12 min 25% B, 12–14 min 25–14% B. Detekcję FL przeprowadzono przy użyciu dwóch różnych długości fal wzbudzenia i emisji ( $\lambda_{ex} = 348 \text{ nm}$  i  $\lambda_{em} = 438 \text{ nm}$  w czasie 0–7,2 min oraz  $\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$  i  $\lambda_{em} = 480 \text{ nm}$  w czasie 7,2–14 min). Rysunek 3. z pracy H3.

Włosy na głowie człowieka oraz paznokcie stanowią unikalny materiał, który można zastosować zarówno w badaniach dotyczących starzenia organizmu, jak i działania czynników szkodliwych. Włókna włosów rosną w stosunkowo równomiernym tempie (1 cm/miesiąc), dlatego też długie włosy „zawierają historię” keratyny od około miesiąca u podstawy do kilku lat na końcu. Z uwagi na obecność Met we włosach i paznokciach, podjęłam udaną próbę zastosowania opracowanej przeze mnie wcześniej metody [H3] do analizy tego rodzaju próbek stałych. Odpowiednia modyfikacja procedury pozwoliła na dokonanie oznaczeń wspomnianych analitów, a w konsekwencji ułatwiła określenie mechanizmów starzenia i uszkodzeń białek w kontekście zmian ilości Met [H10] lub Met i Hcy [H5, H6] w paznokciach i włosach, powodowanych przez demetylację reszt metioninowych obecnych w keratynach.

Ważnym aspektem analitycznym, który dotyczył tych badań było zastosowanie odpowiedniej procedury upłynnienia próbki, w taki sposób aby była możliwa analiza chromatograficzna. W trakcie procesu upłynniania próbki stałej zwracałam również uwagę na konieczność uwolnienia aminokwasów siarkowych wbudowanych w struktury keratyn oraz stabilność uwolnionych w ten sposób analitów. Opis optymalizacji hydrolizy próbek stałych przedstawiłam w dalszej części opisu.

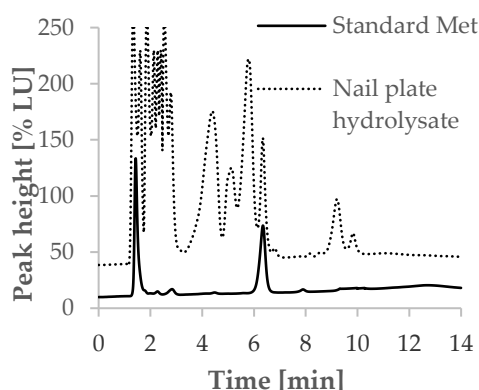
Do oznaczania Met w próbkach włosów i paznokci zastosowałam zmodyfikowaną procedurę analityczną, którą opracowałam na potrzeby oceny zawartości Met i Hcy w próbkach osocza i moczu myszy [H3]. Do badań wykorzystywałam 10  $\mu\text{L}$  kwasowego hydrolizatu włosów lub paznokci, TCEP o stężeniu 0,25 mol/L utrzymujące anality w formie zredukowanej oraz NAC o stężeniu 0,5 mol/L jako czynnik sprzęgający w reakcji derywatywacji Met z OPA. Próbki przygotowywałam w następujący sposób: 5 mg paznokci dwukrotnie przemywałam 200  $\mu\text{l}$  mieszaniny metanolu i wody dejonizowanej (1:1; v:v). Oczyszczone próbki umieszczałam w 1 mL ampułkach szklanych i dodawałam 300  $\mu\text{L}$  6 mol/L HCl. Szklane ampułki zamykałam w płomieniu palnika gazowego, co wyeliminowało problem odparowania kwasu w trakcie inkubacji w termostacie. Hydrolizę kwasową prowadziłam w temperaturze 120°C przez 60 minut. Po tym czasie zamknięte ampułki wirowałam przez 1 minutę przy 10 000 obr./min, a następnie otwierałam. W celu oznaczenia Met w próbce, do 10  $\mu\text{L}$  hydrolizatu dodawałam 100  $\mu\text{L}$  PB o stężeniu 0,2 mol/L i pH 7,4, 50  $\mu\text{L}$  NAC o stężeniu 0,5 mol/L i 5  $\mu\text{L}$  TCEP o stężeniu 0,25 mol/L. Próbkę rozcieńczałam wodą dejonizowaną do końcowej objętości 200  $\mu\text{L}$  i poddawałam

---



analizie. Próbkę do analizy chromatograficznej przygotowywałam bezpośrednio w fiolkach do HPLC.

Z uwagi na duże zakwaszenie hydrolizatu jako składniki fazy ruchomej wykorzystałam roztwór OPA o stężeniu 0,01 mol/L rozpuszczony w roztworze NaOH o stężeniu 0,1 mol/L, którego zadaniem było utrzymanie alkalicznego środowiska reakcji derywatywacji oraz MeCN jako modyfikator organiczny. Zastosowane warunki chromatograficzne odpowiadały tym dobranym w metodzie oznaczenia Met i Hcy w płynach biologicznych [H3] i uwzględniały konieczność derywatywacji analitów w kolumnie, w trakcie trwania procesu rozdzielania. Uzyskane, przykładowe chromatogramy przedstawiłam na poniższym rysunku (Rys. 15).



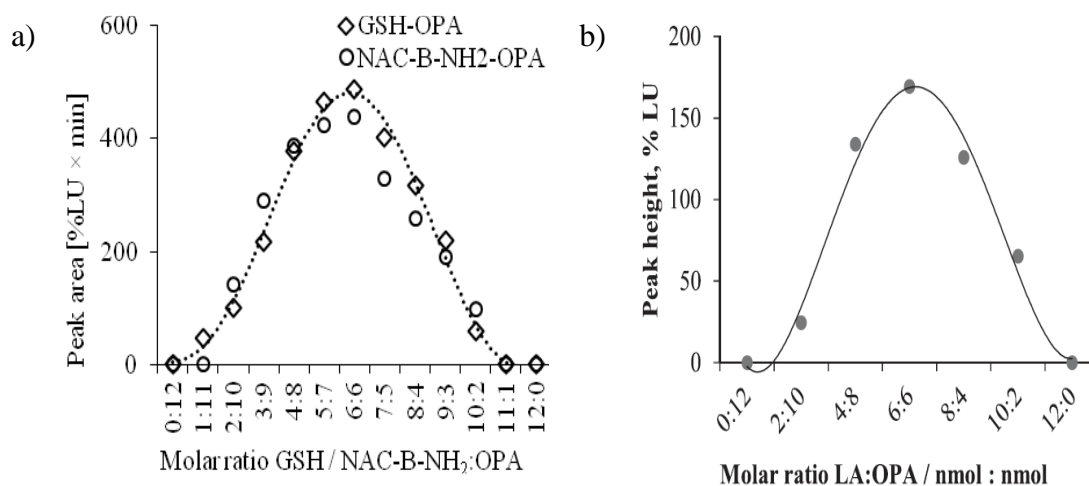
**Rys. 15.** Przykładowe chromatogramy uzyskane dla próbek paznokcia człowieka, przygotowanych wg procedury opisanej powyżej, po redukcji za pomocą TCEP i derywatywacji z OPA w kolumnie w obecności NAC. Warunki chromatograficzne: kolumna chromatograficzna PRP-1 (150×4,6 mm, 5 μm) Hamilton (Energy Way, Reno, NV, USA, faza ruchoma w składzie 0,01 mol/L OPA rozpuszczony w 0,1 mol/L NaOH (A) i acetonitryl (B), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,0 m/min, elucja gradientowa: 0–8 min 14–25% B, 8–12 min 25% B, 12–14 min 25–14% B. Detekcja FL przy długościach fal wzbudzenia i emisji:  $\lambda_{ex} = 348 \text{ nm}$  i  $\lambda_{em} = 438 \text{ nm}$ . Rysunek 7. z pracy H10.

Opracowana metoda charakteryzuje się prostą procedurą przygotowania próbki do analizy, czego przejawem jest mniejsza liczba kroków, a w konsekwencji krótszy czas trwania całego postępowania analitycznego. Opracowane narzędzie umożliwia oznaczenie Met i Hcy w różnych, płynnych i stałych, matrycach biologicznych. Dzięki możliwości przeskalowania procedury pod względem ilości zużywanej próbki biologicznej, możliwe były analizy próbek pobranych od myszy. Zastosowanie derywatywacji w kolumnie wpisuje się także częściowo w zasady tzw. „zielonej chemii”.

Opracowując nową metodę miałam świadomość problemu związanego ze stosowaniem wysokich stężeń NaOH oraz OPA. Z powodu konieczności utrzymania alkalicznego pH podczas reakcji derywatywacji, niemożliwe było całkowite usunięcie NaOH z fazy ruchomej. W związku z tym w kolejnych badaniach podjęłam próbę wykorzystania derywatywacji w kolumnie, ale przy zastosowaniu znacznie niższych stężeń składników wodnej części fazy ruchomej, tj. NaOH i OPA. Eksperymenty dotyczyły oznaczania antyoksydantów takich jak LA, GSH i NAC w płynach biologicznych [H7, H8].

Na podstawie analizy danych literaturowych oraz badań własnych stwierdziłam, że GSH jest zdolny do wytworzenia pochodnej z OPA bez konieczności dodawania odczynnika sprzęgającego (Rys. 12c), co nie było możliwe w przypadku NAC i LA. Ze względu na obecność grup tiolowych w tych związkach, jako odczynnik sprzęgający zastosowałam B-NH<sub>2</sub>, będącą donorem grupy aminowej (Rys. 12d i 12e).

Badania stechiometrii reakcji derywatywacji, przeprowadzone przy użyciu metody zmian ciągłych, znanej także jako metoda Job'a, potwierdziły, że reakcja OPA z GSH oraz OPA z NAC lub LA, w obecności B-NH<sub>2</sub>, przebiega w stosunku molowym 1:1 (Rys. 16).



**Rys. 16.** Oszacowanie stechiometrycznego stosunku molowego metodą zmian ciągłych dla reakcji GSH z OPA i NAC z OPA w obecności B-NH<sub>2</sub> (a) oraz LA z OPA w obecności B-NH<sub>2</sub> (b). Rysunek 2. z pracy H8 (a) i Rysunek 2. z pracy H7 (b).

W obu opracowanych metodach rozdzielanie i derywatywacja odbywały się w tym samym czasie. Z tego powodu ważne było ustalenie optymalnych warunków modyfikacji analitu w kolumnie i zarazem określenie najbardziej korzystnych parametrów rozdzielania

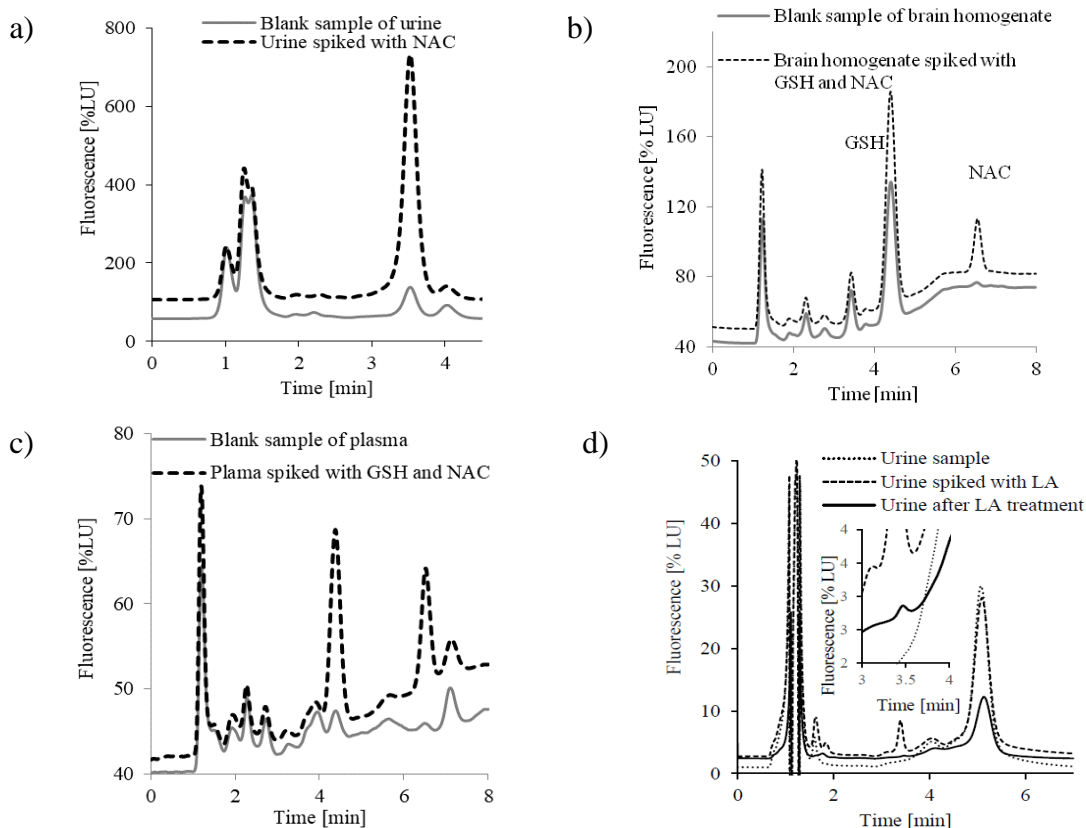
chromatograficznego. Wcześniej wykazałam, że w przypadku derywatywacji Hcy z OPA konieczne jest zastosowanie silnie zasadowych warunków [H3, P1, P2]. Bieżącym celem było utrzymanie wymaganych warunków z jednoczesnym zmniejszeniem ilości NaOH w fazie ruchomej. Ten krok wymagał jednak rozważenia konieczności przeprowadzania etapu odbiałczania próbki poprzez dodanie PCA oraz zbadania jego wpływu na efektywność derywatywacji.

W metodzie dedykowanej oznaczaniu NAC i GSH [H8], przed wprowadzeniem próbki do układu chromatograficznego, do badanego materiału (osocze, mocz, tkanka mózgu świni) dodawałam bufor, odczynnik redukujący - TCEP i czynnik sprzęgający B-NH<sub>2</sub>. Próbkę moczu rozcieńczałam przy użyciu wody dejonizowanej. Do próbek osocza i uzyskanego homogenatu tkanki mózgu świni dodawałam PCA w celu wytrącenia białek, po czym próbki odwirowywałam. Końcowe pH przygotowanych próbek moczu wynosiło około 7-8, zaś próbek osocza i homogenatu mózgu około 2 [H8]. W przypadku metody oznaczania LA [H7] w moczu, po dodaniu do próbki buforu, TCEP i B-NH<sub>2</sub> dodawałam dodatkowo MeCN. Dodatek modyfikatora organicznego poprawił rozdzielnie składników próbki, nie zmieniając znacząco jej pH.

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi w próbkach moczu nie obserwuje się GSH, dlatego w tej matrycy podjęłam próbę oznaczenia wyłącznie NAC. Eksperymenty dotyczące optymalizacji stężenia składników fazy ruchomej stosowanej podczas oznaczaniu NAC w próbkach moczu wykazały, że stężenie NaOH powinno wynosić 0,025 mol/L, natomiast OPA 0,0025 mol/L. Dla lepszego rozdzielnia składników należy zastosować elucję izokratyczną i 24% MeCN [H8]. Przy zastosowaniu wspomnianych warunków czas analizy wynosił 4,5 min. W przypadku oznaczania NAC i GSH w próbkach osocza lub homogenatu tkanki mózgu, konieczne było powtórzenie doboru stężeń składników fazy ruchomej. Moje wcześniejsze przypuszczenia dotyczące wpływu zakwaszenia próbki na wydajność reakcji derywatywacji w kolumnie potwierdziły się. W przypadku tych matryc dla uzyskania jak najlepszej rozdzielczości i symetrii pików należało zastosować fazę ruchomą bardziej alkaliczną, zawierającą MeCN oraz OPA o stężeniu 0,0025 mol/L rozpuszczony w NaOH o stężeniu 0,05 mol/L. W celu uzyskania optymalnej jakości sygnałów analitycznych należało zastosować elucję gradientową, w której ilość modyfikatora organicznego w fazie ruchomej nie przekraczała 30%. W warunkach tych czas analizy chromatograficznej wynosi 8 min.

---

Niewielka modyfikacja składu próbki polegająca na dodaniu MeCN na etapie jej przygotowania, w metodzie oznaczania LA [H7] w moczu, umożliwiła dalsze obniżenie stężenia NaOH w fazie ruchomej. W procedurze tej analit był eluowany z kolumny przy zastosowaniu elucji gradientowej i fazy ruchomej zawierającej 0,0025 mol/L OPA rozpuszczonego w 0,0025 mol/L NaOH i MeCN, w ilości nie przekraczającej 60%. Optymalizacja warunków chromatograficznych i zarazem derywatywacji spowodowała poprawienie jakości rozdzielania, a przede wszystkim zmniejszenie stężenia substancji drażniących obecnych w fazie ruchomej. W metodach wykorzystujących do derywatywacji OPA oraz B-NH<sub>2</sub> jako odczynnik sprzęgający [H7, H8] zastosowałam takie same parametry detekcyjne. Uzyskiwane pochodne były rejestrowane przy długości fali wzbudzenia 340 nm i długości fali emisji 440 nm. Zastosowane warunki uniemożliwiały obserwację sygnału pochodnej Hcy-OPA, dla której parametry detekcyjne odpowiadały wartościom 370 nm i 480 nm (długości fali wzbudzenia i emisji). Przykładowe chromatogramy przedstawia rysunek 17.



**Rys. 17.** Przykładowe chromatogramy: NAC w moczu (a) NAC i GSH w osoczu (b) i homogenacie tkanki mózgu świni (c) oraz LA w moczu (d) po redukcji za pomocą TCEP i derywatywacji w kolumnie przy użyciu OPA w obecności B-NH<sub>2</sub>. Rysunek 4. z pracy H8 i Rysunek 4. z pracy H7.

Eksperymenty dotyczące walidacji metod chromatograficznych opartych na derywatywacji w kolumnie z udziałem OPA, w obecności NAC lub B-NH<sub>2</sub>, poprzedziłam oceną trwałości analitów w badanych matrycach. Badania te wykonałam po ustaleniu optymalnych warunków rozdzielania powstałych pochodnych Met-NAC-OPA, Hcy-OPA [H3], GSH-OPA, NAC-OPA-B-NH<sub>2</sub> [H8] i LA-OPA-B-NH<sub>2</sub> [H7]. W opracowanych metodach anality tworzą pochodne z OPA dopiero po wprowadzeniu próbki do układu chromatograficznego. Z tego powodu ważne jest określenie, czy badane związki pozostają stabilne w próbce i nie ulegają np. utlenieniu w czasie od chwili jej przygotowania do momentu końcowej analizy. Zbadana została krótkoterminowa, kilkugodzinna stabilność Met, Hcy, GSH, NAC i LA w różnych matrycach w temperaturze 4°C oraz w temperaturze pokojowej. W tym kontekście sprawdziłam także konieczność zastosowania odczynnika redukującego, mając na uwadze fakt, że w Met nie występuje wolna grupa tiolowa. Stabilność oszacowałam poprzez monitorowanie odchyleń wysokości lub wielkości pól powierzchni pików analitów dla próbek z dodatkiem i bez dodatku TCEP. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że Met pozostaje stabilna w próbce moczu i osocza przez ponad 120 minut. W przypadku Hcy stabilność uzależniona jest od obecności odczynnika redukującego. Brak TCEP w mieszaninie reakcyjnej powoduje około 50% utratę Hcy w czasie krótszym niż 2 godziny. Dodatkowo zaobserwowałam, że stabilność Hcy nie jest związana z obecnością NAC w mieszaninie reakcyjnej. Zależności te potwierdziłam w obu badanych temperaturach [H3].

W przypadku NAC i GSH eksperymenty wykazały, że oba anality pozostają stabilne w obecności TCEP przez około 80 minut w temperaturze 25°C, niezależnie od testowanej matrycy. W temperaturze 4°C stabilność obu analitów uległa zwiększeniu do około 160 min [H8]. Najbardziej trwałą okazał się LA. W obecności TCEP i B-NH<sub>2</sub> analit ten pozostaje stabilny przez co najmniej 480 minut. Po tym czasie zaobserwowany został jedynie 4% spadek stężenia LA w próbce [H7].

W kontekście walidacji opracowanych procedur określone zostały LOD, LOQ, zakresy liniowości oraz powtarzalność i odtwarzalność metod. Metoda oznaczania Met i Hcy w próbkach moczu i osocza została opracowana na potrzeby oznaczeń poziomu tych związków u osób zdrowych oraz pacjentów z hiperhomocysteinemią oraz u myszy dzikich i z deficytem genu CBS. Przeprowadzone w tym zakresie badania umożliwiły wyciągnięcie ważnych z biologicznego punktu widzenia wniosków. I tak, u pacjentów oraz

---

myszy CBS podwyższony poziom Hcy był wywołany niedoborem  $\beta$ -syntazy cystationiny uczestniczącej w procesie transsulfuracji (przekształcenia) Hcy do Cys. Próbkki osób chorych były pobierane w Klinice Chorób Metabolicznych, Endokrynologii i Diabetologii Instytutu „Pomnik Zdrowia Dziecka” w Warszawie [H3].

Zróźnicowanie stężenia obu analitów, w zależności od grupy badanej, wymagało przeprowadzenia rozszerzonej walidacji metody, obejmującej sprawdzenie liniowości dla dwóch różnych zakresów stężeń. Uzyskane wyniki oznaczania Met i Hcy zostały zebrane i przedstawione w tabeli 3. [H3]. Wybrane parametry walidacyjne metod oznaczania GSH, NAC [H8] i LA [H7] w próbkach biologicznych przedstawiłam w tabelach 4 i 5.

**Tabela 3.** Wybrane parametry walidacyjne metody oznaczania metioniny i homocysteiny w moczu i osoczu człowieka. Tabela 2. z pracy H3.

Analit	Równanie krzywej kalibracyjnej	Zakres liniowości (nmol/mL)	R <sup>2</sup>	Precyzja (%)		Dokładność (%)	
				Min.	Max.	Min.	Max.
<b>Mocz</b>							
Met	$y = 5,95x + 4,62$	2,0–60,0	0,998	3,4	9,6	88,0	108,5
Hcy	$y = 43,97x + 85,72$	2,0–40,0	0,999	1,5	4,8	100,4	111,7
<b>CBS mocz</b>							
Met	$y = 0,48x + 6,07$	50,0–800,0	0,996	2,2	10,8	98,4	106,2
Hcy	$y = 4,22x + 28,23$	25,0–200,0	0,999	1,3	9,8	100,5	109,1
<b>Osocze</b>							
Met	$y = 10,49x + 209,06$	2,0–60,0	0,999	0,1	7,6	94,6	103,4
Hcy	$y = 29,1x + 43,50$	2,0–40,0	0,997	2,3	8,2	88,3	101,4
<b>CBS osocze</b>							
Met	$y = 4,75x + 405,78$	50,0–800,0	0,999	2,6	9,6	98,2	107,6
Hcy	$y = 4,89x + 13,16$	25,0–200,0	0,999	2,7	10,3	91,9	100,0

**Tabela 4.** Wybrane parametry walidacyjne metody oznaczania glutationu i N-acetylocysteiny w moczu i osoczu człowieka. Tabela 1. z pracy H8.

Analit	Równanie krzywej kalibracyjnej	Zakres liniowości (nmol/mL)	R <sup>2</sup>	Precyzja (%)		Dokładność (%)	
				Min.	Max.	Min.	Max.
<b>Mocz</b>							
NAC	$y = 41,6x + 1103,9$	5,0–200,0	0,999	1,1	11,5	93,7	112,0
<b>Homogenat mózgu świni</b>							
NAC	$y = 55,4x + 44,1$	0,5–5,0	0,998	3,1	6,9	92,1	103,0
GSH	$y = 40,2x + 1216,9$	0,5–15,0	0,998	0,5	5,0	98,0	106,7
<b>Osocze</b>							
NAC	$y = 37,5x + 10,9$	0,25–5,0	0,999	1,2	9,0	94,0	106,0
GSH	$y = 20,5x + 46,0$	0,5–15,0	0,999	0,5	9,4	98,7	105,4

**Tabela 5.** Wybrane parametry walidacyjne metody oznaczania kwasu liponowego w moczu człowieka. Tabela 1. z pracy H7.

Analit	Równanie krzywej kalibracyjnej	Zakres liniowości (nmol/mL)	R <sup>2</sup>	Precyzja (%)		Dokładność (%)	
				Min.	Max.	Min.	Max.
Urine							
LA	$y = 457,7x - 67,0$	0,3–8,0	0,999	0,1	6,4	88,9	100,4

Każda z opracowanych metod została porównana do procedur już istniejących. Porównaniu poddałam zarówno parametry walidacyjne, jak i liczbę etapów oraz czas potrzebny do przygotowania jednej próbki, całkowity czas analizy oraz możliwości zastosowania nowych rozwiązań dla różnych rodzajów matryc biologicznych. Przedstawione w powyższych tabelach wyniki dotyczące liniowości, precyzji i odzysku, uzyskane na etapie walidacji opracowanych metod, mieszczą się w kryteriach akceptacji dla próbek biologicznych określonych przez FDA [37].

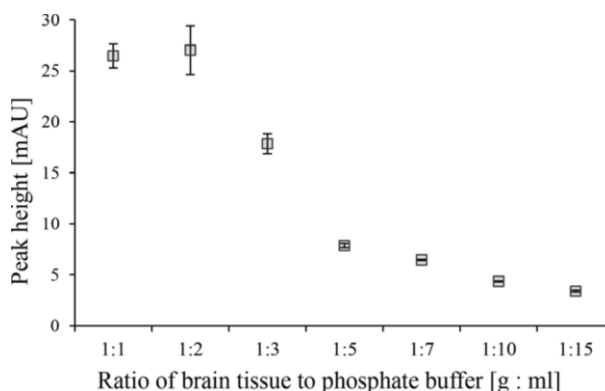
Uzyskane wyniki potwierdzają, że zaproponowana metodologia polegająca na derywatywacji chemicznej w kolumnie i jednoczesnym rozdzielaniu wytworzonej pochodnej może być zastosowana do różnych analitów, w różnych matrycach biologicznych. Opracowane rozwiązania znacznie upraszczają procedurę i skracają czas potrzebny do przygotowania próbki. W przypadku próbek moczu wymagane jest jedynie jej rozcieńczenie i redukcja wiązań disiarczkowych. Z analitycznego punktu widzenia opracowane metody są proste, dość szybkie i wystarczająco czułe, a dodatkowo nie wymagają dużych ilości materiału biologicznego jak i pozostałych komponentów (roztworów) na etapie przygotowania próbki. Dzięki zmniejszeniu liczby etapów i ograniczeniu zużycia jednorazowych materiałów laboratoryjnych oraz zmniejszeniu stężeń NaOH i MeCN stosowanych jako składniki fazy ruchomej można stwierdzić, że opracowane procedury wpisują się w nurt zasad tzw. „zielonej chemii”.

#### **Minimalizowanie ilości odczynników stosowanych w etapie upłynnienia próbki stałej [H4, H10]**

Jak wspomniałam we wprowadzeniu, metoda przygotowania próbki do analizy chromatograficznej ściśle zależy od formy i stanu skupienia badanego materiału. próbki płynne są łatwiejsze do przygotowania niż próbki stałe. Przykładowo, tkanka miękka, np. mózgowa, przed analizą musi być rozdrobniona i homogenizowana w odpowiedniej ilości

rozpuszczalnika w obniżonej temperaturze. Z kolei tkanka twarda, jak włosy czy paznokcie, musi zostać poddana zasadowej lub kwasowej hydrolizie, najczęściej w podwyższonej temperaturze [41].

W celu oznaczenia Cys, Hcy, GSH i NAC w tkance mózgu świni [H4] konieczne było przeprowadzenie próbki do stanu płynnego. W eksperymentach dotyczących upraszczania etapu upłynnienia próbki stałej określiłam wpływ warunków rozcieńczenia próbki tkanki mózgu na precyzję opracowanej metody. Biorąc pod uwagę warunki stosowane podczas dalszych etapów procedury, tj. reakcji redukcji i derywatywacji, do badań zastosowałam bufor fosforanowy o stężeniu 0,2 mol/L i pH 8,2. W celu utrzymania niskiej temperatury homogenatu, powodującej spowolnienie ewentualnych reakcji enzymatycznych zachodzących w trakcie upłynnienia próbki, stosowałam bufor schłodzony do temperatury 4 °C. Do 1 g tkanki mózgowej, w celu homogenizacji, dodawałam bufor w zakresie 1–10 mL. Uzyskane wyniki pokazały, że większe rozcieńczenie próbki podczas homogenizacji zmniejsza całkowity błąd metody z 10,5% do 0,8% w badanym zakresie objętości (Rys. 18). Niższa lepkość homogenatu sprawia, że pomiar objętości próbki pobieranej do badań jest prostszy i bardziej niezawodny, a uzyskane wyniki są powtarzalne. Należy jednak pamiętać, że rozcieńczenie próbki powoduje pogorszenie parametrów LOD i LOQ. W badanych homogenatach mózgow świni odnotowałam wysokie stężenia analitów, toteż do przygotowania próbki wybrałam najwyższe z badanych rozcieńczeń (10 mL). Zastosowanie dużej objętości buforu ułatwiło homogenizację i pobieranie próbki, ale miało szczególnie korzystne znaczenie w przypadku pracy z małymi ilościami materiału biologicznego. Zastosowanie większego rozcieńczenia umożliwia otrzymanie większej objętości próbki do badań [H4].



**Rys. 18.** Wpływ objętości buforu homogenizującego na precyzję oznaczania GSH. Rysunek 2. z pracy H4.

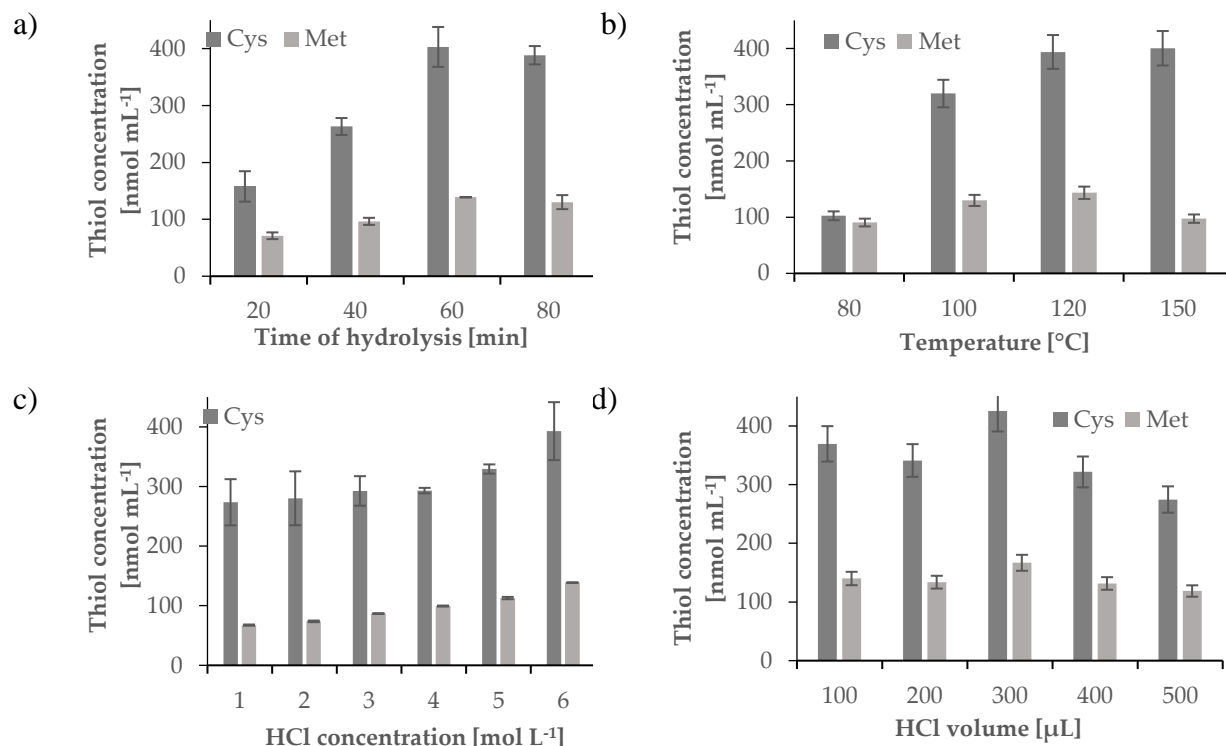


Konieczność upłynnienia próbki pojawiła się także w przypadku oznaczania Met, Hcy i Cys w próbkach włosów i paznokci człowieka oraz sierści zwierząt [**H5, H6, H10**]. W przypadku tkanek twardych upłynnienie materiału na drodze homogenizacji w buforze nie jest rozwiązaniem wystarczającym. Konieczne jest zastosowanie dodatkowych substancji chemicznych i czynników fizycznych. W przypadku próbek włosów lub paznokci często prowadzi się hydrolizę w warunkach kwaśnych lub zasadowych, w których to wiązania peptydowe i disiarczkowe ulegają rozerwaniu. Hydrolizę kwasową prowadzi się głównie przy użyciu kwasów mineralnych, często w podwyższonych temperaturach. W efekcie powstaje roztwór zawierający oligopolimery, peptydy i aminokwasy [41]. W badaniach dotyczących oceny zawartości Met w próbkach włosów i paznokci zastosowałam kwasową hydrolizę próbki. Do tego celu wykorzystałam HCl [**P3, P4, H5, H6, H10**]. Mając na celu dostosowanie metod do zasad tzw. „zielonej chemii”, w trakcie optymalizacji etapu upłynnienia próbki, pod uwagę wzięłam takie parametry jak czas hydrolizy i temperatura oraz stężenie i objętość HCl. Inkubację z HCl prowadziłam w 1 ml ampułkach Wheaton Gold Band, stosując 5 mg próbki płytki paznokcia lub włosów. W celu ograniczenia parowania próbki ampułki z próbką zamykałam nad płomieniem, po czym próbki poddawałam hydrolizie. Poszczególne parametry testowałam w następujących zakresach: czas - 20, 40, 60 i 80 minut, temperatura – 80, 100, 120 i 150 °C, stężenie HCl – 1, 2, 3, 4, 5 i 6 mol/L oraz objętość kwasu 100, 200, 300, 400 i 500 µL [**H10**].

Po określonym czasie hydrolizy w zadanych warunkach, próbki wirowałam przez 1 minutę ( $10\ 000 \times g$ ). 50 µL hydrolizatu przenosiłam do probówek typu Eppendorf o pojemności 0,5 mL i odparowywałam przez 20 minut do sucha w termostacie w temperaturze 100 °C. Osad rozpuszczałam w 50 µL wody dejonizowanej. Następnie prowadziłam reakcję redukcji z TCEP i derywatywacji z CMQT w celu oznaczenia zawartości Cys. W próbkach po hydrolizie i odparowaniu oznaczałam także Met, wykorzystując derywatywację w kolumnie z OPA w obecności NAC. Obydwa związki, występujące w znacznej ilości w badanych próbkach stałych, posłużyły jako markery podczas określania wydajności hydrolizy. Ostatecznie stwierdziłam, że najlepsze wyniki uzyskuje się po przeprowadzeniu hydrolizy w 300 µL HCl o stężeniu 6 mol/L, w temperaturze 120 °C, w czasie 60 min (Rys. 19). Przeprowadzona optymalizacja

---

umożliwiła ograniczenie ilości stosowanego HCl, skrócenie czasu i obniżenie temperatury procesu, w porównaniu do warunków opisanych w innych metodach.



**Rys. 18.** Wpływ czasu hydrolizy (a), temperatury (b), stężenia HCl (c) i objętości HCl o stężeniu 6 mol/L na wydajność hydrolizy próbek płytki paznokcia, wyrażonej stężeniem Cys po derywatywacji z CMQT i Met po derywatywacji z OPA, w obecności NAC. Rysunki 1., 2., 3., 4. z pracy **H10**.

### Opracowanie procedur wieloskładnikowych

Opracowane przeze mnie metody można podzielić na dwie grupy. Pierwsza to procedury dedykowane oznaczeniu w jednym toku analitycznym jednego lub maksymalnie dwóch związków. W metodach tych do wykrywania analitów zastosowałam detektor FL [**H3**, **H5**, **H6**, **H7**, **H10**]. Druga grupa to tzw. metody wieloskładnikowe, które pozwalają na ocenę zawartości trzech i więcej analitów w jednej analizie chromatograficznej. W tych procedurach stosowałam detektor UV [**H1**, **H4**, **H9**].

Taki wybór był konsekwencją stosowania różnych trybów derywatywacji, z wykorzystaniem różnych odczynników derywatywujących, ale także charakteru samych analitów. Wykorzystywane przeze mnie w badaniach CMQT i BBCP są selektywne względem grupy tiolowej i dedykowane do detekcji UV. W efekcie, związki posiadające

wolną grupę -SH ulegają reakcji tworząc pochodne z maksimum absorpcji przy długości fali 355 nm, w przypadku stosowania CMQT i 321 nm podczas derywatywacji z użyciem BBCP.

Opracowując metody oznaczania niskocząsteczkowych tioli i HSA [H1], czy tioli i LA [H9] wykazałam, że odpowiednie dobranie warunków chromatograficznych oraz optymalizacja reakcji derywatywacji umożliwiają ocenę zawartości skrajnie różnych pod względem właściwości związków, w różnych matrycach biologicznych, w jednym pomiarze analitycznym. Reprezentatywne chromatogramy uzyskane w trakcie prowadzonych analiz przedstawiałam na wcześniej zamieszczonych rysunkach (Rys. 7, Rys. 11).

Innym stosowanym przeze mnie związkiem, który wykorzystywałam do przeprowadzania w pochodne badanych substancji był OPA. Odczynnik ten umożliwił zastosowanie detektora FL, ponieważ produkty reakcji OPA z analitami cechowała znaczna fluorescencja. Często wymagało to jednak użycia odpowiedniego odczynnika sprzęgającego, a tworzone pochodne różniły się między sobą właściwościami detekcyjnymi. Wynikająca z tego konieczność regulowania parametrów detekcji oraz rodzaju i ilości odczynnika sprzęgającego powodowała ograniczenie liczby składników wykrywanych w jednej analizie. Zaistniałe komplikacje nie przeszkodziły mi jednak w opracowaniu procedur oznaczania dwóch składników w jednej analizie. Co ważne, oznaczane pary związków, tj. Met i Hcy [H3] oraz GSH i NAC [H8], są ze sobą ściśle powiązane w szlaku metabolicznym. Metoda jednoczesnego oznaczania Met i Hcy ułatwiła określenie zależności pomiędzy ich ilością, a stopniem uszkodzenia keratyn we włosach [H5, H6].

Z analitycznego punktu widzenia opracowane metody wieloskładnikowe posiadają wiele korzystnych cech. Zwiększając liczbę analitów oznaczanych w jednym pomiarze:

- skracamy czas i zmniejszamy ilość rozpuszczalników stosowanych do kondycjonowania układu chromatograficznego, dzięki czemu zmniejszamy objętość odpadów chemicznych,

- zmniejszamy liczbę etapów procedury walidacyjnej, opracowując walidację dla jednej, a nie dwóch lub trzech metod,

- zmniejszamy ilość odpadów laboratoryjnych i (iv) upraszczamy procedurę raportowania wyników badań.

Współczesne trendy w zakresie analizy chemicznej koncentrują się m.in. na miniaturyzacji tradycyjnych technik analitycznych. Wskazują tym samym na konieczność rozwoju szybszych, prostszych, tańszych i bardziej przyjaznych dla środowiska metod przygotowania próbek. Opracowane przeze mnie rozwiązania umożliwiające oznaczanie kilku analitów w jednym pomiarze analitycznym wpisują się w trend zmniejszania ilości odczynników i kosztów związanych z prowadzeniem analiz chromatograficznych. Takie postępowanie redukuje nie tylko koszty pracy, ale przede wszystkim ilość jednorazowych odpadów laboratoryjnych, wpisując się w kryteria tzw. „zielonej chemii” analitycznej.

### **Podsumowanie i wnioski**

Proces analityczny można podzielić na trzy główne etapy: pobieranie i przetwarzanie próbek, walidację pomiarów i metod oraz analizę statystyczną danych. Pomiar i walidacja metody stanowią zwykle około 6% całkowitego czasu procesu analitycznego i są to najkrótsze kroki w całej procedurze analitycznej. Analiza statystyczna danych zajmuje prawie 27% całkowitego czasu analizy. Najbardziej czasochłonnym etapem, który pochłania około 67% czasu analizy jest natomiast przetwarzanie i pobieranie próbek. Jest to także jeden z najtrudniejszych, od strony manualnej, elementów całej procedury analitycznej, stanowiący główne źródło pomyłek i generujący błąd całkowity na poziomie 30% [12]. Niskie stężenie analitów oraz duża liczba pojedynczych związków obecnych w matrycach biologicznych to kluczowe problemy z jakimi mierzy się analityk na etapie opracowywania procedur przygotowania próbek podczas oznaczania fizjologicznie ważnych aminokwasów siarkowych. Kolejne utrudnienie to duża reaktywność grupy tiolowej, hydrofilowość i brak cech strukturalnych, które umożliwiałyby bezpośrednią detekcję. Nie ma uniwersalnej procedury, która mogłaby być stosowana dla wszystkich typów próbek i analitów. Ważne jednak, aby stosowane rozwiązania były proste, niezbyt czasochłonne, powtarzalne i tanie. Zaproponowane przeze mnie podejście, polegające na wyeliminowaniu etapu odbiałczenia, połączeniu etapów redukcji i derywatywacji oraz oznaczaniu większej liczby analitów w jednym pomiarze, umożliwia skrócenie czasu niezbędnego do przeprowadzenia badań i zmniejszenie ilości odpadów chemicznych.

Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów można wyciągnąć szereg wniosków, które wskazują na nowatorski charakter i oryginalność uzyskanych wyników.

1. W opracowanej metodzie chromatograficznej z detekcją spektrofotometryczną do jednoczesnego oznaczenia niskocząsteczkowych aminokwasów tiolowych i albuminy w osoczu [H1] wykazałam, że:

- tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy może być wykorzystany do derywatywacji albuminy w osoczu po redukcji *tris*(2-karboksyetylo)fosfiną [H1],
- możliwe jest oznaczenie homocysteiny, glutationu, cysteiny, cysteinyloglicyny i albuminy po redukcji *tris*(2-karboksyetylo)fosfiną i derywatywacji tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym w jednym toku analitycznym [H1],
- możliwe jest wyeliminowanie etapu usunięcia białka z procedury przygotowania próbki osocza, co skraca czas pracy o 12 minut, w porównaniu do wcześniej opisanych procedur [H1, H9],
- zastosowanie kolumny dedykowanej rozdzielaniu białek oraz dobranie odpowiednich warunków chromatograficznych, skracają całkowity czas analizy chromatograficznej podczas oznaczenia homocysteiny, glutationu, cysteiny i cysteinyloglicyny o 7,5 minuty w porównaniu do innych procedur; jednocześnie umożliwiają wykrycie i oznaczenie albuminy.

2. W metodzie chromatograficznej wykorzystującej detekcję spektrofotometryczną do jednoczesnego oznaczenia niskocząsteczkowych aminokwasów tiolowych i kwasu  $\alpha$ -liponowego w osoczu [H9] udowodniłam m.in., że:

- możliwe jest przeprowadzenie reakcji redukcji *tris*(2-karboksyetylo)fosfiną i derywatywacji bromkiem 1-benzyl-2-chloropirydynowym w jednym etapie; takie działanie skraca czas pracy z próbką o 10 minut w porównaniu do metod opisanych wcześniej oraz w sposób istotny zmniejsza liczbę zużytych materiałów laboratoryjnych jednorazowego użytku,
  - dzięki zastosowaniu kolumny chromatograficznej przystosowanej do rozdzielania białek możliwe jest wyeliminowanie etapu odbiałczania, obejmującego dodanie kwasu chlorowego(VII) oraz wirowanie próbki osocza; zaproponowane podejście redukuje kosztochłonność i czasochłonność procesu.
-

3. Opracowując chromatograficzną metodę (HPLC-FLD), która umożliwia oznaczenie metioniny i homocysteiny, i która wykorzystuje derywatyzację w kolumnie przy użyciu aldehydu *o*-ftalowego wykazałam, że:

- podczas derywatywacji w kolumnie metioniny konieczne jest zastosowanie odczynnika sprzęgającego w postaci N-acetylocysteiny [H3, H5, H6, H10],
- derywatywacja metioniny w kolumnie w obecności aldehydu *o*-ftalowego i N-acetylocysteiny może być stosowana w przypadku analizy próbek moczu, osocza, włosów i paznokci [H3, H5, H6, H10],
- możliwe jest jednoczesne oznaczenie dwóch metabolicznie spokrewnionych związków, a mianowicie metioniny i homocysteiny w próbkach moczu i osocza przy zastosowaniu derywatywacji w kolumnie w obecności aldehydu *o*-ftalowego i N-acetylocysteiny [H3],
- w przypadku ograniczonej dostępności badanego materiału możliwe jest przeskalowanie procedury i zastosowanie zaledwie 10  $\mu$ L moczu lub osocza [H3]; ilość ta jest znacząco mniejsza w porównaniu do metod opisanych wcześniej w literaturze,
- jednoczesne oznaczenie homocysteiny i metioniny redukuje czas i koszty pracy oraz aparatury, a także ilość zużywanych odczynników i wytwarzanych ścieków laboratoryjnych (acetonitrylu, wodorotlenku sodu i aldehydu *o*-ftalowego).

4. W metodach wykorzystujących tryb derywatywacji w kolumnie przy użyciu aldehydu *o*-ftalowego i detekcję spektrofluorymetryczną do oznaczania glutationu, N-acetylocysteiny i kwasu  $\alpha$ -liponowego wykazałam, że:

- reakcja derywatywacji glutationu aldehydem *o*-ftalowym nie wymaga zastosowania odczynnika sprzęgającego [H8],
  - reakcja derywatywacji N-acetylocysteiny lub kwasu  $\alpha$ -liponowego aldehydem *o*-ftalowym wymaga zastosowania butyloaminy jako odczynnika sprzęgającego [H7, H8],
  - derywatywacja w kolumnie może być prowadzona w sposób efektywny w przypadku stosowania aldehydu *o*-ftalowego, w obecności butyloaminy, podczas oznaczania kwasu  $\alpha$ -liponowego w próbkach moczu [H7], glutationu w próbkach osocza [H8] lub N-acetylocysteiny w próbkach moczu i osocza [H8],
-

- optymalizacja warunków chromatograficznych umożliwia 4-krotne obniżenie stężenia aldehydu *o*-ftalowego i wodorotlenku sodu w fazie ruchomej [H7, H8], w porównaniu do metod opisanych wcześniej [H3],
  - połączenie etapów derywatywacji i rozdzielania chromatograficznego skraca czas przygotowania próbki o minimum 10 minut [H3, H5, H6, H7, H8, H10].
5. W metodach wymagających upłynnienia próbki stałej wykazałam, że:
- większe rozcieńczenie próbki podczas homogenizacji tkanki miękkiej zmniejsza całkowity błąd metody z 10,5% do 0,8% w badanym zakresie objętości (1-10 mL),
  - niższa lepkość homogenatu sprawia, że pomiar objętości pobieranej próbki jest łatwiejszy i bardziej niezawodny, a uzyskane wyniki są bardziej powtarzalne [H4],
  - optymalizacja przygotowania próbek tkanek twardych, zawierających keratyny, umożliwia ograniczenie ilości stosowanego HCl, skrócenie czasu i obniżenie temperatury procesu [H10].
6. W opracowanych metodach „wieloskładnikowych” [H1, H2, H4, H9] wykazałam, że zwiększając liczbę analitów oznaczanych w jednym pomiarze:
- skracamy czas pracy i zmniejszamy całkowitą ilość rozpuszczalników stosowanych podczas kondycjonowania układu chromatograficznego, dzięki czemu zmniejszamy objętość odpadów chemicznych,
  - zmniejszamy liczbę etapów procedury walidacyjnej, przygotowując walidację dla jednej a nie dwóch lub trzech metod,
  - zmniejszamy ilość odpadów laboratoryjnych wykorzystywanych na etapie przygotowania próbki,
  - upraszczamy procedurę raportowania wyników badań.

**Odnosiniki literaturowe**

1. S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks, *Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites*, **Nat. Struct. Biol.** 5 (1998) 827–835.
  2. T. Peters, *All about albumin: biochemistry*, in: *Genetic and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, 1996.
  3. R. Narazaki, M. Hamada, K. Harada, M. Otagiri, *Covalent binding between buclamine derivatives and human serum albumin*, **Pharm. Res. (NY)** 13 (1996) 1317–1321.
-

- 
4. A.K. Abbas, W. Xia, M. Tranberg, H. Wigström, S.G. Weber, M. Sandberg, *S-sulfo-cysteine is an endogenous amino acid in neonatal rat brain but an unlikely mediator of cysteine neurotoxicity*, **Neurochem. Res.** 33 (2008) 301–307.
  5. Y. Samuni, S. Goldstein, O.M. Dean, M. Berk, *The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine*, *Biochim. Biophys. Acta* 1830, (2013) 4117–4129.
  6. D.M. Radomska-Leśniewska, P. Skopiński, *N-acetylcysteine as an anti-oxidant and anti-inflammatory drug and its some clinical applications*. **Centr. Eur. J. Immunol.** 37 (2012) 57–66.
  7. A.S. Saleh, *Anti-neuroinflammatory and antioxidant effects of Nacetyl cysteine in long-term consumption of artificial sweetener aspartame in the rat cerebral cortex*, **J. Basic Appl. Zool.** 72 (2015) 73–80.
  8. R. Baran, D. Schoon, *Nail beauty*, *J. Cosmet. Dermatol.* 3 (2004) 167–170.
  9. K. Kuśmierk, G. Chwatko, R. Głowacki, E. Bald, *Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection*, **J. Chrom. B** 877 (2009) 3300–3308.
  10. M.J. Nozal, J.L. Bernal, L. Toribio, P. Marinero, O. Moral, L. Manzananas, E. Rodriguez, *Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*, **J. Chromatogr. A** 778 (1997) 347–353.
  11. B. Bailey, J. Waraska, I. Acworth, *Direct determination of tissue aminothiols, disulfide and thioether levels using HPLC-ECD with a novel stable boron-doped diamond working electrode, advanced protocols in oxidative stress II*, **Methods Mol. Biol.** 594 (2009), 327–339.
  12. F. Xu, L. Wang, M. Gao, L. Jin, J. Jin, *Amperometric determination of glutathione and cysteine on a Pd-IrO<sub>2</sub> modified electrode with high performance liquid chromatography in rat brain microdialysate*, **Anal. Bioanal. Chem.** 372 (2002) 791–794.
  13. W. Wu, G. Goldstein, C. Adams, R.H. Matthews, N. Ercal, *Separation and quantification of N-acetyl-L-cysteine and N-acetyl-cysteine-amide by HPLC with fluorescence detection*, **Biomed. Chromatogr.** 20 (2006) 415–422.
  14. C. Celma, J.A. Allue, J. Prunonosa, C. Peraire, R. Obach, *Determination of N-acetylcysteine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, **J. Chrom. A** 870 (2000) 13–22.
  15. L. Cui, X. Jiang, L. Zhao, Y. Chen, Z. Cheng, J. Li, W. Tan, A. F. Chen, *Cysteinylglycine for potential diagnosis of extrahepatic cholangiocarcinoma using a novel metabolomic approach* **Transl. Cancer Res.** 7(1) (2018) 68-78.
  16. Y. Liu, X. Wang, Y. Hou, Y. Yin, Y. Qiu, G. Wu, C.A. Hu, *Roles of amino acids in preventing and treating intestinal diseases: recent studies with pig models*, **Amino Acids** 49 (2017) 1277–1291.
  17. H. Kataoka, *Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds*, **J. Chromatogr. B** 717(1–2) (1998) 247–262.
  18. L. Rochette, S. Ghibu, C. Richard, M. Zeller, Y. Cottin, C. Vergely, *Direct and indirect antioxidant properties of  $\alpha$ -lipoic acid and therapeutic potential*, **Mol. Nutr. Food Res.** 57(1) (2013) 114–125.
-



- 
19. T. Inoue, M. Sudo, H. Yoshida, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi M., *Liquid chromatographic determination of polythiols based on pre-column excimer fluorescence derivatization and its application to  $\alpha$ -lipoic acid analysis*, **J. Chromatogr. A** 1216(44) (2009) 7564–7569.
  20. A. Khan, M.I. Khan, Z. Iqbal, L. Ahmad, Y. Shah, D.G. Watson, *Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-ECD using liquid–liquid and solid-phase extraction: Method development, validation and optimization of experimental parameters*, **J. Chromatogr. B** 878(28) (2010) 2782–2788.
  21. F. Navari-Izzo, M.F. Quartacci, C. Sgherri, *Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species*, **Plant Physiol. Biochem.** 40(6–8) (2002) 463–470.
  22. U. Singh, I. Jialal, *Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes*, **Nutr. Rev.** 66(11) (2008) 646–657.
  23. K.P. Shay, R.F. Moreau, E.J. Smith, T.M. Hagen, *Is  $\alpha$ -lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity*, **IUBMB Life** 60(6) (2008) 362–367.
  24. M. Koufaki, *Therapeutic applications of lipoic acid: a patent review (2011–2014)*, **Expert Opin. Ther. Patents** 24(9) (2014) 993–1005.
  25. M.N. Abbas, A.A. Radwan, *Novel lipoate-selective membrane sensor for the flow injection determination of  $\alpha$ -lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine*, **Talanta** 74(5) (2008) 1113–1121.
  26. C.J. Tsai, Y.L. Chen, C.H. Feng, *Dispersive liquid–liquid microextraction combined with microwave-assisted derivatization for determining lipoic acid and its metabolites in human urine*, **J. Chromatogr. A** 1310 (2013) 31–36.
  27. G. Chwatko, P. Kubalczyk, E. Bald, *Determination of lipoic acid in the form of 2-S-pyridinium derivative by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, **Curr. Anal. Chem.** 10(3) (2014) 320–325.
  28. H.T. Chng, L.S. New, A.H. Neo, C.W. Goh, E.R. Browne, E.C.Y. Chan, *Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues*, **Brain Res.** 1251 (2009) 80–86.
  29. S. Satoh, M. Shindoh, J.Z. Min, T. Toyooka, T. Fukushima, S. Inagaki, *Selective and sensitive determination of lipoyllysine (protein-bound  $\alpha$ -lipoic acid) in biological specimens by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*, **Anal. Chim. Acta** 618(2) (2008) 210–217.
  30. Z.K. Shihabi, *Analyte recovery from deproteinized serum for HPLC*, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 31(20) (2008) 3159–3168.
  31. C. Polson, P. Sarkar, B. Incledon, V. Raguvaran, R. Grant, *Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry* **J. Chromatogr. B** 785(2) (2003) 263–275.
  32. H. Li, Y. Kong, L. Chang, et al., *Determination of lipoic acid in biological samples with acetonitrile-salt stacking method in CE*, **Chromatographia** 77(1–2) (2014) 145–150.
-

33. E. Bald, G. Chwatko, R. Głowacki, K. Kuśmierek, *Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, **J. Chromatogr. A** 1032 (2004) 109–115.
34. R. Głowacki, E. Bald, *Fully automated method for simultaneous determination of total cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine in plasma by HPLC with UV absorbance detection*, **J. Chromatogr. B** 877 (2009) 3400–3404.
35. K. Kuśmierek, G. Chwatko, R. Głowacki, P. Kubalczyk, E. Bald, *Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis*, **J. Chromatogr. B** 879 (2011) 1290–1307.
36. E. Bald, R. Głowacki, *2-Chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate as an effective and thiol specific UV-tagging reagent for liquid chromatography*, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 24 (2001) 1323–1339.
37. FDA Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>
38. K. Kuśmierek, E. Bald, *Reversed-phase liquid chromatography method for the determination of total plasma thiols after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide*, **Biomed. Chromatogr.** 23 (2009) 770–775.
39. J.A. Thomas, R.J. Mallis, *Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls*, **Exp. Gerontol.** 36 (2001) 1519–1526.
40. C.N. Oliver, B.W. Ahn, E.J. Moerman, S. Goldstein, E.R. Stadtman, *Age-related changes in oxidized proteins*, **J. Biol. Chem.** 262 (1987) 5488–5491.
41. K.N. Shah, A.I. Rubin, *Nail disorders as signs of pediatric systemic disease*, **Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care**, 42 (2012) 204–211.

**4.8. Indywidualny wkład w powstanie prac H1–H10**

**H1 Borowczyk, K.**, Wyszczelska-Rokiel, M., Kubalczyk, P., Głowacki, R., *Simultaneous determination of albumin and low-molecular-mass thiols in plasma by HPLC with UV detection*, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 57 (2015) 981.

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H1: sformułowanie koncepcji badań, wybór technik badawczych, zaplanowanie badań, wykonanie części pomiarów chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji metody, zebranie i opracowanie wyników, napisanie manuskryptu, przeprowadzenie eksperymentów wskazanych przez recenzentów pracy, udzielenie odpowiedzi na pytania recenzentów.

**H2 Borowczyk K.**, Krawczyk M., Kubalczyk P., Chwatko G., *Determination of lipoic acid in biological samples*, Bioanalysis, 7 (2015) 1785.

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy przeglądowej H2: przeprowadzenie analizy literaturowej dotyczącej procesów odbiałaczania i ekstrakcji próbek oraz potrzeby derywatyzacji, opisanie tej części procedur, przygotowanie zestawień tabelarycznych, dyskusja ze współautorami struktury pracy, współredagowanie manuskryptu, udzielenie odpowiedzi na pytania recenzentów.

**H3 Borowczyk K.\***, Chwatko G., Kubalczyk P., Jakubowski H., Kubalska J., Głowacki R., *Simultaneous determination of methionine and homocysteine by on-column derivatization with o-phthalaldehyde*, Talanta, 161 (2016) 917-924.

\*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H3: sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), wybór technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie pomiarów chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji metody, zebranie i opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

**H4 Kamińska A.**, Olejarz P., **Borowczyk K.**, Głowacki R., Chwatko G., *Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC*, Journal of Separation Science, 41 (2018) 3241–3249.

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H4: sformułowanie koncepcji badań optymalizacji homogenizacji tkanki miękkiej, wybór technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie części pomiarów chromatograficznych, współudział w przeprowadzeniu walidacji i opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, współudział w napisaniu manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

---

**H5 Borowczyk K.**, Suliburska J., Jakubowski H., *Demethylation of methionine and keratin damage in human hair*, Amino Acids, 50 (2018) 537-546.

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H5: sformułowanie koncepcji badań hydrolizy włosów ludzi w celu oznaczenia Met i Hcy, wybór technik badawczych i detekcyjnych do oznaczenia Met i Hcy w hydrolizacji włosów, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie wszystkich pomiarów chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji i opracowanie wyników analiz chromatograficznych i ich interpretacja, współudział w przygotowaniu manuskryptu.

**H6 Borowczyk K.**, Wróblewski J., Suliburska J., Akahoshi N., Ishii I., Jakubowski H., *Mutations in homocysteine metabolism genes increase keratin N-Homocysteinylation and damage in mice*, International Journal of Genomics, Article ID 7570850, 7 pages (2018).

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H6: sformułowanie koncepcji badań hydrolizy sierści zwierząt w celu oznaczenia Met i Hcy, wybór technik badawczych i detekcyjnych do oznaczenia Met i Hcy w hydrolizacji włosów, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie wszystkich pomiarów chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji i opracowanie wyników analiz chromatograficznych i ich interpretacja, współudział w przygotowaniu manuskryptu.

**H7 Borowczyk K.\***, Olejarz P., Chwatko G., *Application of simultaneous separation and derivatization for the determination of  $\alpha$ -lipoic acid in urine samples by high-performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection*, Biomedical Chromatography, 2019 ,e4576, 10 pages.

\*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H7: sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), wybór odczynnika derywatyzującego i technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie pomiarów chromatograficznych, zaplanowanie etapu walidacji metody, opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

**H8 Borowczyk K.\***, Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., Chwatko G., *Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples*, International Journal of Molecular Sciences, 20 (13) 3340 (2019).

\*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H8: sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), wybór odczynnika derywatyzującego i technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań,

---

przeprowadzenie badań doboru warunków chromatograficzno-detekcyjnych, pozyskanie próbek biologicznych, zaplanowanie etapu walidacji metody, opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

**H9 Borowczyk, K.\***, Olejarz, P., Chwatko, G., Szyłberg, M., Głowacki, R., *A simplified method for simultaneous determination of  $\alpha$ -lipoic acid and low-molecular-mass thiols in human plasma*, International Journal of Molecular Sciences, 21(3),1049 (2020).

\*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H9: sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), wybór technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, przeprowadzenie badań chromatograficznych, zaplanowanie etapu walidacji metody, opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

**H10 Borowczyk, K.\***, Głowacki, R., *The influence of UV varnishes on the content of cysteine and methionine in women nail plates - chromatographic studies*, International Journal of Molecular Sciences, 21(3),1049 (2021).

\*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H8: sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), pozyskanie zgód na badania na materiale biologicznym, wybór technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, zaplanowanie sposobu pobierania próbek, pobranie próbek biologicznych, przeprowadzenie pomiarów chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji metody, opracowanie wyników, dyskusja ze współautorem nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

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

**5.1 Lista staży naukowych i efekty aktywności realizowanej w innych ośrodkach badawczych**

Stáže naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora

- **01.11.2009 – 30.04.2011 - University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA, Department of Microbiology & Molecular Genetics** - staż naukowy obejmujący badania nad udziałem homocysteiny w rozwoju chorób cywilizacyjnych, badania na modelu zwierzęcym; staż finansowany przez UMDNJ.

Efektom stażu były wyniki częściowo opisane w pracy doktorskiej oraz dwie publikacje w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

- P3 **Borowczyk K.**, Tisończyk J., Jakubowski H., *Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase*, *Amino Acids*, 43 (2012) 1339-1348.
- P4 **Borowczyk K.**, Shih D. M., Jakubowski H., *Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase 1*, *Journal of Alzheimers Disease*, 30 (2012) 225-231.

Stáže naukowe po uzyskaniu stopnia doktora

- **21.09.2015 - 20.11.2015 - Stanford University, California, USA, Stanford Center for Professional Development** – kurs w zakresie komercjalizacji wyników badań w ramach program „Top 500 Innovators – Science, Management, Commercialization”; staż finansowany przez MNiSW.

Efektom stażu było zapoznanie się ze sposobami komercjalizacji wyników badań oraz przygotowaniem zgłoszeń patentowych. Uzyskane wiedza i umiejętności ułatwiły przygotowanie trzech zgłoszeń patentowych:

Zgłoszenie 1. nr P.423653 z dn. 30.11.2017, Sposób jednoczesnego wykrywania kwasu ( $\{[(2R)-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl]oxy\}$ metylo)fosfonowego i kreatyniny (2-imino-1-metyloimidazolidyn-4-on) oraz test do wykrywania kwasu ( $\{[(2R)-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl]oxy\}$ metylo)fosfonowego w moczu i jednoczesnej wstępnej oceny funkcjonowania nerek.

Zgłoszenie 2. nr P.445220 dn. 14.06.2023 „Sposób oznaczania entekawiru w próbkach biologicznych o znaczeniu klinicznym metodą chromatograficzno-spektrofluorymetryczną oraz test do oznaczania entekawiru w takich próbkach”.

Zgłoszenie 3. nr P.445222 z dn. 14.06.2023 „Sposób oznaczania entekawiru lub jednoczesnego oznaczania entekawiru i kreatyniny w próbkach biologicznych o znaczeniu klinicznym metodą chromatograficzno-spektrofotometryczną oraz test do ich oznaczania w takich próbkach”.

---

- **01.07.2018 – 02.11.2018** - Rutgers, The State University of New Jersey, NJ, USA, Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, International Center for Public Health - staż naukowy obejmujący badania nad udziałem tiolaktonu homocysteiny w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, badania na modelu zwierzęcym; staż finansowany przez Rutgers University.

Efektem stażu jest komunikat na konferencji międzynarodowej:

I15 Witucki Ł., **Borowczyk K.**, Suszyńska-Zajczyk J., Wróblewski J., Jakubowski H., *Phf8- mediated epigenetic dysregulation of mTOR signaling/autophagy increases amyloid beta level and cognitive deficits in hyperhomocysteinemic and bleomycin hydrolase-deficient mice*, Fifth Annual Rutgers Brain Health Institute Symposium, 01.11.2019, Nokia Bell Labs, Murray Hill, NJ, USA, Poster #23.

- **01.07.2019 – 02.11.2019** - Rutgers, The State University of New Jersey, NJ, USA, Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, International Center for Public Health - staż naukowy obejmujący badania nad udziałem homocysteinylacji białek w rozwoju chorób towarzyszących cukrzycy typu I, badania na modelu zwierzęcym; pobyt finansowany przez NAWA.

Efektem stażu jest publikacja w Journal of Alzheimer's diseases:

P21 Witucki Ł., **Borowczyk K.**, Suszyńska-Zajczyk J., Warzych E., Pawlak P., Jakubowski H., *Deletion of the homocysteine thiolactone detoxifying enzyme, bleomycin hydrolase, in mice, causes memory- and neurological deficits and exacerbates Alzheimer's disease-related behavioral and biochemical traits in the 5xFAD model of Alzheimer's disease*, Journal of Alzheimer's Disease xx (20xx) x–xx DOI 10.3233/JAD-230578 IOS Press

### 5.2 Lista publikacji z afiliacją uczelni macierzystej i dodatkową afiliacją uczelni zagranicznej

Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora

- P3 **Borowczyk K.**, Tisończyk J., Jakubowski H., *Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase*, Amino Acids, 43 (2012) 1339-1348. (**Afiljacja dodatkowa:** Department of Microbiology and Molecular Genetics, UMDNJ-New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, USA)
- P4 **Borowczyk K.**, Shih D. M., Jakubowski H., *Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase I*, Journal of Alzheimers Disease, 30 (2012) 225-231. (**Afiljacja dodatkowa:** Department of Microbiology and Molecular Genetics, UMDNJ-New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, USA).
-

Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora

- H5 **Borowczyk K.**, Suliburska J., Jakubowski H. *Demethylation of methionine and keratin damage in human hair*, *Amino Acids*, 50 (2018) 537-546. (**Afiliacja dodatkowa:** Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Rutgers University, New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, NJ, USA)
- H6 **Borowczyk K.**, Wróblewski J., Suliburska J., Akahoshi N., Ishii I., Jakubowski H. *Mutations in homocysteine metabolism genes increase keratin N-Homocysteinylation and damage in mice*, *International Journal of Genomics*, Article ID 7570850, 7 pages (2018). (**Afiliacja dodatkowa:** Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Rutgers University, New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, NJ, USA)
- P17 **Borowczyk K.**, Piechocka J., Głowacki R., Dhar I., Midtun Ø., Tell G.S., Ueland P.M., Nygård O., Jakubowski H., *Urinary excretion of homocysteine thiolactone and the risk of acute myocardial infarction in coronary artery disease patients; the WENBIT trial*, **Journal of Internal Medicine**, 285 (2019) 232-244. (**Afiliacja dodatkowa:** Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Rutgers University, New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, NJ, USA).
- P21 Witucki Ł., **Borowczyk K.**, Suszyńska-Zajczyk J., Warzych E., Pawlak P., Jakubowski H., *Deletion of the homocysteine thiolactone detoxifying enzyme bleomycin hydrolase, in mice, causes memory and neurological deficits and worsens alzheimer's disease-related behavioral and biochemical traits in the 5xFAD model of Alzheimer's disease*, **Journal of Alzheimer's Disease**, 95 (2023) 1735–1755. (**Afiliacja:** Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Rutgers University, New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, NJ, USA).

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

### **6.1 Osiągnięcia dydaktyczne**

#### **Prowadzenie zajęć dydaktycznych**

Od 2012 roku jako adiunkt naukowo-dydaktyczny prowadziłam/prowadzę następujące zajęcia dydaktyczne:

- **wykłady** z przedmiotu „Techniki przygotowania próbki do analizy” dla studentów II roku I stopnia kierunku Analityka Chemiczna,
  - **wykłady** z przedmiotu „Modern Instrumental Methods of Analysis” dla studentów programów Erasmus i Ceepus
-



- **konwersatoria** z przedmiotu „Techniki przygotowania próbki do analizy” dla studentów II roku I stopnia kierunku Analityka Chemiczna,
- **seminaria** z przedmiotu „Seminarium dyplomowe I” i „Seminarium dyplomowe II” dla studentów dla studentów III roku I stopnia kierunku Analityka Chemiczna,
- **laboratoria** z przedmiotu „Praktyczne aspekty przygotowania próbki do analizy” dla studentów II roku I stopnia kierunku Analityka Chemiczna,
- **laboratoria** z przedmiotu „Techniki elektromigracyjne w analizie chemicznej” dla studentów III roku I stopnia kierunku Analityka Chemiczna,
- **laboratoria** z przedmiotu „Modern Instrumental Methods of Analysis” dla studentów programów Erasmus i Ceepus
- **laboratoria** z przedmiotu „Wpływ czynników chemicznych na środowisko” dla studentów III roku I stopnia kierunku Ochrona Środowiska.

### Promotorstwo i opieka na pracami dyplomowymi

Od 2012 roku jako adiunkt naukowo-dydaktyczny pełniłam opiekę lub promotorstwo nad pracami dyplomowymi studentów kierunku Analityka Chemiczna. W tym czasie byłam:

- promotorem **15 prac licencjackich**
- promotorem **9 prac magisterskich**
- opiekunem **6 prac magisterskich**
- recenzentem **15 prac licencjackich**
- recenzentem **15 prac magisterskich**

W latach 2017-2023 byłam promotorem pomocniczym w postępowaniu o nadanie stopnia doktora mgr Patrycji Olejarz, na podstawie rozprawy zatytułowanej „Chromatograficzne badania wybranych leków przeciwwirusowych w próbkach biologicznych”, wykonanej pod promotorstwem dr hab. Grażyny Chwatko, prof. UŁ. Doktorat został obroniony dnia 21.06.2023.

### Wykłady popularno-naukowe

W ramach aktywności popularyzatorskiej przedstawiłam 5 wykładów popularno-naukowych, w tym: 4 wykłady prezentowane w ramach programu Akademia Ciekawej Chemii, realizowanego na Wydziale Chemii UŁ dla uczniów szkół średnich;

- 27.10.2021 - wykład zatytułowany „Czy Ty wiesz co jesz?”, *wystąpienie w formie e-wykładu*
  - 04.11.2020 - wykład zatytułowany "Tajemnica we włosie zamknięta", *wystąpienie w formie wykładu*
  - 10.04.2017 - wykład zatytułowany "A czy Ty wiesz co jesz?", *wystąpienie w formie wykładu*
  - 15.06.2015 - wykład zatytułowany „Historia we włosie zamknięta”, *wystąpienie w formie wykładu*
-

1 wykład prezentowany na Gali Absolwentów Wydziału Chemii UŁ;

- 23.01.2021 - wykład zatytułowany " Włos – niemy świadek historii", *wystąpienie w formie e-wykładu.*

**Nagroda dydaktyczna**

- 1) Zespołowa Nagroda Rektora I-go stopnia za osiągnięcia dydaktyczne przyznana w roku 2022.

**Obciążenia dydaktyczne (liczone w godzinach obliczeniowych)**

Obciążenia dydaktyczne przedstawione jako wymiar godzinowy i % zajęć w odniesieniu do pensum jakie obowiązywało mnie, jako adiunkta, zatrudnionego na stanowisku naukowo-dydaktycznym w kolejnych latach akademickim:

- 2012/2013 – pensum 230 h – wypracowane 242 h (105,2% pensum)
- 2013/2014 – pensum 230 h – wypracowane 230 h (100% pensum)
- 2014/2015 – pensum 230 h – wypracowane 230 h (100% pensum)
- 2015/2016 – pensum 230 h – wypracowane 230 h (100% pensum)
- 2016/2017 – pensum 230 h – wypracowane 230 h (100% pensum)
- 2017/2018 – pensum 230 h – wypracowane 230 h (100% pensum)
- 2018/2019 – pensum 230 h – wypracowane 230 h (100% pensum)
- 2019/2020 – pensum 230 h – wypracowane 240,5 h (104,5% pensum)
- 2020/2021 – pensum 230 h – wypracowane 250 h (108,7% pensum)
- 2021/2022 – pensum 230 h – wypracowane 127 h (100% – zaliczone; 230 h – z powodu urlopu macierzyńskiego).

**Opieka nad studenckimi projektami badawczymi**

- Opiekun 4 studenckich projektów badawczych przyznawanych przez Uniwersytet Łódzki w ramach konkursu Studenckie Granty Badawcze, w latach 2017, 2020, 2021.
- Opiekun 2 projektów badawczych realizowanych przez studentów w ramach projektu Studen's Power.

**6.2. Osiągnięcia organizacyjne****Członkostwo w komisjach rektorskich, senackich i wydziałowych**

1. Funkcja członka Wydziałowej Komisji Wyborczej w kadencji 2016 – 2019.
  2. Funkcja sekretarza Wydziałowej Komisji Wyborczej w kadencji 2020 – 2024.
  3. Funkcji sekretarza Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej na rok 2021 – 2022.
-

**Organizowanie konferencji**

1. Udział w Komitecie organizacyjnym VI Konferencji Chromatograficznej – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, Polska, 15 – 17 maj 2013, członek komitetu organizacyjnego.
2. Zorganizowanie naukowej konferencji krajowej – członek Komitetu Organizacyjnego 7 Konferencji Chromatograficznej – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, Polska, 11-13 maj 2016.
3. Udział w Komitecie organizacyjnym 25<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, Poland, 15-18 September 2019 (członek komitetu organizacyjnego).

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

**7.1. Wyróżnienia i nagrody****Nagrody i wyróżnienia przyznane przez gremia ogólnopolskie**

1. „Nagroda za wybitne osiągnięcia przyczyniające się do rozwoju nauki dla młodych uczonych pracujących na terenie województwa łódzkiego za rok 2019” – Nagroda indywidualna przyznana przez Polską Akademię Nauk, Oddział w Łodzi (06.12.2021).
2. Wyróżnienie przyznane przez Committee of Societas Humboldtiana Polonorum za wystąpienie zatytułowane “*N-homocysteinylation as a damage factor of structure and functions of keratins – a potential relationship with aging*”, zaprezentowane podczas 10<sup>th</sup> International Congress of Societas Humboldtiana Polonorum – Longevity – a blessing or curse? Medical, technological, cultural, socio-economic and legal aspects (02.07.2016).
3. Nagroda - I miejsce za najlepszy pomysł na komercjalizację wyników badań - nagroda przyznana przez Centrum Transferu Technologii Uniwersytetu Łódzkiego oraz Centrum Innowacji i Transferu Technologii Uniwersytetu Medycznego (19.12.2013).
4. Wyróżnienie Rektora UŁ – w konkursie „InnoTechAkademia II BioTechScience – droga do własnych marzeń” organizowanym przez Uniwersytet Łódzki i Uniwersytet Medyczny w Łodzi (19.12.2013).

**Nagroda Rektora UŁ**

1. Nagroda Naukowa Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji pt. „*Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie próbek biologicznych na zawartość endo- i egzogennych związków siarki*” - Nagroda zespołowa I stopnia w roku 2021.
  2. Nagroda Naukowa Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji pt. „*Stworzenie narzędzi analitycznych bazujących na technikach separacyjnych do oznaczania związków ważnych biologicznie*” - Nagroda zespołowa I stopnia przyznana w roku 2019.
-

3. Nagroda Naukowa Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji pt. „Metody chromatograficzne w analizie materiału biologicznego na zawartość wybranych związków siarki”, Nagroda zespołowa I stopnia przyznana w roku 2015. Naukowa Nagroda Dziekana I stopnia za najlepszą publikację przeglądową Wydziału Chemii w roku 2015, zatytułowana "*Determination of lipoic acid in biological samples*", *Bioanalysis*, 7 (2015) 1785.

**Nagroda Dziekana Wydziału Chemii UŁ**

1. Naukowa Nagroda Dziekana I stopnia za najlepszą publikację naukową Wydziału Chemii w roku 2021, Borowczyk K., Głowacki R., *The influence of UV varnishes on the content of cysteine and methionine in women nail plates - chromatographic studies*, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3),1049 (2021).
2. Naukowa Nagroda Dziekana I stopnia za najlepszą publikację naukową Wydziału Chemii w roku 2019 - Borowczyk K., Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., Chwatko G., *Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples*, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13)3340 (2019).
3. Naukowa Nagroda Dziekana I stopnia za najlepszą publikację przeglądową Wydziału Chemii w roku 2015, zatytułowana „*Determination of lipoic acid in biological samples*”, *Bioanalysis*, 7 (2015) 1785.

**7.2. Recenzje prac i wniosków badawczych****Recenzje wniosków badawczych**

1. W roku 2021 pełniłam funkcję recenzenta wniosków projektów badawczych (Doktoranckie Granty Badawcze), składanych przez uczestników studiów doktoranckich i szkół doktorskich działających w UŁ, w ramach konkursu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza („IDUB”).

**Recenzje publikacji**

1. **Title:** *Simple, cheap and fast method for determination of isulfide bonds cleavage in nail plate*; **Journal:** *Journal of pharmacy and pharmacology*, Manuscript id jpp-18-0533, Date submitted by the author: 15-jun-2018.
  2. **Title:** *A quick and simple HPLC method for the quantification of the immunosuppressor 6-mercaptopurine in human plasma*, **Journal:** *Biomedical chromatography*, Manuscript id bmc-19-0338, Date submitted by the Author: 12-jun-2019.
  3. **Title:** *Cardioprotection of cortistatin against isoproterenol-induced myocardial injury in rats*, **Journal:** **Amino Acids**, Manuscript Number: AMAC-D-19-00101.
  4. **Title:** *Development of a new tandem ion exchange and size exclusion chromatography method to monitor vaccine particle titer in cell culture media*, **Journal:** *Analytical Chemistry*, Manuscript ID ac-2019-00095p, Date Submitted by the Author: 07-Jan-2019.
-

## Załącznik Z4

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

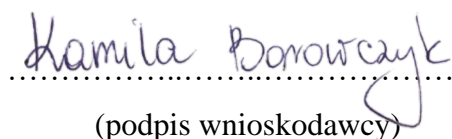
dr Kamila Borowczyk

---

5. **Title:** *Identifying a Role for the Interaction of Homocysteine and Copper in Promoting Cardiovascular Damage*, **Journal:** Amino Acids, Manuscript Number: AMAC-D-21-00014.

### Ekspertyzy

1. Opracowanie ekspertyzy dotyczącej oferty usługi możliwej do wdrożenia przez Katedrę Chemii Środowiska Wydziału Chemii w zakresie wykrywania i ilościowego oznaczania związków siarki w płynach biologicznych technikami wysokosprawnej chromatografii ciekłowej i wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej. Oferta przygotowana w roku 2013 na zlecenie Centrum Transferu Technologii UŁ.

  
.....  
(podpis wnioskodawcy)



PODPIS ZAUFANY

KAMILA JOLANTA  
BOROWCZYK

15.12.2023 12:49:31 [GMT+1]  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym



WYDZIAŁ  
CHEMII

Uniwersytet Łódzki



**Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych,  
stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny**

(załącznik Z5)

Upraszczenie procedur analitycznych dedykowanych  
chromatograficznemu oznaczaniu wybranych, biologicznie ważnych  
związków siarki

**dr Kamila Borowczyk**

Łódź, 2023

---

Informacje zawarte w poszczególnych punktach tego dokumentu powinny uwzględniać podział na okres przed uzyskaniem stopnia doktora oraz pomiędzy uzyskaniem stopnia doktora a uzyskaniem stopnia doktora habilitowanego.

## **I. WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY**

1. Monografia naukowa, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2a ustawy; lub
2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy; lub
3. Wykaz zrealizowanych oryginalnych osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych lub artystycznych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2c ustawy.

W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich zaleca się złożenie oświadczenia przez habilitanta oraz współautorów wskazujące na ich merytoryczny (a NIE procentowy) wkład w powstanie każdej pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet, itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu danego autora, w tym habilitanta, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

### **Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy zatytułowany:**

#### **Upraszczenie procedur analitycznych dedykowanych chromatograficznemu oznaczaniu wybranych, biologicznie ważnych związków siarki**

- H1 **Borowczyk, K.,** Wyszczelska-Rokiel, M., Kubalczyk, P., Głowacki, R.,  
*Simultaneous determination of albumin and low-molecular-mass thiols in plasma  
by HPLC with UV detection*  
**Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical  
and Life Sciences**, 57 (2015) 981.

IF<sub>2015</sub> = 2,687

IF<sub>2022</sub> = 3,000

MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt.

Liczba cytowań: 28

- H2 **Borowczyk K.,** Krawczyk M., Kubalczyk P., Chwatko G.,  
*Determination of lipoic acid in biological samples*  
**Bioanalysis**, 7 (2015) 1785.

IF<sub>2015</sub> = 2,813

IF<sub>2022</sub> = 1,800;

MEiN<sub>2023</sub> = 70 pkt.

Liczba cytowań: 13

- 
- H3 **Borowczyk K.\***, Chwatko G., Kubalczyk P., Jakubowski H., Kubalska J., Głowacki R.  
*Simultaneous determination of methionine and homocysteine by on-column derivatization with o-phthalaldehyde*  
**Talanta**, 161 (2016) 917-924.  
IF<sub>2016</sub> = 4,162  
IF<sub>2022</sub> = 6,1; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 24
- H4 Kamińska A., Olejarz P., **Borowczyk K.**, Głowacki R., Chwatko G.  
*Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC*  
**Journal of Separation Science**, 41 (2018) 3241–3249.  
IF<sub>2018</sub>=2,516;  
IF<sub>2022</sub> = 3,100; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. Liczba cytowań: 45
- H5 **Borowczyk K.**, Suliburska J., Jakubowski H.  
*Demethylation of methionine and keratin damage in human hair*  
**Amino Acids**, 50 (2018) 537-546.  
IF<sub>2018</sub>=2,520;  
IF<sub>2022</sub> = 3,500; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. Liczba cytowań: 10
- H6 **Borowczyk K.**, Wróblewski J., Suliburska J., Akahoshi N., Ishii I., Jakubowski H., *Mutations in homocysteine metabolism genes increase keratin N-Homocysteinylation and damage in mice*,  
**International Journal of Genomics**, Article ID 7570850, 7 pages (2018).  
IF<sub>2018</sub>=2,303;  
IF<sub>2022</sub> = 2,900; MEiN<sub>2023</sub> = 70 pkt. Liczba cytowań: 4
- H7 **Borowczyk K.\***, Olejarz P., Chwatko G.  
*Application of simultaneous separation and derivatization for the determination of  $\alpha$ -lipoic acid in urine samples by high-performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection*  
**Biomedical Chromatography**, 2019, e4576, 10 pages.  
IF<sub>2019</sub>=1,728;  
IF<sub>2022</sub> = 1,800; MEiN<sub>2023</sub> = 40 pkt. Liczba cytowań: 3
- H8 **Borowczyk K.\***, Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., Chwatko G.,  
*Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples*  
**International Journal of Molecular Sciences**, 20 (13) 3340 (2019).  
IF<sub>2019</sub>=4,556;  
IF<sub>2022</sub> = 5,600; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 2
-



- 
- H9 **Borowczyk, K.\***, Olejarz, P., Chwatko, G., Szyłberg, M., Głowacki, R.  
*A simplified method for simultaneous determination of  $\alpha$ -lipoic acid and low-molecular-mass thiols in human plasma*  
**International Journal of Molecular Sciences**, 21(3),1049 (2020).  
IF<sub>2020</sub>=5,924;  
IF<sub>2022</sub> = 5,600; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 10
- H10 **Borowczyk, K.\***, Głowacki, R.  
*The influence of UV varnishes on the content of cysteine and methionine in women nail plates - chromatographic studies*  
**International Journal of Molecular Sciences**, 21(3),1049 (2021).  
IF<sub>2021</sub>=6,208;  
IF<sub>2022</sub> = 5,600; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 1

### **Indywidualny wkład habilitantki w powstanie prac H1–H10**

- H1 **Borowczyk, K.**, Wyszczelska-Rokiel, M., Kubalczyk, P., Głowacki, R.,  
*Simultaneous determination of albumin and low-molecular-mass thiols in plasma by HPLC with UV detection*, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 57 (2015) 981.  
Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H1:  
sformułowanie koncepcji badań, wybór technik badawczych, zaplanowanie badań, wykonanie części pomiarów chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji metody, zebranie i opracowanie wyników, napisanie manuskryptu, przeprowadzenie eksperymentów wskazanych przez recenzentów pracy, udzielenie odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H2 **Borowczyk K.**, Krawczyk M., Kubalczyk P., Chwatko G., *Determination of lipoic acid in biological samples*, *Bioanalysis*, 7 (2015) 1785.  
Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy przeglądowej H2:  
przeprowadzenie analizy literaturowej dotyczącej procesów odbiałczania i ekstrakcji próbek oraz potrzeby derywatyzacji, opisanie tej części procedur, przygotowanie zestawień tabelarycznych, dyskusja ze współautorami struktury pracy, współredagowanie manuskrypt, udzielenie odpowiedzi na pytania recenzentów.
- H3 **Borowczyk K.\***, Chwatko G., Kubalczyk P., Jakubowski H., Kubalska J., Głowacki R., *Simultaneous determination of methionine and homocysteine by on-column derivatization with o-phthalaldehyde*, *Talanta*, 161 (2016) 917-924.  
\*autor korespondencyjny  
Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H3:  
sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), wybór technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie pomiarów

chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji metody, zebranie i opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

- H4 Kamińska A., Olejarz P., **Borowczyk K.**, Głowacki R., Chwatko G., *Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC*, Journal of Separation Science, 41 (2018) 3241–3249.

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H4: sformułowanie koncepcji badań optymalizacji homogenizacji tkanki miękkiej, wybór technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie części pomiarów chromatograficznych, współdział w przeprowadzeniu walidacji i opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, współdział w napisaniu manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

- H5 **Borowczyk K.**, Suliburska J., Jakubowski H., *Demethylation of methionine and keratin damage in human hair*, Amino Acids, 50 (2018) 537-546.

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H5: sformułowanie koncepcji badań hydrolizy włosów ludzi w celu oznaczenia Met i Hcy, wybór technik badawczych i detekcyjnych do oznaczenia Met i Hcy w hydrolizacie włosów, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie wszystkich pomiarów chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji i opracowanie wyników analiz chromatograficznych i ich interpretacja, współdział w przygotowaniu manuskryptu.

- H6 **Borowczyk K.**, Wróblewski J., Suliburska J., Akahoshi N., Ishii I., Jakubowski H., *Mutations in homocysteine metabolism genes increase keratin N-Homocysteinylolation and damage in mice*, International Journal of Genomics, Article ID 7570850, 7 pages (2018).

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H6: sformułowanie koncepcji badań hydrolizy sierści zwierząt w celu oznaczenia Met i Hcy, wybór technik badawczych i detekcyjnych do oznaczenia Met i Hcy w hydrolizacie włosów, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie wszystkich pomiarów chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji i opracowanie wyników analiz chromatograficznych i ich interpretacja, współdział w przygotowaniu manuskryptu.

- H7 **Borowczyk K.\***, Olejarz P., Chwatko G., *Application of simultaneous separation and derivatization for the determination of  $\alpha$ -lipoic acid in urine samples by high-performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection*, Biomedical Chromatography, 2019 ,e4576, 10 pages.
-

\*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H7: sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), wybór odczynnika derywatyzującego i technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, wykonanie pomiarów chromatograficznych, zaplanowanie etapu walidacji metody, opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

- H8 **Borowczyk K.\***, Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., Chwatko G., *Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples*, International Journal of Molecular Sciences, 20 (13) 3340 (2019).

\*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H8: sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), wybór odczynnika derywatyzującego i technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, przeprowadzenie badań doboru warunków chromatograficzno-detekcyjnych, pozyskanie próbek biologicznych, zaplanowanie etapu walidacji metody, opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

- H9 **Borowczyk, K.\***, Olejarz, P., Chwatko, G., Szyłberg, M., Głowacki, R., *A simplified method for simultaneous determination of  $\alpha$ -lipoic acid and low-molecular-mass thiols in human plasma*, International Journal of Molecular Sciences, 21(3),1049 (2020).

\*autor korespondencyjny

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H9: sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), wybór technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, przeprowadzenie badań chromatograficznych, zaplanowanie etapu walidacji metody, opracowanie wyników, dyskusja ze współautorami nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

- H10 **Borowczyk, K.\***, Głowacki, R., *The influence of UV varnishes on the content of cysteine and methionine in women nail plates - chromatographic studies*, International Journal of Molecular Sciences, 21(3),1049 (2021).

\*autor korespondencyjny

---

Mój indywidualny wkład włożony w powstanie pracy eksperymentalnej H8: sformułowanie koncepcji badań (pomysłodawca pracy), pozyskanie zgód na badania na materiale biologicznym, wybór technik badawczych, zaplanowanie kolejności badań, zaplanowanie sposobu pobierania próbek, pobranie próbek biologicznych, przeprowadzenie pomiarów chromatograficznych, przeprowadzenie walidacji metody, opracowanie wyników, dyskusja ze współautorem nad interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, współredagowanie odpowiedzi udzielonych na pytania recenzentów.

## II. WYKAZ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1).

Brak

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

Brak

3. Wykaz członkostwa w redakcjach naukowych monografii.

Brak

4. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.2).

*Autor korespondencyjny został oznaczony symbolem\**

*IF zostały podane zgodnie z rokiem opublikowania artykułu, punkty MEiN zostały podane zgodnie z rokiem złożenia wniosku habilitacyjnego*

### Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

- P1 Głowacki R., **Borowczyk K.**, Bald E., Jakubowski H.,  
*On-column derivatization with o-phthaldialdehyde for fast determination of homocysteine in human urine,*  
**Analytical Bioanalytical Chemistry**, 396 (6) (2010) 2363-2366.  
**IF<sub>2010</sub> = 3,841; MEiN<sub>2023</sub> = 100** **Liczba cytowań: 16**
- P2 Głowacki R., **Borowczyk K.**, Bald E.,  
*Fast analysis of wine for total homocysteine content by high performance liquid chromatography,*  
**Amino Acids**, 42 (2012) 247-251.  
**IF<sub>2012</sub> = 3,914; MEiN<sub>2023</sub> = 100** **Liczba cytowań: 9**
- P3 **Borowczyk K.**, Tisończyk J., Jakubowski H.,  
*Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase,*  
**Amino Acids**, 43 (2012) 1339-1348.  
**IF<sub>2012</sub> = 3,914; MEiN<sub>2023</sub> = 100** **Liczba cytowań: 34**

- 
- P4 **Borowczyk K.**, Shih D. M., Jakubowski H.,  
*Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase 1,*  
**Journal of Alzheimers Disease**, 30 (2012) 225-231.  
IF<sub>2012</sub> = 4.174; MEiN<sub>2023</sub> = 100 Liczba cytowań: 50

### Publikacje w czasopismach o zasięgu krajowym opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

1. Borowczyk K., Bald E., *Kobiety, wino i ... nowotwory*, **Kronika UŁ**, 4-5/2009.

### Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora (publikacje wchodzące w skład osiągnięcia wymienionego w pkt. I zaznaczyłam kolorem szarym)

\*autor korespondencyjny

- P5 Zakrzewski R., **Borowczyk K.**, Łuczak A., Młynarski W., Trelińska J.,  
*Determination of urinary 6-mercaptopurine and three of its metabolites by HPLC-UV coupled with the iodine-azide reaction,*  
**Bioanalysis**, 5 (2013) 869-877.  
IF<sub>2013</sub> = 3,027; MEiN<sub>2013</sub> = 70 pkt. Liczba cytowań: 10
- P6 Głowacki R., **Borowczyk K.**, Bald E.,  
*Determination of Nε-homocysteinyllysine and γ-glutamylcysteine in plasma by liquid chromatography with UV detection,*  
**Journal of Analytical Chemistry**, 69 (2014) 583-589.  
IF<sub>2014</sub> = 0,479; MEiN<sub>2023</sub> = 40 pkt. Liczba cytowań: 5
- P7 Chwatko G., Kuźniak E., Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, Wyszczelska-Rokiel M., Głowacki R.,  
*Determination of cysteine and glutathione in cucumber leaves by HPLC with UV detection,*  
**Analytical Methods**, 6 (2014) 8039-8044.  
IF<sub>2014</sub> = 1,821; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. Liczba cytowań: 52
- P8 Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, Chwatko G., Głowacki R.,  
*Simple micellar electrokinetic chromatography method for the determination of hydrogen sulfide in hen tissues,*  
**Electrophoresis**, 36 (2015) 1028-1032.  
IF<sub>2015</sub> = 2,482; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. Liczba cytowań: 14
- P9 Antosik A., Czubak K., Gajek A., Marczak A., Głowacki R., **Borowczyk K.**, Żbikowska H.M.,  
*Influence of pre-storage irradiation on the oxidative stress markers, membrane integrity, size and shape of the cold stored red blood cells,*  
**Transfusion Medicine and Hemotherapy**, 42 (2015) 140-148.  
IF<sub>2015</sub> = 2,160; MEiN<sub>2023</sub> = 70 pkt. Liczba cytowań: 14
-

- 
- P10 Szlauer A., Mielimonka A., Głowacki R., **Borowczyk K.**, Stachniuk J., Undas A., *Protein N-linked homocysteine is associated with recurrence of venous thromboembolism*, **Thrombosis Research**, 136 (2015) 911-916.  
IF<sub>2015</sub> = 2,320; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. **Liczba cytowań: 7**
- H1 **Borowczyk K.**, Wyszczelska-Rokiel, M., Kubalczyk, P., Głowacki, R., *Simultaneous determination of albumin and low-molecular-mass thiols in plasma by HPLC with UV detection* **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 57 (2015) 981.  
IF<sub>2015</sub> = 2,687, MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. Liczba cytowań: 28
- H2 **Borowczyk K.**, Krawczyk M., Kubalczyk P., Chwatko G., *Determination of lipoic acid in biological samples* **Bioanalysis**, 7 (2015) 1785.  
IF<sub>2015</sub> = 2,813, MEiN<sub>2023</sub> = 70 pkt. Liczba cytowań: 13
- P11 Głowacki R., Furmaniak P., Kubalczyk P., **Borowczyk K.\***, *Determination of total apigenin in herbs by micellar electrokinetic chromatography with UV detection*, **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, (2016) 3827832, 8 pages.  
IF<sub>2016</sub> = 1,801; MEiN<sub>2023</sub> = 40 pkt. **Liczba cytowań: 11**
- P12 Głowacki R., Stachniuk J., **Borowczyk K.**, Jakubowski H., *Quantification of homocysteine and cysteine by derivatization with pyridoxal 5'-phosphate and hydrophilic interaction liquid chromatography*, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 408 (2016) 1935-1941.  
IF<sub>2016</sub> = 3,431; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. **Liczba cytowań: 16**
- P13 Głowacki R., Stachniuk J., **Borowczyk K.**, *A simple HPLC-UV method for simultaneous determination of cysteine and cysteinylglycine in biological fluids*, **Acta Chromatographica**, 28 (2016) 333-346.  
IF<sub>2016</sub> = 0,755; MEiN<sub>2023</sub> = 40 pkt. **Liczba cytowań: 18**
- H3 **Borowczyk K.\***, Chwatko G., Kubalczyk P., Jakubowski H., Kubalska J., Głowacki R., *Simultaneous determination of methionine and homocysteine by on-column derivatization with o-phthaldialdehyde* **Talanta**, 161 (2016) 917-924.  
IF<sub>2016</sub> = 4,162, MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 25
- P14 Wrońska M., Chwatko G., **Borowczyk K.**, Piechocka J., Kubalczyk P., Głowacki R., *Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine*, **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 1099 (2018) 18-24.  
IF<sub>2018</sub> = 2,813; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. **Liczba cytowań: 10**
-

- 
- P15 Perla-Kajan J., **Borowczyk K.**, Głowacki R., Nygard O., Jakubowski H., *Paraoxonase 1 Q192R genotype and activity affect homocysteine thiolactone levels in humans*, **FASEB Journal**, 32(11) (2018) 6019-6024.  
IF<sub>2018</sub>=5.391; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. **Liczba cytowań: 22**
- H4 Kamińska A., Olejarz P., **Borowczyk K.**, Głowacki R., Chwatko G. *Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC* **Journal of Separation Science**, 41 (2018) 3241–3249.  
IF<sub>2018</sub>=2,516; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. Liczba cytowań: 45
- H5 **Borowczyk K.**, Suliburska J., Jakubowski H. *Demethylation of methionine and keratin damage in human hair* **Amino Acids**, 50 (2018) 537-546.  
IF<sub>2018</sub>=2,520; MEiN<sub>2023</sub> = 100 pkt. Liczba cytowań: 10
- H6 **Borowczyk K.**, Wróblewski J., Suliburska J., Akahoshi N., Ishii I., Jakubowski H., *Mutations in homocysteine metabolism genes increase keratin N-Homocysteinylation and damage in mice*, **International Journal of Genomics**, Article ID 7570850, 7 pages (2018).  
IF<sub>2018</sub>=2,303; MEiN<sub>2023</sub> = 70 pkt. Liczba cytowań: 4
- P16 Purgat K., **Borowczyk K.**, Zakrzewski R., Głowacki R., Kubalczyk P., *Determination of nikethamide by micellar electrokinetic chromatography*, **Biomedical Chromatography**, 2019, e4571, 10 pages.  
IF<sub>2019</sub>=1.728; MEiN<sub>2023</sub> = 40 pkt. **Liczba cytowań: 0**
- P17 **Borowczyk K.**, Piechocka J., Głowacki R., Dhar I., Midtun Ø., Tell G.S., Ueland P.M., Nygård O., Jakubowski H., *Urinary excretion of homocysteine thiolactone and the risk of acute myocardial infarction in coronary artery disease patients; the WENBIT trial*, **Journal of Internal Medicine**, 285 (2019) 232-244.  
IF<sub>2019</sub>=6.871; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. **Liczba cytowań: 33**
- H7 **Borowczyk K.\***, Olejarz P., Chwatko G. *Application of simultaneous separation and derivatization for the determination of α-lipoic acid in urine samples by high-performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection* **Biomedical Chromatography**, 2019, e4576, 10 pages.  
IF<sub>2019</sub>=1,728; MEiN<sub>2023</sub> = 40 pkt. Liczba cytowań: 3
- H8 **Borowczyk K.\***, Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., Chwatko G., *Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples* **International Journal of Molecular Sciences**, 20 (13) 3340 (2019).  
IF<sub>2019</sub>=4,556; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 2
-

- 
- P18 Gątarek, P., Rosiak, A., **Borowczyk K.**, Głowacki, R., Kałużna-Czaplińska, J., *Higher levels of low molecular weight sulfur compounds and homocysteine thiolactone in the urine of autistic children*, **Molecules**, 25(4), 973 (2020).  
IF<sub>2020</sub>=4.412; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 6
- P19 Olejarz, P., Chwatko, G., Kubalczyk, P., Purgat, K., Głowacki, R., **Borowczyk K.\***, *Application of high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of tenofovir and creatinine in human urine and plasma samples*, **Pharmaceuticals**, 13(11), 367 (2020) 1-12.  
IF<sub>2020</sub>=5.863; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 2
- H9 **Borowczyk, K.\***, Olejarz, P., Chwatko, G., Szyłberg, M., Głowacki, R.  
*A simplified method for simultaneous determination of  $\alpha$ -lipoic acid and low-molecular-mass thiols in human plasma*  
**International Journal of Molecular Sciences**, 21(3),1049 (2020).  
IF<sub>2020</sub>=5,924; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 10
- H10 **Borowczyk, K.\***, Głowacki, R.  
*The influence of UV varnishes on the content of cysteine and methionine in women nail plates - chromatographic studies*  
**International Journal of Molecular Sciences**, 21(3),1049 (2021).  
IF<sub>2021</sub>=6,208; MEiN<sub>2023</sub> = 140 pkt. Liczba cytowań: 1
- P20 Festinger, N., Spilarewicz-Stanek, K., **Borowczyk, K.**, Guziejewski, D., Smarzewska, S.,  
*Highly sensitive determination of tenofovir in pharmaceutical formulations and patients urine—comparative electroanalytical studies using different sensing methods*,  
**Molecules**, 27(6), 1992 (2022),  
IF<sub>2021</sub>= 4.927; MEiN<sub>2023</sub>=140 pkt. Liczba cytowań: 6
- P21 Witucki Ł.,**Borowczyk K.**, Suszyńska-Zajczyk J.,Warzych E., Pawlak P., Jakubowski H., *Deletion of the homocysteine thiolactone detoxifying enzyme bleomycin hydrolase, in mice, causes memory and neurological deficits and worsens alzheimer's disease-related behavioral and biochemical traits in the 5xFAD model of Alzheimer's disease*,  
**Journal of Alzheimer's Disease**, 95 (2023) 1735–1755.  
IF<sub>2021</sub>= 4.927; MEiN<sub>2023</sub>=140 pkt. Liczba cytowań: 0

### Publikacje w czasopismach o zasięgu krajowym

- PK1 Borowczyk K., Wrońska M., Piechocka J., Głowacki R., *Derywatyżacja w kolumnie – możliwości i ograniczenia*, **Analityka**, 2 (2018) 8-14.



5. Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).  
Brak
6. Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).  
Brak
7. Wykaz wystąpień na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

**Wykaz konferencji naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora***Konferencje międzynarodowe – I*

- 11 **Borowczyk K.**, Banasik K., Chwatko G., Głowacki R., Jakubowski H., *Determination of homocysteine and cysteine in hair by high performance liquid chromatography*, 29<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography, ISC 2012, Toruń, Polska, 9 – 13 wrzesień 2012; materiały konferencyjne S2–P12 (Plakat)
  - 12 Chwatko G., Jurczyk B., Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, Wyszczelska M., Bald E., Głowacki R., *Determination of lipoic acid in the human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. 29<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography, ISC 2012, 9 – 13 wrzesień 2012, Toruń, Polska, materiały konferencyjne S2–P13 (Plakat)
  - 13 **Borowczyk K.**, Głowacki R., Bald E., *Analysis of plasma for homocysteine and related metabolites by high performance liquid chromatography*, 25<sup>th</sup> International Symposium on the Organic Chemistry of Sulfur, Częstochowa, Polska, 24 – 29 czerwiec, 2012; materiały konferencyjne OC – B – 16 (Komunikat)
  - 14 **Borowczyk K.**, Głowacki R., Wyszczelska M., Żmudziński E., Bald E., *Determination of Nε-homocysteinyllysine isopeptide by HPLC with fluorescence detection*, 25<sup>th</sup> International Symposium on the Organic Chemistry of Sulfur, Częstochowa, Polska, 24-29 czerwiec 2012; materiały konferencyjne PC–05 (Plakat)
  - 15 **Borowczyk K.**, Jakubowski J., *N-Homocysteinylolation of hair keratin causes damage in humans and animals*, Advances and Controversies in B-Vitamins and Choline, Leipzig, Niemcy, 5 – 8 marzec 2012; Clin. Chem. Lab. Med. P6 15 (Plakat)
  - 16 **Borowczyk K.**, Tisonczyk J., Jakubowski H., *Changes in homocysteine-thiolactone disposition and toxicity in bleomycin hydrolase (Blmh) and paraoxonase 1 (Pon1) knock-out mice*, 2<sup>nd</sup> Congress of Biochemistry and Cell Biology, 5 – 9 wrzesień 2011, Kraków, Poland, materiały konferencyjne L22.2 (Komunikat)
-

- I7 Chwatko G., **Borowczyk K.**, Kubalczyk P., Głowacki R., Bald E., *Simple procedures for determination of various sulfur compounds in biological samples by liquid chromatography and capillary electrophoresis after ultraviolet derivatization*, 2<sup>nd</sup> Congress of Biochemistry and Cell Biology, Kraków, Polska, 5 – 9 wrzesień, 2011; materiały konferencyjne P22.4 (Plakat)
- I8 **Borowczyk K.**, Jakubowski H., *N-Homocysteinylation causes hair keratin damage in humans and animals*, 2<sup>nd</sup> Congress of Biochemistry and Cell Biology, Kraków, Polska, 5 – 9 wrzesień, 2011; materiały konferencyjne P22.5 (Plakat)
- I9 Głowacki R., **Borowczyk K.**, Bald E., *Determination of homocysteine redox status in urine by liquid chromatography*, 11<sup>th</sup> International Congress on Amino Acid, peptides and Protein, Wiedeń, Austria, 3 - 7 sierpień 2009, Amino Acids 37 (2009), S84, supplement 1 (Plakat)

*Konferencje krajowe – N*

- N1 **Borowczyk K.**, *Homocysteina jako składnik białek człowieka i innych ssaków – badania chromatograficzne*; III Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, Polska, 12 czerwiec, 2012, materiały konferencyjne K – 1 (Komunikat)
- N2 Zakrzewski R., **Borowczyk K.**, Łuczak A., Młynarski W., Trelińska J., *Metoda HPLC-UV połączona z pokolumnową reakcją jodo-azydkową do oznaczania 6-merkaptopuryny w moczu dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną*, IX Konferencja Chromatograficzna; Chromatografia ? To przecież codzienność !, Poznań, Polska, 26 – 29 czerwiec 2011; materiały konferencyjne K 43 (Komunikat)
- N3 **Borowczyk K.**, Głowacki R., Bald E., *Żywność a homocysteina*, 52. Zjazd PTChem i SITPchem, Łódź, 12 – 16 wrzesień 2009, materiały konferencyjne OC – 06 – 07. (Komunikat)
- N4 Głowacki R., **Borowczyk K.**, Bald E., *Aldehyd o-ftalowy jako efektywny odczynnik do derywatyzacji w kolumnie chromatograficznej*, 52. Zjazd PTChem i SITPchem, Łódź, Polska, 12 – 16 wrzesień, 2009, materiały konferencyjne PC – 05 – 08, A 150 (Plakat)
- N5 Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, Bald E., *Zastosowanie spiętrzania w kapilarze do oznaczania tioli*, 52. Zjazd PTChem i SITPchem, Łódź, Polska, 12 – 16 wrzesień 2009; materiały konferencyjne PC – 05 – 09, A 151 (Plakat)
- N6 Głowacki R., **Borowczyk K.**, Bald E., *Oznaczanie homocysteiny w winie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, IV Konferencja Chromatograficzna – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, Polska, 8 – 9 kwiecień 2009; materiały konferencyjne P – 10 (Plakat)
-

**Wykaz konferencji naukowych po uzyskaniu stopnia doktora***Konferencje międzynarodowe – I*

- I10 Bretes E., Utyro O., Perła-Kaján J., **Borowczyk K.**, Piechocka J., Głowacki R., Kaźmierski R., Jakubowski H., *Associations of homocysteine-thiolactone, cysteinyl-glycine, and cysteine with stroke*, 13<sup>th</sup> International conference one-carbon metabolism, B vitamins and homocysteine, Poznań, Polska, 12-16.09.2021, materiały konferencyjne str. 47 (Komunikat).
- I11 **Borowczyk K.**, Piechocka J., Chwatko G., Kubalczyk P., Głowacki R., *Homocysteine determination and single-use plastic laboratory waste*, 13<sup>th</sup> International conference one-carbon metabolism, B vitamins and homocysteine, Poznań, Polska, 12-16.09.2021, materiały konferencyjne str. 115 (Plakat)
- I12 **Borowczyk K.**, *Simplification of the analytical protocols dedicated to chromatographic determination of biologically important sulphur compounds*, QUO VADIS Life Sciences, 23 – 27.06.2021, Opole, Polska, materiały konferencyjne OP15\_V (Komunikat)
- I13 Borowczyk K., Osmolak M., Piechocka J., *Determination of N-acetylhomocysteine by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection in the form of S-quinolinium derivative*, Homocysteine Mini-Conference Poznań 2020, Poznań, Polska, 25.09.2020, materiały konferencyjne str. 12 (Komunikat),
- I14 Bretes E., Utyro O., Perła-Kaján J., **Borowczyk K.**, Głowacki R., Kaźmierski R., Jakubowski H., *Opposite associations of cysteine and cysteinylglycine with stroke*, Homocysteine Mini-Conference Poznań 2020, Poznań, Polska, 25.09.2020, materiały konferencyjne str. 11 (Komunikat)
- I15 Witucki Ł., **Borowczyk K.**, Suszyńska-Zajczyk J., Wróblewski J., Jakubowski H., *Phf8- mediated epigenetic dysregulation of mTOR signaling/autophagy increases amyloid beta level and cognitive deficits in hyperhomocysteinemic and bleomycin hydrolase-deficient mice*, Fifth Annual Rutgers Brain Health Institute Symposium, 01.11.2019, Nokia Bell Labs, Murray Hill, NJ, USA, Poster #23 (Plakat)
- I16 **Borowczyk K.**, Olejarz P., Chwatko G., *The simplified method for simultaneous determination of  $\alpha$ -lipoic acid and low-molecular-mass thiols in human plasma*, 25<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, Polska, 15-18 wrzesień 2019, materiały konferencyjne OP12 (Komunikat),
- I17 Olejarz P., Frączak K., Chwatko G., Głowacki R., **Borowczyk K.**, *The use of light-cured nail polish on nail plates condition – chromatographic studies*, 25<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, Polska, 15-18 wrzesień 2019, materiały konferencyjne FT05 (flash talk),
-

- I18 Olejarz P., Chwatko G., **Borowczyk K.**, *Modern methods for the determination of selected antiviral drugs in HIV / HBV therapy*, 25<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, Poland, 15-18 wrzesień 2019, materiały konferencyjne PP45 (Plakat).
- I19 Olejarz P., Chwatko G., Głowacki R., **Borowczyk K.**, *A simplified method for the determination of lipoic acid other thiol amino acids in human plasma*, 41<sup>st</sup> Symposium Chromatographic Methods of Investigating Organic Compounds, 19 – 22.06.2018, Szczyrk, Polska (Plakat)
- I20 Perła-Kajan J., **Borowczyk K.**, Bakker S.J.L., Jakubowski H., *Paraoxonase I activity affects homocysteine thiolactone level in humans/renal transplant recipients*, FASEB Conference on “Folic Acid, Vitamin B12, and One-Carbon Metabolism”, 30 lipiec – 3 sierpień, 2018, Western Shore, Nova Scotia, BOJ3MO (Komunikat)
- I21 Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., **Borowczyk K.**, Chwatko G., *A novel, fast and simple method based on on-column derivatization for the determination of lipoic acid in urine samples*, New Trends on Sensing- Monitoring- Telediagnosis for Life Sciences, 30 sierpień – 01 wrzesień 2018, Brasov, Rumunia (Komunikat)
- I22 Kamińska A., Olejarz P., **Borowczyk K.**, Chwatko G., *Determination of lipoic acid and lipoyllysine in plant tissues*, New Trends on Sensing- Monitoring- Telediagnosis for Life Sciences, 30 sierpień – 01 wrzesień 2018, Brasov, Rumunia (Komunikat)
- I23 Purgat K., Kubalczyk P., Białek J.A., **Borowczyk K.**, Zakrzewski R., Głowacki R., *Determination of cardiamid in pharmaceutical formulation by micellar electrokinetic chromatography*, 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase - Separation Techniques and 11<sup>th</sup> Polish Conference on Chromatography, Sopot/Gdańsk, Polska, 10-13 wrzesień 2017, materiały konferencyjne P129, p. 233 (Plakat)
- I24 Chwatko G., Kamińska A., Olejarz P., Krawczyk-Walach M. J., Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, *Determination of thiols in brain homogenates by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques and 11th Polish Conference on Chromatography, Sopot/Gdańsk, Polska, 10-13 wrzesień 2017, materiały konferencyjne P97, p. 201. (Plakat)
- I25 Olejarz P., Głowacki R., **Borowczyk K.**, Chwatko G., Kamińska A., Kubalczyk P., *On-column derivatization with o-phthaldialdehyde for fast determination of N-acetylcysteine and glutathione in brain tissues*, 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques and 11th Polish Conference on Chromatography, Sopot/Gdańsk, Polska, 10-13 wrzesień 2017, materiały konferencyjne P127 str. 231 (Plakat)
-

- 
- I26 Borowczyk K., Głowacki R., *The relationship between cysteine content and a body aging process*, Limits of Knowledge - International Scientific Conference Humboldt-Kolleg, 22-25 czerwiec 2017, materiały konferencyjne: P17-LS, p. 183 (Komunikat + Plakat)
- I27 Perła-Kajan J., **Borowczyk K.**, Głowacki R., Nygård O., Ueland P.M., Jakubowski H., *Paraoxonase 1 protects against homocysteine-thiolactone accumulation in humans*, 11<sup>th</sup> International Conference on Homocysteine & One-Carbon Metabolism, Aarhus, Dania, 14 - 18 maj 2017, materiały konferencyjne: O-60, p. 57 (Komunikat)
- I28 **Borowczyk K.**, Jakubowski H., *Methionine demethylation and protein damage: time-dependent accumulation of homocysteine in human hair keratin*, 11<sup>th</sup> International Conference on Homocysteine & One-Carbon Metabolism, Aarhus, Dania, 14 - 18 maj 2017, materiały konferencyjne: P-40, p. 93 (Plakat)
- I29 Stachniuk J., **Borowczyk K.**, Głowacki R., *Application of green chromatography for determination of endogenic thiols*, 27<sup>th</sup> International Symposium on Organic Chemistry of Sulfur, Jena, Niemcy, 24 – 29 lipiec 2016, materiały konferencyjne: PGW-19, p. 94 (Komunikat)
- I30 **Borowczyk K.**, Chwatko G., Kubalczyk P., Głowacki R., *HPLC-FLD method based on an on-column derivatization for simultaneous determination of methionine and homocysteine in biological fluid samples*, 18<sup>th</sup> International Symposium on advances in extraction technologies and 22<sup>nd</sup> International Symposium on Separation Science, 3 – 6 lipiec 2016, Toruń, Polska, materiały konferencyjne: S1-P11, p.115 (Plakat)
- I31 **Borowczyk K.**, Krawczyk M., Kamińska A., Kubalczyk P., Chwatko G., *Application of liquid chromatography with UV detection for determination of different forms of lipoic acid in human plasma*, 18<sup>th</sup> International Symposium on advances in extraction technologies and 22<sup>nd</sup> International Symposium on Separation Science, 3 – 6 lipiec 2016, Toruń, Polska, materiały konferencyjne: S1-P12, p. 116 (Plakat)
- I32 **Borowczyk K.**, Stachniuk J., Kubalczyk P., Chwatko G., Głowacki R., *Chromatographic studies on reactivity of pyridoxal 5'-phosphate towards N-homocysteinyllated albumin and N-homocysteinyllysine*, 18<sup>th</sup> International Symposium on advances in extraction technologies and 22<sup>nd</sup> International Symposium on Separation Science, 3 – 6 lipiec 2016, Toruń, Polska, materiały konferencyjne: S1-P35, p. 140 (Plakat)
- I33 Furmaniak P., Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, Chwatko G., Głowacki R., *MEKC method for determination of mesna in human plasma with in-capillary derivatization and UV detection*, 18<sup>th</sup> International Symposium on advances in extraction technologies and 22<sup>nd</sup> International Symposium on Separation Science, 3 – 6 lipiec 2016, Toruń, Polska, materiały konferencyjne: S1-P36, p. 141 (Plakat)
-

- 
- I34 **Borowczyk K.**, *N-Homocysteinylation as a damage factor of structure and functions of keratins – a potential relationship with aging*, 10<sup>th</sup> International Congress of Societas Humboldtiana Polonorum – Longevity – a blessing or curse? Medical, technological, cultural, socio-economic and legal aspects., Łódź, Polska, 30 czerwiec – 2 lipiec 2016, materiały konferencyjne: p. 58 (Komunikat)
- I35 Jakubowski H., **Borowczyk K.**, Głowacki R., Nygård O., *Urinary Homocysteine Thiolactone Predicts Acute Myocardial Infarction in a Randomized Controlled Homocysteine-lowering B-vitamin Trial*, American Heart Association's 2015 Scientific Sessions and Resuscitation Science Symposium, Orlando, Floryda, USA, 7 – 11 listopad 2015 (Komunikat).
- I36 **Borowczyk K.**, Głowacki R., Nygård O., Jakubowski H., *Homocysteine-thiolactone and cardiovascular disease in B-vitamin trials*, 10<sup>th</sup> International Conference of One Carbon Metabolism, Vitamins B and Homocysteine, Nancy, Francja, 7 – 11 lipiec 2015, materiały konferencyjne: p. 51 (Komunikat)
- I37 **Borowczyk K.**, Jakubowski H., Głowacki R., *Correlations between sulfur-containing amino acids and albumin in human plasma*, 10<sup>th</sup> International conference of One Carbon Metabolism, Vitamins B and Homocysteine, Nancy, Francja, 7 – 11 lipiec 2015, materiały konferencyjne: P20, p. 64 (Plakat)
- I38 Głowacki R., Stachniuk J., Chwatko G., **Borowczyk K.**, Jakubowski H., *Determination by liquid chromatography of homocysteine and cysteine in human plasma in the form of their thiazine and thiazolidine derivatives*, 21<sup>st</sup> International Symposium on Separation Sciences, Ljubljana, Słowenia, 30 czerwiec – 3 lipiec 2015, materiały konferencyjne: P21, 83 (Plakat)
- I39 Chwatko G., Krawczyk M., **Borowczyk K.**, Kubalczyk P., Głowacki R., *A study on the estimation of labile sulfur compounds by high performance liquid chromatography*, 21<sup>st</sup> International Symposium on Separation Sciences, Ljubljana, Słowenia, 30 czerwiec – 3 lipiec 2015, materiały konferencyjne: P22, p. 84 (Plakat)
- I40 Furmaniak P., Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, Głowacki R. *Determination of homocysteine thiolactone in urine by field amplified sample injection and sweeping MEKC method with UV detection*. 20<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, ISSS 2014, 30 sierpień – 2 wrzesień 2014, Praga, Czechy, materiały konferencyjne P81 (Plakat)
- I41 **Borowczyk K.**, Wyszczelska-Rokiel M., Stachniuk J., Chwatko G., Głowacki R., *Application of liquid chromatography with UV detection for determination of plant growth regulation in common plant fertilizers*, 20<sup>th</sup> International Symposium on separation science, ISSS 2014, 30 sierpień – 2 wrzesień 2014, Praga, Czechy, materiały konferencyjne P121 (Plakat)
- I42 Tisończyk J., **Borowczyk K.**, Drozd R., *Free light chains conjugated cysteinylglycine as an indicator of impaired thiol metabolism in multiple myeloma*
-

*affecting physical properties of potentially amyloidogenic proteins*, 22<sup>nd</sup> International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC Worldlab 2014, Istanbul, Turcja, 22 - 26 czerwiec 2014, materiały konferencyjne, cod: 1315 (Plakat)

**I43 Borowczyk K.**, Furmaniak P., Kubalczyk P., Głowacki R., *Application of various on-capillary stacking techniques for determination of homocysteine thiolactone*, 39<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, Holandia, 16 - 20 czerwiec 2013, materiały konferencyjne CEPH03\_WE (Plakat)

**I44 Borowczyk K.**, Bald E., Głowacki R., *Determination of enzymatic degradation products of N-homocysteinylated proteins in plasma by high performance liquid chromatography*, 39<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, Holandia, 16 - 20 czerwiec 2013, materiały konferencyjne SAMP02\_TU (Plakat).

#### *Konferencje krajowe – N*

**N7 Borowczyk K.**, *Application of HPLC-UV method for the determination of N-acetylhomocysteine in the form of S-quinolinium derivative*, 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, Polska, 13-17 wrzesień 2021, materiały konferencyjne S05 P013 (Plakat).

**N8 Waligórski M., Borowczyk K.**, *Optymalizacja parametrów analitycznych w oznaczaniu N-związanej homocysteiny w białkach obecnych w krwi*, materiały konferencyjne EP-S1-05 (Plakat).

**N9 Borowczyk K.**, Osmolak M., Piechocka J., *Determination of N-acetylhomocysteine by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection in the form of S-quinolinium derivative*, Homocysteine Mini-Conference Poznań 2020, 25 wrzesień 2020, materiały konferencyjne: str. 12 (Komunikat)

**N10 Apalczyk D., Borowczyk K.**, *Weryfikacja i modyfikacja instrukcji laboratoryjnej - homogenizacja próbek stałych*, X Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, 04 czerwiec 2019, materiały konferencyjne: S4-P74 (Plakat).

**N11 Olejarz P., Borowczyk K., Chwatko G.**, *A simple method for simultaneous determination of tenofovir and creatinine in human plasma and its application to toxicity monitoring*, VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 09-10 maj 2019 Łódź, Polska (Plakat).

**N12 Waligórski M., Borowczyk K., Głowacki R.**, *Porównanie wybranych metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny w próbkach moczu*, XLVIII Ogólnopolska szkoła chemii „Pod strzechą chemii”, Karczowiska, 28 kwiecień - 02 maj 2018, materiały konferencyjne str. 116 (Plakat).

---

- N13 Frątczak K., **Borowczyk K.**, *Wpływ lakierów hybrydowych powszechnie stosowanych w kosmetyce na zawartość aminokwasów siarkowych w płytce paznokcia*, IX Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, 21 czerwiec 2018, materiały konferencyjne P-22 (Plakat).
- N14 Olejarsz P., Chwatko G., Kubalczyk P., Głowacki R., **Borowczyk K.**, *Oznaczanie tenofoviru i kreatyniny w próbkach moczu techniką chromatografii cieczowej*, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, 01 – 05 lipiec 2018, Lublin, Polska (Plakat).
- N15 Chwatko G., Kamińska A., Olejarsz P., **Borowczyk K.**, *Rola przygotowania próbki biologicznej w kontekście analizy chromatograficznej*, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, 01 – 05 lipiec 2018, Lublin, Polska (Plakat).
- N16 Kamińska A., Olejarsz P., **Borowczyk K.**, Chwatko G., *Oznaczanie wybranych związków siarki w produktach spożywczych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, XXIII Konferencja Nowoczesne metody instrumentalne w analizie śladowej, Kraków, Polska, 10-11 grudzień 2018 (Plakat).
- N17 Wojna A., **Borowczyk K.**, *Homocysteinyłacja jako czynnik zmian właściwości i funkcji kolagenu*, Zjazd Zimowy SSPTChem 2017, Bydgoszcz, Polska, 8-9 grudzień 2017, materiały konferencyjne p. 97 (Plakat).
- N18 Kamińska A., **Borowczyk K.**, Olejarsz P., Chwatko G., *Wykorzystanie derywatywacji w kolumnie do oznaczania metioniny i homocysteiny w homogenatach mózgu*, VI Ogólnopolska Konferencja Pomiędzy Naukami, Chorzów, Polska, 15 wrzesień 2017, materiały konferencyjne B2, p. 26. (Komunikat).
- N19 Olejarsz P., Głowacki R., **Borowczyk K.**, Chwatko G., *Narzędzia analityczne wykorzystywane do ilościowego oznaczania kwasu liponowego w matrycach biologicznych*, VI Ogólnopolska Konferencja Pomiędzy Naukami, Chorzów, Polska, 15 wrzesień 2017, materiały konferencyjne P81, p. 86 (Plakat).
- N20 Wyka K., Chwatko G., Olejarsz P., **Borowczyk K.**, *Oznaczanie leków tiolowych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, VIII Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, Polska, 22 czerwiec 2017, materiały konferencyjne: S01-P19, p. 36. (Plakat)
- N21 Olejarsz P., Wyka K., Głowacki R., **Borowczyk K.**, Chwatko G., *Derywatywacja w kolumnie jako narzędzie do oznaczania N-acetylocysteiny w próbkach moczu*, V Łódzkie sympozjum doktorantów chemii, Łódź, Polska, 11 – 12 maj 2017, materiały konferencyjne: P – 89, p. 155. (Plakat)
-



- 
- N22 **Borowczyk K.**, Chwatko G., Kubalczyk P., Piechocka J., Głowacki R., *Trudności w przygotowaniu próbek osocza do oznaczania homocysteiny związanej z białkiem wiązaniem amidowym*, X Jubileuszowa Konferencja Analityczne Zastosowania Chromatografii Cieczowej, 20-21 październik 2016, Warszawa, Polska, materiały konferencyjne: PO-09, p. 41 (Plakat).
- N23 Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, Piechocka J., Chwatko G., Głowacki R., *Zastosowanie elektroforezy kapilarnej do oznaczania kwasu liponowego w moczu*, X Jubileuszowa Konferencja Analityczne Zastosowania Chromatografii Cieczowej, 20-21 październik 2016, Warszawa, Polska, materiały konferencyjne: PO-10, p. 42. (Plakat)
- N24 Sobucka M., Chwatko G., **Borowczyk K.**, *Opracowanie metody oznaczania cysteiny w blaszkach paznokcia*, VII Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, 21 czerwiec 2016, Łódź, Polska, materiały konferencyjne: S01-P17, p. 38. (Plakat)
- N25 **Borowczyk K.**, Chwatko G., Kubalczyk P., Głowacki R., *Wady i zalety prowadzenia derywatywacji w kolumnie chromatograficznej*, 7 Konferencja Chromatograficzna – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, Polska, 11 – 13 maj 2016, materiały konferencyjne: K-13, p. 35. (Komunikat)
- N26 Obudzińska K., Kamińska A., Krawczyk M.J., **Borowczyk K.**, Chwatko G., *Oznaczanie kwasu liponowego w tkankach roślinnych techniką HPLC*, 7 Konferencja Chromatograficzna – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, Polska, 11 – 13 maj 2016, materiały konferencyjne: P-44, p. 86. (Plakat)
- N27 Stachniuk J., **Borowczyk K.**, Chwatko G., Jakubowski H., Głowacki R., *Simultaneous determination of methionine and homocysteine by HPLC utilizing on-column derivatization with o-phthaldialdehyde*, 58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Gdańsk, Polska, 21 – 25 wrzesień 2015, materiały konferencyjne: S05P62. (Plakat)
- N28 **Borowczyk K.**, Chwatko G., Kubalczyk P., Jakubowski H., Głowacki R., *Oznaczanie metioniny i homocysteiny w osoczu krwi techniką HPLC z detekcją spektrofluorymetryczną*, IX Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Poznań, Polska, 6 – 10 lipiec 2015, materiały konferencyjne: PA-12. (Plakat)
- N29 Król A., **Borowczyk K.**, Głowacki R., *Badanie wpływu wybranych czynników fizykochemicznych na trwałość metioniny*, VI Sesja magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, Polska, 11 czerwiec 2015, materiały konferencyjne: S01-P007. (Plakat)
- N30 Stachniuk J., **Borowczyk K.**, Głowacki R., *High performance liquid chromatography method for the determination of low-molecular aminosulfonates in*
-

- biological fluids*, XLI Ogólnopolska szkoła chemii, Karpacz, 8-12 listopada 2014. (Plakat)
- N31 Głowacki R., Borowczyk K., *Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej do wyznaczenia statusu redoks albuminy w osoczu krwi*, X Konferencja Chromatograficzna. Chromatografia - niezbędne narzędzie w nauce i technice. Lublin, 23-26 września 2014, materiały konferencyjne W-26. (Plakat)
- N32 Walczak E., **Borowczyk K.**, Głowacki R., *Oznaczani kwasu 3-indolilomasłowego technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, V Sesja Magistrantów i Doktorantów Środowiska Łódzkiego, Łódź, 17 czerwiec 2014, materiały konferencyjne, Poster S01-P19. (Plakat)
- N33 Furmaniak P., Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, Głowacki R., *Zastosowanie techniki elektrokinetycznego wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola do zatężania tiolaktonu homocysteiny*, 56. Zjazd PTChem i SITPChem, Siedlce, 16 - 20 września 2013, materiały konferencyjne S04 P27. (Plakat)
- N34 **Borowczyk K.**, Głowacki R., *Oznaczanie homocysteiny związanej z białkami osocza krwi człowieka techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, VI Konferencja Chromatograficzna – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, Polska, 15 – 17 maj 2013; materiały konferencyjne P4. (Plakat)
- N35 Głowacki R., Wyszczelska-Rokiel M., Chwatko G., Kubalczyk P., **Borowczyk K.**, Furmaniak P., Bald E., *Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV do oznaczania związków siarki w próbkach biologicznych*, VI Konferencja Chromatograficzna – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, Polska, 15 – 17 maj 2013; materiały konferencyjne P9. (Plakat)
- N36 Borowczyk K., *Kobiety, wino i ... nowotwory*, I Mikrosymposium Chromatograficzne, Konopnica, Polska, 19 -20 kwiecień 2013. (Komunikat)
-

8. Wykaz udziału w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.
- Udział w Komitecie organizacyjnym 25<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, Poland, 15-18 September 2019 (członek komitetu organizacyjnego).
  - Zorganizowanie naukowej konferencji krajowej – członek Komitetu Organizacyjnego 7 Konferencji Chromatograficznej – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, Polska, 11-13 maj 2016.
  - Udział w Komitecie organizacyjnym VI Konferencji Chromatograficznej – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, Polska, 15 – 17 maj 2013, członek komitetu organizacyjnego.
9. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

### **Projekty finansowane ze źródeł krajowych i uniwersyteckich przed uzyskaniem stopnia doktora**

#### *Granty realizowane w roli kierownika projektu*

G1 Grant PRELUDIUM nr 2011/01/N/ST4/01834 „*Identyfikacja i ilościowe oznaczanie produktów enzymatycznego rozkładu N-homocysteinyłowanych białek*”, przyznany przez Narodowe Centrum Nauki na lata 2012-2013 – zakończony

### **Projekty finansowane ze źródeł krajowych i uniwersyteckich po uzyskaniu stopnia doktora**

#### *Granty realizowane w roli kierownika projektu*

- G2 grant SONATA nr 2013/09/D/ST5/03909 zatytułowany „*N-homocysteinyłacja jako czynnik uszkodzania struktury i funkcji keratyn – potencjalny związek ze starzeniem*”, przyznany przez Narodowe Centrum Nauki na lata 2014-2017 - rozliczony;
- G3 grant IDUB nr 8/IDUB/DOS/2021 „*Identyfikacja i oznaczanie Nε-homocysteinyłolizyny - produktu enzymatycznego rozkładu N-homocysteinyłowanych białek w osoczu myszy z deficytem hydrolazy bleomycyny*” przyznany przez Uniwersytet Łódzki w ramach konkursu IDUB – w trakcie realizacji;

- G4 grant nr 545/336 „*1,3-tiazynowe produkty reakcji witaminy B6 i tiolaktonu homocysteiny jako potencjalne markery chorób układu krążenia*”, przyznany na rok 2012 z dofinansowania prac badawczych młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego – rozliczony;
- G5 grant nr B131110000039.02 „*Tiazolidynowe pochodne fosforanu 5'-pirydoksalu jako potencjalne markery chorób*”, przyznany w roku 2013 z dofinansowania prac badawczych młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego - rozliczony;
- G6 grant nr B1411100000470.02 „*Zastosowanie technik separacji w fazie ciekłej do badania związków aktywnych biologicznie*”, przyznany w roku 2014 z dofinansowania prac badawczych młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego - rozliczony;
- G7 grant nr B1711100001599.02 „*Zastosowanie technik separacyjnych w oznaczaniu biologicznie aktywnych związków w preparatach farmaceutycznych i próbkach biologicznych*”, realizowany w roku 2017 z dofinansowania prac badawczych młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego - rozliczony.

*Granty realizowane w roli wykonawcy projektu*

- G8 grant OPUS nr 2012/07/B/NZ7/01178 „*Determinanty tiolaktonu homocysteiny u człowieka*”, finansowanych ze źródeł Narodowego Centrum Nauki - rozliczony;
- G9 grant OPUS nr 2013/09/B/NZ5/02794 „*Rola homocysteiny w patogenezie zakrzepicy*”, finansowanych ze źródeł Narodowego Centrum Nauki - rozliczony;
- G10 grant OPUS nr 2013/11/B/NZ1/00091 „*Mechanizmy i konsekwencje inkorporacji homocysteiny do białek u ludzi*”, finansowanych ze źródeł Narodowego Centrum Nauki rozliczony;
- G11 grant OPUS nr 2016/23/B/NZ5/00573 „*Odpowiedź autoimmunologiczna i liza skrzepów fibrynowych w chorobach sercowo-naczyniowych*”, finansowanych ze źródeł Narodowego Centrum Nauki – rozliczony;
- G12 grant OPUS nr 2017/27/B/ST4/01476 „*Stworzenie chromatograficznych narzędzi do badania tiazolidynowych pochodnych witaminy B6*”, finansowanych ze źródeł Narodowego Centrum Nauki - rozliczony.

10. Wykaz członkostwa w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.  
– *Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego*
11. Wykaz staży w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.
-

**Staż naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora**

- S1 **University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA**, Department of Microbiology & Molecular Genetics, **01.11.2009 – 30.04.2011** – 18-miesięczny staż naukowy w roli „Visiting researcher” obejmujący badania nad udziałem homocysteiny w rozwoju chorób cywilizacyjnych, badania na modelu zwierzęcym; staż finansowany przez UMDNJ.

**Staż naukowe po uzyskaniu stopnia doktora**

- S2 **Stanford University, California, USA**, Stanford Center for Professional Development, **21.09.2015 - 20.11.2015** – uczestnik kursu w zakresie komercjalizacji wyników badań w ramach program „Top 500 Innovators – Science, Management, Commercialization”; staż finansowany przez MNiSW.
- S3 **Rutgers, The State University of New Jersey, NJ, USA**, Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, International Center for Public Health, **01.07.2018 – 02.11.2018** - 4-miesięczny staż naukowy w roli „Visiting researcher”, obejmujący badania nad udziałem tiolaktonu homocysteiny w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, badania na modelu zwierzęcym; staż finansowany przez Rutgers University.
- S4 **Rutgers, The State University of New Jersey, NJ, USA**, Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, International Center for Public Health, **01.07.2019 – 02.11.2019** - 4-miesięczny staż naukowy w roli „Visiting researcher”, obejmujący badania nad udziałem homocysteinylacji białek w rozwoju chorób towarzyszących cukrzycy typu I, badania na modelu zwierzęcym; pobyt finansowany przez NAWA.

12. Wykaz członkostwa w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).

Brak

13. Wykaz recenzowanych prac naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

R1 **Title:** *A quick and simple HPLC method for the quantification of the immunosuppressor 6-mercaptopurine in human plasma*, **Journal:** Biomedical chromatography, Manuscript id bmc-19-0338, Date submitted by the Author: 12-jun-2019.

R2 **Title:** *Simple, cheap and fast method for determination of isulfide bonds cleavage in nail plate*; **Journal:** Journal of pharmacy and pharmacology, Manuscript id jpp-18-0533, Date submitted by the author: 15-jun-2018.

- R3 **Title:** *Cardioprotection of cortistatin against isoproterenol-induced myocardial injury in rats*, Journal: **Amino Acids**, Manuscript Number: AMAC-D-19-00101.
- R4 **Title:** *Development of a new tandem ion exchange and size exclusion chromatography method to monitor vaccine particle titer in cell culture media*, **Journal:** Analytical Chemistry, Manuscript ID ac-2019-00095p, Date Submitted by the Author: 07-Jan-2019.
- R5 **Title:** *Identifying a Role for the Interaction of Homocysteine and Copper in Promoting Cardiovascular Damage*, **Journal:** Amino Acids, Manuscript Number: AMAC-D-21-00014.
14. Wykaz uczestnictwa w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.  
Brak
15. Wykaz udziału w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.9.  
Brak
16. Wykaz uczestnictwa w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny.

### III. WSPÓŁPRA Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego.

#### Zgłoszenia patentowe po uzyskaniu stopnia doktora

- Z1 nr P.423653 z dn.30.11.2017, Sposób jednoczesnego wykrywania kwasu ({{[(2R)-1-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)propan-2-ylo]oksy}metylo}fosfonowego i kreatyniny (2-imino-1-metyloimidazolidyn-4-on) oraz test do wykrywania kwasu ({{[(2R)-1-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)propan-2-ylo]oksy}metylo}fosfonowego w moczu i jednoczesnej wstępnej oceny funkcjonowania nerek.
- Z2 nr P.445220 z dn. 14.06.2023 „Sposób oznaczania entekawiru w próbkach biologicznych o znaczeniu klinicznym metodą chromatograficzno-spektrofluorymetryczną oraz test do oznaczania entekawiru w takich próbkach”.
- Z3 nr P.445222 z dn. 14.06.2023 „Sposób oznaczania entekawiru lub jednoczesnego oznaczania entekawiru i kreatyniny w próbkach biologicznych o znaczeniu klinicznym metodą chromatograficzno-spektrofotometryczną oraz test do ich oznaczania w takich próbkach”.

2. Współpraca z sektorem gospodarczym.

Brak

---

3. Wykaz uzyskanych praw własności przemysłowej, w tym uzyskanych patentów krajowych lub międzynarodowych.

Brak

4. Wykaz wdrożonych technologii.

Brak

5. Wykaz wykonanych ekspertyz lub innych opracowań wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.

### **Ekspertyzy dla sektora gospodarczego po uzyskaniu stopnia doktora**

E1 Opracowanie ekspertyzy dotyczącej oferty usługi możliwej do wdrożenia przez Katedrę Chemii Środowiska Wydziału Chemii w zakresie wykrywania i ilościowego oznaczania związków siarki w płynach biologicznych technikami wysokosprawnej chromatografii cieczowej i wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej. Oferta przygotowana w roku 2013 na zlecenie Centrum Transferu Technologii UŁ.

6. Wykaz udziału w zespołach eksperckich lub konkursowych.

### **Recenzje wniosków badawczych wykonane po uzyskaniu stopnia doktora**

W roku 2021 pełniłem funkcję recenzenta 10 wniosków projektów badawczych składanych przez uczestników studiów doktoranckich i szkół doktorskich w Konkursie Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza („IDUB”) na „Doktoranckie Granty Badawcze”.

7. Wykaz projektów artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi.

Brak

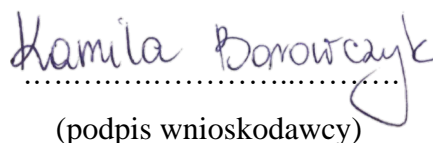
**IV. DANE NAUKOMETRYCZNE**

Sumaryczny IF wszystkich publikacji (zgonie z rokiem opublikowania)	129,152
Sumaryczny IF wszystkich publikacji (lista z roku 2022)	147,734
Suma punktów MNiE wszystkich publikacji (wg wykazu z 2023 r.)	3040
Sumaryczna liczba cytowań wszystkich publikacji	476
Sumaryczna liczba cytowań wszystkich publikacji pomniejszona o autocytowania	436
Liczba publikacji, w których wnioskodawca jest pierwszym autorem	9
Liczba publikacji, w których wnioskodawca jest autorem korespondencyjnym	7
H - index	13

*Informacje zawarte w pkt. IV powinny wskazywać również na bazę danych, na podstawie której zostały podane.*

*Przy wyborze tej bazy należy zwracać uwagę na specyfikę dziedziny i dyscypliny naukowej, w której kandydat ubiega się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.*

*Rada Doskonałości Naukowej informuje, że podawanie danych naukowych – w opinii Rady Doskonałości Naukowej – jest wskazane i zalecane, wynika to także ze stosowanej powszechnie praktyki przez samych kandydatów ubiegających się o awans naukowy. Należy jednak podkreślić, że podane we wnioskach o wszczęcie postępowania awansowego dane naukowe nie mogą stanowić kryterium oceny dorobku naukowego Kandydata dla podmiotów doktoryzujących, habilitujących oraz samej Rady Doskonałości Naukowej, organów prowadzących postępowania w sprawie nadania stopnia lub tytułu. Zadaniem tych organów jest przede wszystkim ocena ekspercka dorobku naukowego Kandydata ubiegającego się o awans naukowy, zaś decyzja o nadaniu stopnia lub tytułu nie powinna być uzależniona od podania tych danych.*

  
.....  
(podpis wnioskodawcy)