



WYDZIAŁ
CHEMII

Uniwersytet Łódzki



Autoreferat

ZAŁĄCZNIK 3

*do wniosku w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
dr Justynie Piechockiej (z d. Stachniuk)*

Spis treści

Informacje ogólne	4
Wykaz stosowanych skrótów i symboli.....	5
1. Dane osobowe	7
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	7
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	7
4. Omówienie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.....	7
4.1. Osiągnięcie naukowe	8
4.2. Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe	8
4.3. Merytoryczne ujęcie przedmiotowego osiągnięcia naukowego	10
4.3.1. Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej.....	10
4.3.2. Technika chromatografii gazowej jako narzędzie do monitorowania poziomu wybranych małowcząsteczkowych związków siarki w materiale biologicznym	15
4.3.3. Poszukiwanie nowych produktów przemian metabolicznych - tiazynowe i tiazolidynowe pochodne aminokwasów siarkowych.....	20
4.3.4. Chromatograficzne badania śliny pod kątem obecności niektórych związków siarki, powiązanych w szlaku przemian metabolicznych metioniny	23
4.3.5. Narzędzia do badania roli tiolaktonu homocysteiny i homocysteiny związanej wiązaniem amidowym z białkami osocza w rozwoju chorób cywilizacyjnych	25
4.3.6. Podsumowanie i wnioski końcowe.....	30
4.3.7. Perspektywy badań i planowane kierunki rozwoju	36
4.3.8. Wykaz cytowanej literatury	37
5. Informacja o aktywności naukowej zrealizowanej w podmiocie innym niż jednostka macierzysta	43
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzujących naukę	45
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne.....	45
6.1.1. Wykaz prowadzonych i/lub koordynowanych przedmiotów	45
6.1.2. Informacja o prowadzonych pracach dyplomowych.....	46
6.1.3. Informacja o sprawowanej opiece naukowej nad studentami	49
6.1.4. Wykaz zrecenzowanych prac dyplomowych	51

6.2. Osiągnięcia organizacyjne.....	51
6.2.1. Wykaz zorganizowanych spotkań o charakterze naukowym	51
6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę.....	51
6.3.1. Informacja o zorganizowanych warsztatach o charakterze naukowym.....	51
6.3.2. Informacja o udziale w wydarzeniach popularyzujących naukę	52
6.3.3. Wykaz przeprowadzonych wykładów popularnonaukowych	52
7. Inne, nieokreślone w punkcie 2 - 6, ważne informacje dotyczące kariery zawodowej .	53
7.1. Informacja o udokumentowanej współpracy z innymi ośrodkami naukowymi.....	53
7.1.1. Wykaz zagranicznych ośrodków naukowych.....	53
7.1.2. Wykaz krajowych ośrodków naukowych.....	53
7.2. Informacja o uzyskanych nagrodach, stypendiach i wyróżnieniach.....	53
7.2.1. Wykaz otrzymanych nagród oraz wyróżnień za działalność naukową.....	53
7.2.2. Wykaz otrzymanych nagród oraz wyróżnień za działalność dydaktyczną	54
7.2.3. Wykaz otrzymanych nagród oraz wyróżnień za działalność organizacyjną	54
7.2.4. Wykaz otrzymanych stypendiów za działalność naukową i organizacyjną	54

Informacje ogólne

- Zdarzenia (osiągnięcia) zostały uporządkowane chronologicznie.
- Okres przed uzyskaniem stopnia doktora odnosi się do czasu sprzed 21.02.2018 r. Okres po uzyskaniu stopnia doktora odnosi się do czasu po 21.02.2018 r. do dnia zgłoszenia wniosku w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego.
- Wartość wskaźnika oddziaływania dla czasopism została określona na podstawie danych z bazy Journal Citation Reports (dostęp dnia 13.05.2024 r.).
- Autor korespondencyjny / prezentujący pracy został oznaczony gwiazdką (*).
- Liczba punktów dla czasopism została określona na podstawie danych z wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych, wskazanych w komunikacie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 05.01.2024 r.
- Opis indywidualnego wkładu w powstanie dzieła przygotowano zgodnie z taksonomią ról twórców.
- Czasopisma, które znalazły się w 2022 r. w górnym decylnym wskaźniku cytowalności określono na podstawie danych z bazy Scopus (dostęp dnia 13.05.2024 r.).
- Wartość indeksu Hirscha określono na podstawie danych z bazy Scopus (dostęp dnia 13.05.2024 r.).

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

CE	elektroforeza kapilarna
CEEPUS	Środkowoeuropejski Program Wymiany Uniwersyteckiej
CiteScore - Top 10%	górny decyl wskaźnika cytowalności
CMQT	tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy
Cys	cysteina
Cys-Gly	cysteinyl-glicyna
FDA	A amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków
FLD	detektor fluorescencyjny
GC	chromatografia gazowa
Glu	glutation
Hcy	homocysteina
HILIC	chromatografia oddziaływań hydrofilowych
HPLC	chromatografia cieczowa
HPPTCA	kw. 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylo-
HSL	lakton homoseryny
HTL	tiolakton homocysteiny
IBCF	chloromrówczan izobutyli
IF	wskaźnik oddziaływania czasopisma
LLE	ekstrakcja ciecz-ciecz
Lys	lizyna
Met	metionina
MNiSW	Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
MS	spektrometria mas
MS/MS	tandemowa spektrometria mas
MSTFA	<i>N</i> -metylo- <i>N</i> -(trimetylosililo)trifluoroacetamid
<i>N</i> -Hcy	homocysteina związana wiązaniem amidowym z białkami osocza
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
<i>Nε</i> -Hcy-Lys	<i>Nε</i> -homocysteinyl-lizyna

OPA	aldehyd <i>orto</i> -ftalowy
PCA	kwasy chlorowce(VII)
pK _a	stała dysocjacji
PLP	fosforan 5`-pirydoksalu
Pyr	pirydyna
TCA	kwasy 1,3-tiazinano-4-karboksylowe
TCEP	tris(2-karboksyetylo)fosfina
TMCS	trimetylochlorosilan
UV	detektor spektrofotometryczny
UV-Vis	spektroskopia absorpcyjna w nadfiolecie i obszarze widzialnym

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Justyna Piechocka (z domu Stachniuk)

Numer ORCID (*Open Researcher and Contributor Identity*): 0000-0002-1160-3160

Scopus ID (*Scopus Identity*): 56845878500

Adres e-mail: justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- 2011 Licencjat** w zakresie chemii w specjalności chemia kosmetyczna na podstawie przedstawionej pracy „Samooorganizacja cząsteczek na powierzchniach metalicznych” nadany przez Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego
- 2013 Magister** w zakresie chemii na podstawie przedstawionej pracy „Oznaczanie kwasu foliowego i jego wybranych pochodnych” nadany przez Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego
- 2014 Licencjat** w zakresie chemii w specjalności analityka chemiczna na podstawie przedstawionej pracy „Derywatywacja chemiczna przez grupę aminową” nadany przez Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego
- 2018 Doktor nauk chemicznych** w zakresie chemii na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej „Wysokosprawna chromatografia cieczowa wybranych pochodnych endogennych tioli” nadany przez Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Od dnia 01.04.2018 r. jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego w Katedrze Chemii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.

4. Omówienie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) podstawę zgłoszenia wniosku w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego stanowi cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych [H1-H9], poświęconych tematyce zastosowania technik rozdzielania w fazie ciekłej i gazowej w analizie próbek biologicznych. Prace ukazały się drukiem w latach 2020 - 2024, po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk chemicznych.

4.1. Osiągnięcie naukowe

Cykl powiązanych tematycznie 9 artykułów naukowych [H1-H9] zatytułowany „Zastosowanie technik rozdzielania w fazie ciekłej i gazowej w analityce płynów ustrojowych człowieka na zawartość wybranych małowcząsteczkowych związków siarki”.

4.2. Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe

Cykl obejmuje 7 prac oryginalnych [H2-H5,H7-H9] oraz 2 prace przeglądowe [H1,H6], w przypadku których sumaryczna wartość wskaźnika oddziaływania (IF) wynosi 59,7 (Tabela 1). Spośród 9 prac składających się na osiągnięcie naukowe, 4 artykuły zostały opublikowane w czasopismach, które znalazły się w 2022 r. w górnym decylnym wskaźniku cytowalności (CiteScore - Top 10%). Prace zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych, zgodnie z informacją zawartą w komunikacie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW). Czasopismom tym przypisano 70 punktów (2 prace), 100 punktów (1 praca), 140 punktów (6 prac). W przypadku każdego z rozpatrywanych dzieł jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym o znaczącym wkładzie w ich powstanie. Merytoryczny opis mojego wkładu w powstanie poszczególnych prac stanowi treść załącznika 4 do przedmiotowego wniosku. Oświadczenia współautorów, określające ich indywidualny wkład w powstanie publikacji składających się na osiągnięcie naukowe, stanowią treść załącznika 5 do wniosku. Kopie wspomnianych prac stanowią treść załącznika 6.

H1. J. Piechocka*, M. Wrońska, R. Głowacki*, Chromatographic strategies for the determination of aminothiols in human saliva, **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** (2020) 126: 115866, 1 - 14. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115866.

CiteScore - Top 10% | Punkty MNiSW₂₀₂₄ 140 | Wartość IF₂₀₂₂ 13,1

H2. J. Piechocka*, M. Wrońska, I. E. Głowacka, R. Głowacki*, 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid, novel metabolite of pyridoxal 5`-phosphate and cysteine is present in human plasma - chromatographic investigations, **International Journal of Molecular Sciences** (2020) 21: 3548, 1 - 16. DOI: 10.3390/ijms21103548.

Punkty MNiSW₂₀₂₄ 140 | Wartość IF₂₀₂₂ 5,6

H3. J. Piechocka*, M. Wrońska, G. Chwatko, H. Jakubowski, R. Głowacki*, Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography - mass spectrometry, **Journal of Chromatography B** (2020) 1149: 122155, 1 - 7. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122155.

Punkty MNiSW₂₀₂₄ 70 | Wartość IF₂₀₂₂ 3,0

- H4. J. Piechocka*, M. Wieczorek, R. Głowacki*, Gas chromatography - mass spectrometry based approach for the determination of methionine - related sulfur containing compounds in human saliva, **International Journal of Molecular Sciences** (2020) 21: 9252, 1 - 18. DOI: 10.3390/ijms21239252.

Punkty MNiSW₂₀₂₄ 140 | Wartość IF₂₀₂₂ 5,6

- H5. J. Piechocka*, N. Litwicka, R. Głowacki*, Identification and determination of 1,3-thiazinane-4-carboxylic acid in human urine - chromatographic studies, **International Journal of Molecular Sciences** (2022) 23: 598, 1 - 19. DOI: 10.3390/ijms23020598.

Punkty MNiSW₂₀₂₄ 140 | Wartość IF₂₀₂₂ 5,6

- H6. J. Piechocka*, R. Głowacki*, Up-to-date knowledge about analytical methods for homocysteine thiolactone determination in biological samples, **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** (2023) 159: 116906, 1 - 15. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116906.

CiteScore - Top 10% | Punkty MNiSW₂₀₂₄ 140 | Wartość IF₂₀₂₂ 13,1

- H7. J. Piechocka*, M. Wyszczelska-Rokiel, R. Głowacki*, Simultaneous determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid and main plasma aminothiols by HPLC-UV based method, **Scientific Reports** (2023) 13: 9294, 1 - 12. DOI: 10.1038/s41598-023-36548-9.

CiteScore - Top 10% | Punkty MNiSW₂₀₂₄ 140 | Wartość IF₂₀₂₂ 4,6

- H8. J. Piechocka*, R. Głowacki, One-pot sample preparation procedure for the determination of protein N-linked homocysteine by HPLC-FLD based method, **Journal of Chromatography B** (2023) 1228: 123835, 1 - 7. DOI: 10.1016/j.jchromb.2023.123835.

Punkty MNiSW₂₀₂₄ 70 | Wartość IF₂₀₂₂ 3,0

- H9. J. Piechocka*, R. Głowacki, Comprehensive studies on the development of HPLC-MS/MS and HPLC-FL based methods for routine determination of homocysteine thiolactone in human urine, **Talanta** (2024) 272: 125791: 1 - 13. DOI: 10.1016/j.talanta.2024.125791.

CiteScore - Top 10% | Punkty MNiSW₂₀₂₄ 100 | Wartość IF₂₀₂₂ 6,1

Tabela 1. Zestawienie danych naukowych obejmujące publikacje składające się na osiągnięcie naukowe.

Wskaźnik naukowy	Publikacja [H1-H9]
Sumaryczna liczba cytowań publikacji bez autocytowań	30
Sumaryczna liczba cytowań publikacji	56
Sumaryczna wartość IF	59,7
Sumaryczna liczba punktów MNiSW	1080

Objaśnienia: IF, wskaźnik oddziaływania czasopisma; MNiSW, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

4.3. Merytoryczne ujęcie przedmiotowego osiągnięcia naukowego

Od początku kariery zawodowej jestem związana z Uniwersytetem Łódzkim. W 2013 r. dołączyłam do zespołu Katedry Chemii Środowiska na Wydziale Chemii, gdzie do 2018 r. realizowałam zadania badawcze jako doktorant, a od 01.04.2018 r. prowadzę działalność badawczo-dydaktyczną jako adiunkt. Moje zainteresowania naukowe koncentrują się na opracowywaniu chromatograficznych metod analizy próbek biologicznych na zawartość istotnych z biologicznego punktu widzenia małowcząsteczkowych związków siarki oraz zastosowania tych metod do monitorowania ich przemian metabolicznych i badania roli w organizmie człowieka w stanach (pat)fizjologicznych. Dodatkowy aspekt badawczy stanowi poszukiwanie związków, które mogłyby pełnić rolę nowych *markerów* wybranych chorób cywilizacyjnych, w szczególności nieznanymi metabolitów (pochodnych) homocysteiny (Hcy) i związków powiązanych z nią w szlaku przemian metabolicznych metioniny (Met). Rozprawę doktorską, zatytułowaną „Wysokosprawna chromatografia cieczowa wybranych pochodnych endogennych tioli”, którą obroniłam w 2018 r. przygotowałam pod kierunkiem prof. dra hab. Rafała Głowackiego. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych, otrzymałam możliwość kontynuowania badań w jednostce macierzystej. Rozpoczęłam prace badawcze, których efekty są między innymi przedmiotem niniejszego opracowania oraz stanowią podstawę zgłoszenia wniosku w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego. W celu lepszego zrozumienia przez czytelnika pobudek, które mną kierowały na etapie wyboru kierunków badań, przedstawię uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej z perspektywy stanu wiedzy w 2018 r.

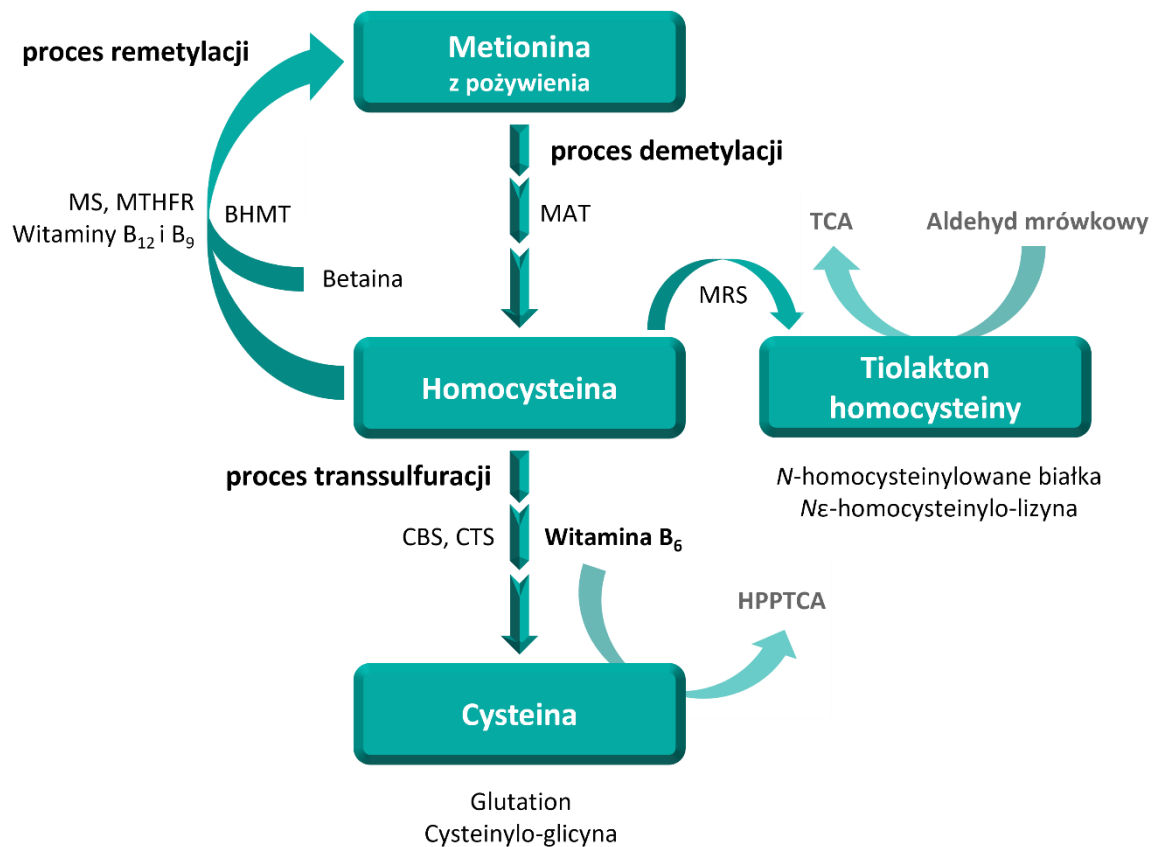
4.3.1. Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej

Małowcząsteczkowe związki siarki, takie jak Hcy, cysteina (Cys), glutation (Glu) i cysteinylo-glicyna (Cys-Gly), odgrywają istotną rolę w metabolizmie i homeostazie komórkowej oraz pełnią ważne funkcje w procesach fizjologicznych i patologicznych w organizmach żywych [1–4]. Z tego powodu zaliczane są do grupy biologicznie ważnych związków siarki, obok chociażby koenzymu A, albuminy czy siarkowodoru i produktów jego

przemiany. W dużym uproszczeniu, związki te powstają w warunkach fizjologicznych na drodze przemian metabolicznych Met, która dostarczana jest organizmowi z pożywieniem. W konsekwencji zachodzących wewnątrzkomórkowych przemian prowadzących do demetylacji Met powstaje Hcy, której dalsze drogi przemiany uwarunkowane są aktualnymi potrzebami organizmu. Hcy podlega zasadniczo dwóm rodzajom przemian, które przebiegają w kierunku odtworzenia Met (proces remetylacji) pod wpływem syntazy metioninowej, w obecności witaminy B₁₂ i witaminy B₉, oraz syntezy Cys na drodze nieodwracalnego (promowanego) procesu transsulfuracji Hcy, wymagającego obecności β-syntazy cystationiny, γ-liazy cystationinowej oraz właściwej podaży witaminy B₆. Wskutek dalszych przemian metabolicznych, powstała Cys bierze udział w syntezie Glu, którego enzymatyczna degradacja prowadzi do powstania Cys-Gly [1–4]. W nieznacznym stopniu Hcy może również podlegać niekorzystnym przemianom w wyniku, których powstaje jej cykliczna forma - tiolakton Hcy (HTL). Związek wykazuje wysoką reaktywność w stosunku do białek, co skutkuje ich modyfikacją chemiczną zwaną *N*-homocysteinylacją. W efekcie tego procesu powstają *N*-homocysteinylowane białka o nieodwracalnie zmienionych właściwościach, u podłoża czego leży utworzenie wiązania amidowego pomiędzy HTL i grupą ε-aminową reszt lizyny (Lys) w białku [4–7]. Produktem proteolitycznej degradacji *N*-homocysteinylowanych białek jest między innymi *Nε*-homocysteinylo-Lys (*Nε*-Hcy-Lys) [4–6,8]. Co warto podkreślić, wszystkie te przemiany zachodzą w organizmie człowieka w stanie fizjologicznym, czyli w warunkach zapewnienia odpowiedniej podaży składników odżywczych stanowiących źródło Met oraz witamin z grupy B (głównie witaminy B₁₂, B₆ oraz B₉), jak również braku deficytu enzymatycznego. Przemiana Hcy w HTL ulega natomiast nasileniu głównie w przypadku zaburzenia metabolizmu Hcy na skutek działania czynników genetycznych i poza genetycznych [4,9], co niesie za sobą poważne konsekwencje dla zdrowia, którym jednocześnie towarzyszy upośledzenie szlaków przemian metabolicznych innych związków siarki (Rysunek 1).

Na przestrzeni wielu lat obszernie udokumentowano związek przyczynowy pomiędzy zaburzonym metabolizmem Hcy i powiązanych z nią w szlaku przemian metabolicznych związków siarki a rozwojem licznych chorób cywilizacyjnych [6,9–19]. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa trudno nie ulec wrażeniu, że zdecydowanie najwięcej uwagi poświęcono badaniom nad znaczeniem Hcy w patogenezie i przebiegu wspomnianych chorób, wśród których najczęściej wymienia się schorzenia układu krążenia, cukrzycę, choroby neurodegeneracyjne czy nowotwory. W mniejszym zakresie przebadano jej metabolity. Niemniej, przeprowadzone dotychczas badania kliniczne jednoznacznie wykazały, że stężenie Hcy, HTL, Hcy związanej wiązaniem amidowym z białkami (*N*-Hcy) oraz *Nε*-Hcy-Lys w płynach ustrojowych człowieka istotnie wzrasta w przebiegu wspomnianych chorób, czemu jednocześnie towarzyszy odbiegający od normy, podwyższony poziom Cys, Glu i Cys-Gly [6,9–19]. Od wielu lat podwyższone stężenie Hcy w osoczu uważa się za niezależny czynnik ryzyka przedwczesnego rozwoju chorób układu krążenia, zaburzeń płodności, chorób neurodegeneracyjnych czy nowotworowych [6,9–19]. Jednocześnie w przypadku HTL stwierdzono, że jego podwyższone stężenie w moczu stanowi niezależny czynnik ryzyka wystąpienia ostrego zawału mięśnia sercowego u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca

[20]. Pomimo prowadzonych od wielu lat badań, rola Hcy i powiązanych z nią w szlaku przemian metabolicznych związków siarki w patogenezie i przebiegu wielu chorób cywilizacyjnych pozostaje niewystarczająco poznana. Niewyjaśniona pozostaje również kwestia czy podwyższone stężenie Hcy i jej metabolitów w płynach ustrojowych osób cierpiących na poszczególne schorzenia jest przyczyną, czy jednak następstw choroby. Co ciekawe zaobserwowano, że redukcję niebezpiecznie podwyższonego stężenia Hcy w organizmie człowieka można uzyskać stosując odpowiednio zbilansowaną dietę oraz suplementację witaminami z grupy B, które są niezbędne w procesach biochemicznych przemian Hcy, czyli witaminą B₉, B₆ oraz B₁₂ [21–25]. Jednakże rola tych witamin w obniżaniu poziomu Hcy również nie została jednoznacznie określona. Stąd prowadzenie dalszych wnikliwych badań zmierzających do wyjaśnienia tych kwestii jest celowe, także z perspektywy profilaktyki chorób cywilizacyjnych, które stanowią plagę XXI wieku.



Rysunek 1. Uproszczony schemat szlaku przemian metabolicznych wybranych małowcząsteczkowych związków siarki, poglądowo obrazujący relacje pomiędzy analitami.

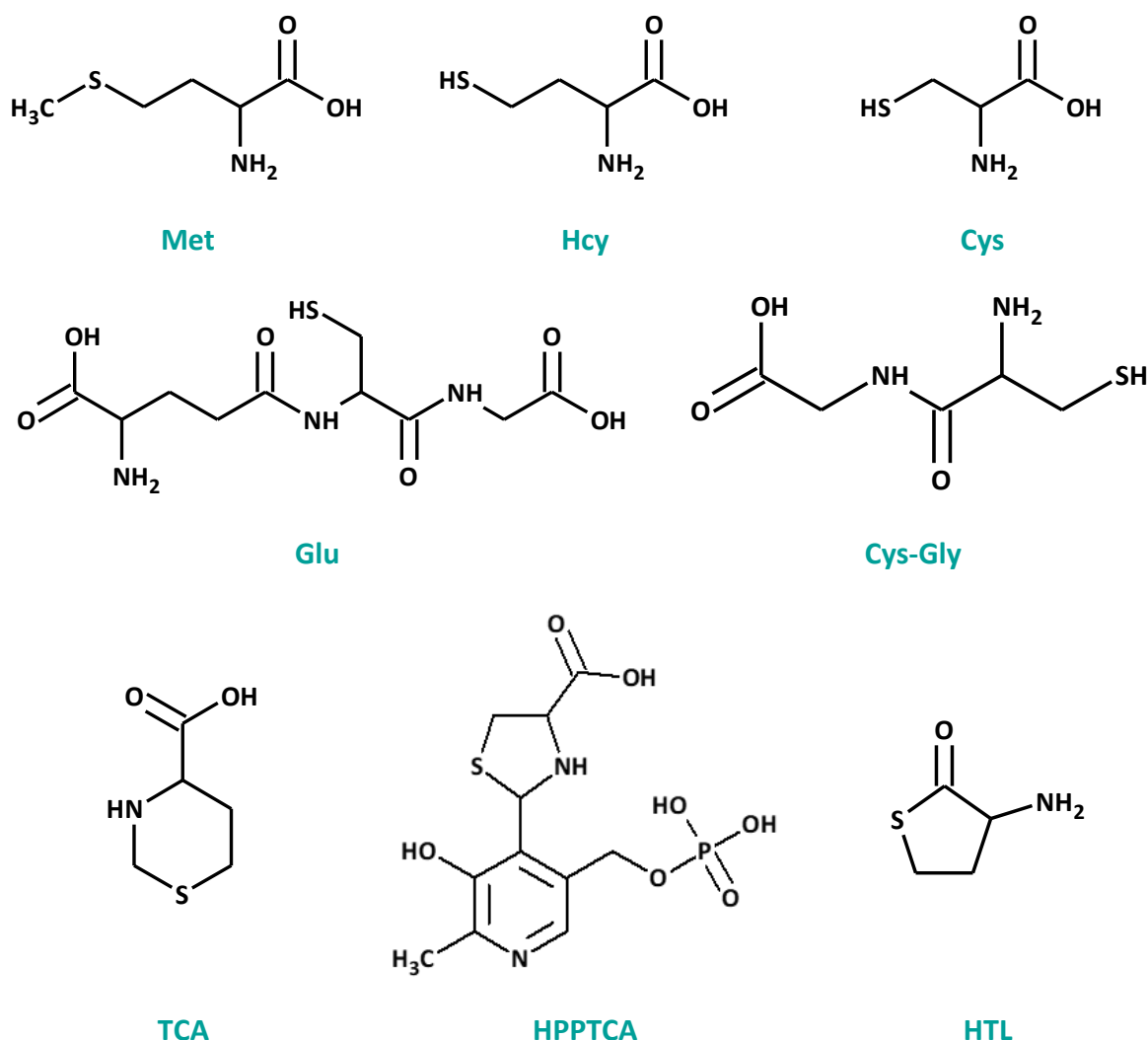
Objaśnienia: BHMT, metylotransferaza betaina - homocysteina; CBS, β-syntaza cystationiny; CTS, γ-liaza cystationinowa; HPPTCA, kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy; MAT, adenozylotransferaza metioninowa; MRS, syntetaza metionilo-tRNA; MS, syntetaza metioninowa; MTHFR, reduktaza metylenotetrahydrofolianowa; TCA, kwas 1,3-tiazinano-4-karboksylowy. **Źródło:** opracowanie własne na podstawie [1,4].

Choroby cywilizacyjne, choć są niezakaźne, rozprzestrzeniają się globalnie i niestety dotyczą coraz młodszej populacji. Obecnie do tej grupy schorzeń zalicza się między innymi choroby układu krążenia [10,12,17], metaboliczne [13] czy nowotworowe [10,11,15], w których przebiegu stwierdza się odbiegające od normy stężenie Hcy i jej metabolitów w płynach ustrojowych. Choroby te stanowią zarazem jedne z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie, zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia, co wyraźnie wskazuje na konieczność poszukiwania szybkich (tanich) i bezpiecznych dla pacjenta metod ich wczesnej diagnostyki. Obecnie podejmowane na świecie w tym kierunku działania dotyczą zarówno poszukiwania specyficznych wskaźników rozwoju wspomnianych schorzeń, jak i dostarczania efektywnych narzędzi analitycznych, które docelowo mają ułatwiać prowadzenie badań przesiewowych w dużych populacjach. Powszechnie wiadomo, że w przypadku wielu chorób ogromną, jeśli nie największą, rolę w zapobieganiu ich rozwojowi i wczesnym wykrywaniu przypisuje się profilaktyce, której jednym z ważnych elementów są badania przesiewowe. W tym kontekście ważne, aby stosowane metody zachęcały pacjentów do poddania się procedurom medycznym. W mojej opinii, jednym ze skutecznych sposobów osiągnięcia tego celu jest poprawa dostępności do badań laboratoryjnych poprzez obniżenie związanych z nimi kosztów, dzięki stosowaniu efektywnych rozwiązań metodycznych. Ponadto nie bez znaczenia jest wykorzystanie do badań materiału biologicznego, który jest pobierany w nieinwazyjny i szybki sposób, niepowodujący dyskomfortu u pacjenta. Takie kryterium spełnia ślina. Zgodnie z wynikami ankiet, jej powszechne wykorzystanie do celów diagnostyki laboratoryjnej zachęciłoby znaczną grupę osób do regularnego poddawania się badaniom [26].

Uwzględniając aktualne trendy w bioanalizie, w nauce i życiu, głównym celem podjętych przeze mnie prac badawczych stało się opracowanie, a następnie kompleksowa walidacja efektywnych narzędzi analitycznych i wykazanie możliwości ich zastosowania w analizie próbek biologicznych o dużym znaczeniu w diagnostyce laboratoryjnej, w celu oznaczenia wybranych małowcząsteczkowych związków siarki (Rysunek 2). W obszarze mojego szczególnego zainteresowania znalazły się zagadnienia związane z:

- problematyką oznaczania biologicznie ważnych związków siarki (HTL, N-Hcy, Cys, Hcy, Met, Glu, Cys-Gly) w próbkach moczu, osocza i śliny metodami, opartymi na technikach chromatograficznych [27–29][H1-H9], w szczególności zaś technice chromatografii gazowej (GC) [27][H2-H5];
- możliwościami wykorzystania śliny w badaniach nakierowanych na poznanie roli Hcy i powiązanych z nią w szlaku przemian metabolicznych małowcząsteczkowych związków siarki (HTL, Cys, Met), w rozwoju chorób cywilizacyjnych [28,29][H1,H3,H4,H6];
- poszukiwaniem nowych metabolitów w szlaku transsulfuracji Hcy, które mogłyby pełnić rolę *markerów* chorób, w szczególności nierozpoznanych produktów interakcji Hcy, HTL i Cys z naturalnie występującymi w organizmie człowieka aldehydami, takimi jak aldehyd mrówkowy oraz fosforan 5`-pirydoksalu (PLP, witamina B₆) [H2,H5,H7].

Na podstawie dokonanego przeze mnie przeglądu literatury naukowej stwierdziłam, że nie przeprowadzono istotnych badań w tym zakresie.



Rysunek 2. Poglądowe struktury chemiczne wybranych związków siarki o małej masie cząsteczkowej stanowiących obiekty badań. **Objaśnienia:** Cys, cysteina; Cys-Gly, cysteinyl-glicyna; Glu, glutation; Hcy, homocysteina; HTL, tiolakton homocysteiny; HPPTCA, kwas 2-(3-hydrokso-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy; Met, metionina; TCA, kwas 1,3-tiazinano-4-karboksylowy.

Na potrzeby realizacji zamierzonych celów badawczych wykorzystałam szerokie spektrum technik pomiarowych, w tym spektroskopię absorpcyjną w nadfiolecie i obszarze widzialnym (UV-Vis), technikę GC sprzężoną ze spektrometrem mas wyposażonym w analizator mas typu pojedynczy kwadrupol (MS), elektroforezę kapilarną (CE) w połączeniu z detektorem spektrofotometrycznym (UV) oraz technikę chromatografii cieczowej (HPLC) sprzężoną z detektorem UV, fluorescencyjnym (FLD) i tandemowym spektrometrem mas z analizatorem mas typu potrójny kwadrupol (MS/MS). Charakter prowadzonych badań

wymagał ode mnie nie tylko zaprojektowania oryginalnych procedur przygotowania próbek do analizy, uwzględniających specyfikę poszczególnych technik pomiarowych, ale również dobrania warunków pomiarowych i wykazania użyteczności opracowanych metod. Stąd każdą z opracowanych metod poddałam procesowi walidacji zgodnie z wytycznymi Amerykańskiej Agencji do spraw Żywności i Leków (FDA) [30]. Ze względu na fakt wykorzystania w badaniach materiału biologicznego pochodzenia ludzkiego (krew, mocz, ślina), wszystkie czynności prowadziłam po uprzednim uzyskaniu pozytywnej opinii Komisji do spraw etyki badań naukowych Uniwersytetu Łódzkiego. W kolejnych podrozdziałach przedłożonego opracowania opisałam uzyskane przeze mnie, najważniejsze rezultaty prac badawczych i wynikające z nich wnioski.

4.3.2. Technika chromatografii gazowej jako narzędzie do monitorowania poziomu wybranych małowcząsteczkowych związków siarki w materiale biologicznym

Małowcząsteczkowe związki siarki, stanowiące przedmiot tego opracowania, zwyczajowo oznaczane są w próbkach krwi (osocze, surowica) i moczu na potrzeby prowadzenia badań dotyczących monitorowania ich przemian metabolicznych oraz roli w organizmie człowieka [28,29,31–36][H6]. Wyniki przeglądu specjalistycznej literatury jednoznacznie wskazują, że w analityce wspomnianych płynów ustrojowych główną rolę odgrywają metody oparte na technikach rozdzielania w fazie ciekłej, takich jak HPLC i CE, sprzężonych z różnymi rodzajami detektorów [28,29,31–36][H1,H6]. Niewątpliwie, technika GC-MS nie stanowi narzędzia analitycznego pierwszego wyboru do celów analityki hydrofilowych związków siarki, w tym HTL, Cys, Hcy i Met. Dzieje się tak przede wszystkim ze względu na ich małą masę cząsteczkową, niestabilność termiczną, niską lotność oraz polarny charakter cząsteczek. W rzeczywistości opracowano jedną metodę oznaczania HTL w osoczu [37] oraz kilka innych metod wykorzystujących technikę GC do oznaczania Hcy, Cys i Met w próbkach moczu czy osocza [38–46]. Co ważne z perspektywy zakresu zaplanowanych przeze mnie eksperymentów, nigdy wcześniej nie przeprowadzono badań dotyczących możliwości jej wykorzystania do monitorowania poziomu HTL w próbkach biologicznych, w tym ślinie [H6]. Ponadto na podstawie dokonanego przeze mnie przeglądu literatury stwierdziłam, że nie podjęto również prób zastosowania tej techniki pomiarowej w analityce śliny pod kątem oznaczania Hcy, Cys, Met i HTL [H1]. Fakt ten był dla mnie zaskakujący, gdyż materiałowi temu poświęca się obecnie dużo uwagi jako alternatywnemu w stosunku do moczu i osocza [47–53][H1]. Wszystkie te przesłanki skłoniły mnie do przeprowadzenia badań nakierowanych na określenie potencjału techniki GC-MS w nakreślonym powyżej obszarze.

W efekcie podjętych w tym zakresie działań opracowałam nowe, bazujące na technice GC-MS, i jak dotąd jedyne metody oznaczania HTL w próbkach moczu i śliny [27][H3] oraz jednoczesnego oznaczania Hcy, Cys, Met i HTL w próbkach śliny [H4]. Dostarczyłam również narzędzia analityczne do oznaczania w płynach ustrojowych człowieka nierozpoznanych dotychczas produktów interakcji Hcy i jej metabolitów (HTL, Cys) z aldehydem mrówkowym i PLP [H2,H5]. Co istotne, opracowane przeze mnie i bazujące na technice GC-MS metody oznaczania HTL w ślinie [H3], kwasu 1,3-tiazinano-4-karboksylowego (TCA) [H5] w moczu

i kwasu 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksyłowego (HPPTCA) [H2] w osoczu, okazały się użytecznymi podczas monitorowania zawartości wspomnianych związków w próbkach biologicznych. Omówieniu tych kwestii poświęciłam podrozdział 4.3.3. oraz podrozdział 4.3.4. niniejszego opracowania.

Specyfika prowadzonych prac badawczych wymagała wykorzystania odpowiednich wzorców analitycznych. Substancja wzorcowa HPPTCA, w odróżnieniu od pozostałych analitów, nie była jednak dostępna komercyjnie. Dlatego też jednym z istotnych etapów prac badawczych była jego synteza. W tym zakresie podjęłam współpracę z dr hab. n. farm. Iwoną Głowacką, prof. uczelni z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, która przeprowadziła wspomnianą syntezę, co z kolei umożliwiło dokonanie charakterystyki spektroskopowej HPPTCA z wykorzystaniem technik spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis, spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR) oraz MS/MS (Materiały uzupełniające [H2]). Wykazałam ponadto, że HPPTCA w postaci jasnożółtego proszku, przechowywany w temperaturze -80°C w pojemniku ze szczelnym zamknięciem, bez dostępu światła i wilgoci jest trwały przez co najmniej 5 miesięcy [H2].

W dalszej kolejności, dobrałam istotne parametry opracowywanych narzędzi chromatograficznych. W trakcie ich projektowania i opracowywania szczególną uwagę poświęciłam doborowi warunków prowadzenia procesów na etapie przygotowania próbek do analizy, który stanowi jeden z najważniejszych i zarazem najtrudniejszych etapów procedury analitycznej. Uzyskanie miarodajnego wyniku analizy w znacznym stopniu uzależnione jest od prawidłowego pobrania i przygotowania materiału do badań. W badaniach zastosowałam typowe podejście w zakresie sposobu przygotowania próbek osocza [H2], moczu [27][H3,H5] i śliny [H3,H4] do analizy techniką GC-MS, które zaprojektowałam uwzględniając specyfikę techniki pomiarowej, właściwości fizykochemiczne analitów oraz rodzaj analizowanego materiału biologicznego. Zaproponowane przeze mnie oryginalne procedury przygotowania próbek do analizy uwzględniają przede wszystkim konieczność ich odbiałczenia, wzbogacenia analitu oraz jego konwersji w lotną pochodną (Rysunek 3). Dodatkowo w przypadku metody oznaczania HTL i Met obok Cys i Hcy [H4], próbki śliny poddałam działaniu czynnika redukującego wiązania disiarczkowe - tris(2-karboksyetylo)fosfiną (TCEP). W celu usunięcia białek ze śliny i osocza, próbki poddałam procesowi ultrafiltracji [H2] bądź działaniu rozpuszczalnika organicznego - acetonitrylu [H4]. Z kolei zastosowanie techniki ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) na etapie przygotowania próbek moczu i śliny, umożliwiło mi selektywną izolację analitu [27][H3,H5], jak również jednoczesne ich odbiałczenie [H3]. W rzeczywistości każda z opracowanych procedur przygotowania próbek biologicznych, w tym także moczu, uwzględnia potrzebę ich odbiałczenia przed wprowadzeniem do układu GC ze względu na potencjalną możliwość wystąpienia białek w tej matrycy [54,55]. Co warto podkreślić, sekwencja czynności, którym poddałam próbki biologiczne w trakcie ich przygotowania do analizy GC-MS, była ściśle uzależniona od rodzaju zastosowanego odczynnika derywatyzującego.

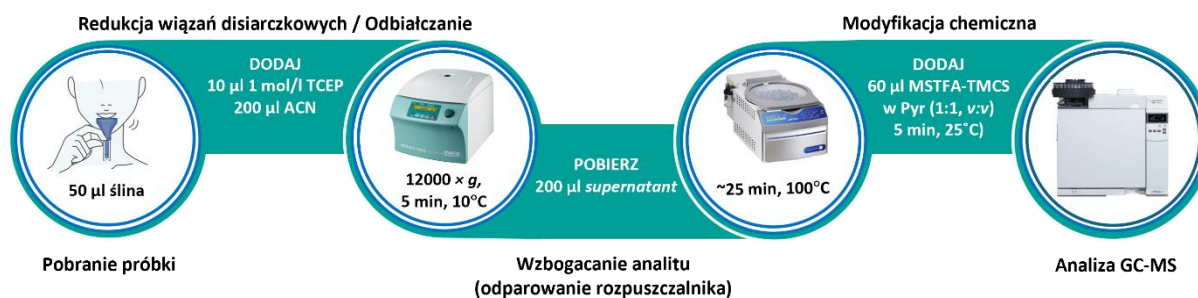
a) [H2]



b) [H3]



c) [H4]



d) [H5]



Rysunek 3. Schemat postępowania w trakcie przygotowania próbek biologicznych do analizy chromatograficznej techniką GC-MS na zawartość a) HPPTCA [H2], b) HTL [H3], c) HTL, Cys, Met i Hcy [H4] oraz d) TCA [H5]. **Objaśnienia:** ACN, acetonitryl; GC-MS, chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas; IBCF, chloromrówczan izobutyli; MeOH, metanol; MSTFA, *N*-metylo-*N*-(trimetylosililo)trifluoroacetamid; PB, bufor fosforanowy; Pyr, pirydyna; TCEP, tris(2-karboksyetylo)fosfina; TMCS, trimetylochlorosilan; Tris-HCl, bufor chlorowodorek tris(hydroksymetylo)aminometanu. **Źródło:** opracowanie własne na podstawie [H2-H5].

Jak wcześniej wspomniałam, jednym z niezbędnych etapów procedury przygotowania próbek biologicznych do analizy techniką GC-MS na zawartość HTL, Cys, Hcy, Met, HPPTCA i TCA [27][H2-H5], okazała się derywatywacja chemiczna. Zabieg ten zastosowałam w celu przezwyciężenia trudności w ich oznaczeniu techniką GC, wynikających z braku zgodności właściwości fizykochemicznych analitów z wymaganiami stosowanej techniki pomiarowej. W badaniach wykorzystywałam komercyjnie dostępne odczynniki derywatyżujące, takie jak *N*-metylo-*N*-(trimetylosililo)trifluoroacetamid (MSTFA) i chloromrówczan izobutyłu (IBCF), o obszernie udokumentowanej przydatności w metodach bazujących na technice GC [56–60]. Na podstawie analizy danych literaturowych stwierdziłam, że MSTFA był już wcześniej stosowany w celu przeprowadzenia w lotne i stabilne termicznie pochodne Cys, Hcy i Met [61–63]. Z kolei w przypadku HTL [27][H3,H4], TCA [H5] i HPPTCA [H2], MSTFA [H2-H4] i IBCF [27][H5] zostały przeze mnie po raz pierwszy wykorzystane do ich konwersji w pochodne. Stąd niezwykle istotnym etapem prowadzonych przeze mnie prac było określenie warunków prowadzenia reakcji (Tabela 2). Ponadto na podstawie analizy zarejestrowanych w realnym czasie analizy chromatograficznej widm masowych dokonałam identyfikacji struktur produktów poszczególnych reakcji derywatywacji [27][H2-H5] (Rysunek 1 [27], Rysunek 4b [H2], Rysunek 2 [H3], Rysunek 1b [H5]), jak również generowanych w MS jonów fragmentacyjnych (Rysunek 6b [H5]).

Tabela 2. Zestawienie podstawowych informacji na temat warunków prowadzenia reakcji derywatywacji chemicznej wybranych małowcząsteczkowych związków siarki, oznaczanych techniką GC-MS. **Źródło:** opracowanie własne na podstawie [H2-H5].

Parametr	Odczynnik derywatyżujący	
	MSTFA [H2-H4]	IBCF [H5]
Analit	HTL, Cys, Hcy, Met, HPPTCA	TCA
Czas reakcji [min]	5 - 100	5
Temperatura [°C]	25 - 50	25
Środowisko reakcji	bezwodne (Pyr)	wodne (Tris-HCl)
Katalizator	tak (TMCS)	tak (Pyr)
Trwałość próbki w 25°C [min]	120 - 180	5

Objaśnienia: Cys, cysteina; Hcy, homocysteina; HPPTCA, kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy; HTL, tiolakton homocysteiny; IBCF, chloromrówczan izobutyłu; Met, metionina; MSTFA, *N*-metylo-*N*-(trimetylosililo)trifluoroacetamid; Pyr, pirydyna; TCA, kwas 1,3-tiazinano-4-karboksylowy; TMCS, trimetylochlorosilan; Tris-HCl, bufor chlorowodorek tris(hydroksymetylo)aminometanu.

Wybór warunków rozdzielania chromatograficznego i detekcji stanowił drugi, obok pobrania i przygotowania próbki do analizy, istotny etap procedury analitycznej warunkujący

miarodajność uzyskiwanych wyników. Dokonałam doboru wartości charakterystycznych parametrów dla techniki GC-MS. W efekcie przeprowadzonych w tym zakresie eksperymentów, po wnikliwym przeanalizowaniu wpływu poszczególnych czynników na końcowy efekt rozdzielania składników analizowanych próbek oraz jakość rejestrowanych sygnałów analitycznych, w każdym omawianym przypadku ustaliłam warunki pomiarowe. Zarejestrowane chromatogramy cechowały się obecnością dobrze rozdzielonych pików, a widoczne dodatkowe sygnały odpowiadające niezidentyfikowanym substancjom nie utrudniały w istotny sposób identyfikacji jakościowej pików generowanych przez oznaczane pochodne silylowe [H2-H4] i izobutylowe [H5] analitów oraz nie wpływały niekorzystnie na końcowy wynik analizy (Rysunek 7 [H2], Rysunek 4 [H3], Rysunek 7 [H4], Rysunek 5 [H5]).

Ostatecznie zastosowane przeze mnie rozwiązania metodyczne umożliwiły dostarczenie oryginalnych narzędzi analitycznych o udokumentowanej użyteczności do monitorowania zawartości HTL [27][H3,H4] obok Hcy, Cys i Met [H4], jak również TCA [H5] i HPPTCA [H2] w płynach ustrojowych człowieka (Tabela 3). W wyniku przeprowadzonych eksperymentów dostarczyłam informacji na temat kluczowych etapów postępowania analitycznego w celu oznaczenia HTL, TCA i HPPTCA w próbkach biologicznych techniką GC-MS [27][H2-H5]. Co więcej, wnikliwa analiza otrzymywanych rezultatów umożliwiła poczynienie ważnych z praktycznego punktu widzenia obserwacji.

- **Polarna cząsteczka HPPTCA oddziałuje z powierzchnią białek osocza**, co utrudnia jej ekstrakcję. Aby zwiększyć odzysk HPPTCA z próbki należy poddać ją działaniu rozpuszczalnika organicznego w celu zaburzenia struktury powłoki hydratacyjnej białek, zasadniczo przed poddaniem jej procesowi odbiałczania na drodze ultrafiltracji [H2].
- **Przeprowadzenie procesu redukcji wiązań disiarczkowych w warunkach denaturujących [H4]**, umożliwia uproszczenie procedury analitycznej i zwiększenie odzysku Met, Hcy, Cys i HTL z próbki. Niekowalencyjnie związane z białkami osocza małowcząsteczkowe związki siarki są bowiem efektywniej ekstrahowane z powierzchni białek zdenaturowanych [H1].
- **Proces derywatyzacji mieszaniną MSTFA z trimetylochlorosilanem (TMCS) nie musi być prowadzony w obecności pirydyny (Pyr) [H4]**. W trakcie badań wykazałam, że silylowe pochodne Met, Hcy, Cys i HTL tworzą się w przypadku traktowania próbki mieszaniną MSTFA-TMCS. Jednak zastąpienie mieszaniny MSTFA-TMCS w Pyr, mieszaniną MSTFA-TMCS skutkowało nawet 45% spadkiem intensywności rejestrowanych sygnałów analitycznych i utratą powtarzalności wyników pomiarów.
- **Odbiałczanie próbek biologicznych poprzez dodatek kwasu chlorowego(VII) (PCA) bądź kwasu trichlorooctowego**, a w konsekwencji ich obecność w próbce poddawanej następnie derywatyzacji z wykorzystaniem mieszaniny MSTFA-TMCS w Pyr, **niekorzystnie wpływa na reaktywność odczynnika derywatyzującego względem HPPTCA, HTL, Met, Cys i Hcy**, co skutkuje spadkiem czułości stężeniowej metod [H2,H4].

- **Efektywność procesu tworzenia się sililowych pochodnych HTL i HPPTCA**, w przypadku działania na próbkę mieszaniną MSTFA-TMCS w Pyr (1:1, v:v), **nie zależy od temperatury** w zakresie od 25°C do 50°C [H2]/60°C [H4] (Tabela 2).
- **Sililowe pochodne HTL, Met, Hcy, Cys** (Rysunek 3a [H3], Rysunek 5b [H4]) i **HPPTCA** (Rysunek 5a [H2]), jak również **izobutylową pochodną TCA** (Rysunek 3b [H5]) i **HTL** (Rysunek 2a [27]) **cechuje mała trwałość** w warunkach prowadzenia eksperymentu (Tabela 2). W celu uzyskania miarodajnych wyników pomiarów konieczne jest przygotowanie próbek bezpośrednio przed ich analizą, jak również przestrzeganie reżimu czasowego. Niewątpliwie utrudnia to wykorzystanie omawianych metod [27][H2-H5] do badań populacyjnych.

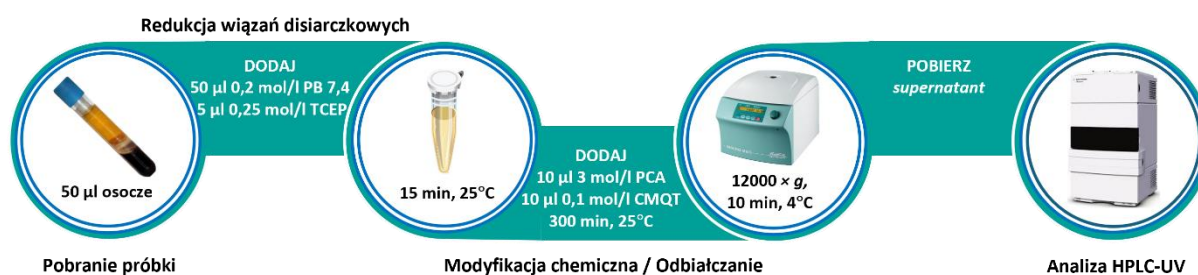
4.3.3. Poszukiwanie nowych produktów przemian metabolicznych - tiazynowe i tiazolidynowe pochodne aminokwasów siarkowych

Od wielu lat prowadzone są badania nakierowane na poszukiwanie przyczyn rozwoju chorób cywilizacyjnych, w tym schorzeń, w których przebiegu stwierdza się zaburzenia szlaków przemian metabolicznych związków siarki [6,9–19]. Ważnym aspektem tych badań jest poszukiwanie i identyfikowanie produktów reakcji metabolicznych powstałych w wyniku przemian fizjologicznych lub patologicznych. Celem takiego podejścia jest poszerzenie aktualnej wiedzy na temat zachodzących w organizmie człowieka procesów oraz identyfikacja czynników wpływających na ich przebieg. Stąd prowadzenie badań w tym zakresie może pomóc w lepszym zrozumieniu mechanizmów powstawania chorób, jak również poszukiwaniu związków, które mogłyby pełnić rolę specyficznych wskaźników ich rozwoju.

Grupą związków, które zwróciły moją uwagę w tym kontekście były kwasy 1,3-tiazinano-4-karboksylowe oraz 1,3-tiazolidyno-4-karboksylowe powstające w reakcji Hcy/HTL oraz Cys z endogennymi aldehydami, takimi jak aldehyd mrówkowy [H5] oraz PLP [H2,H7]. Poza PLP, który stanowi ważny niebiałkowy składnik enzymów katalizujących proces transulfuracji Hcy [64,65], związki te są produktami szlaku przemian metabolicznych Met w organizmach żywych [1–7,66,67] (Rysunek 1). Jednocześnie znana jest toksyczność Hcy, HTL, Cys oraz aldehydu mrówkowego. Przeprowadzone badania klinicznie jednoznacznie wykazały, że ich podwyższony poziom towarzyszy rozwojowi licznych chorób cywilizacyjnych [6,9–14,17,19,66,68], a obniżenie niebezpiecznie podwyższonego stężenia w organizmie człowieka można uzyskać stosując odpowiednio zbilansowaną dietę oraz suplementację witaminami z grupy B [21–25]. Na podstawie przeglądu literatury stwierdziłam, że możliwa jest reakcja Hcy i HTL z aldehydem mrówkowym [69–71] oraz Cys z PLP [72–78], w warunkach imitujących fizjologiczne (*in vitro*), prowadząca do utworzenia odpowiednio TCA i HPPTCA. Zasadnym było więc postawienie hipotezy, że tworzenie się TCA czy HPPTCA stanowi jedną z dróg eliminacji/neutralizacji toksycznych Hcy, HTL, Cys i aldehydu mrówkowego. Z drugiej zaś strony generowanie takich pochodnych może stanowić potencjalną przyczynę niedoboru witaminy B₆ [64,65]. Z perspektywy zakresu zaplanowanych przeze mnie eksperymentów istotnym był fakt, że nigdy wcześniej nie przeprowadzono badań nakierowanych na

potwierdzenie bądź wykluczenie obecności HPPTCA i TCA w organizmie człowieka, pomimo że substraty potrzebne do ich syntezy *in vivo*, czyli Hcy, HTL, Cys, PLP i aldehyd mrówkowy naturalnie w nim występują [4,28,29,31,33,36,66,67,79][H1,H6]. Postanowiłam zweryfikować tę hipotezę badawczą. Założyłam, że metody chromatograficzne doskonale nadają się do realizacji tego celu. Dodatkowo, bazując na wcześniej zdobytym doświadczeniu [27][H3,H4], postanowiłam w pierwszej kolejności wykorzystać technikę GC-MS.

W efekcie podjętych w tym zakresie działań opracowałam dwie nowe i jak dotąd jedyne metody oznaczania HPPTCA w osoczu [H2] i TCA w moczu człowieka [H5], wykorzystujące technikę GC-MS. Praktyczne aspekty tych metod omówiłam w podrozdziale 4.3.2. Ponadto wykazałam, że chromatograficzna metoda oznaczania Hcy, Cys, Glu i Cys-Gly w osoczu techniką HPLC-UV [80,81] może zostać adaptowana na potrzeby oznaczania HPPTCA [H7]. W metodzie tej próbka osocza poddawana jest działaniu odczynnika redukującego wiązania disiarczkowe (TCEP), odczynnika derywatyżującego - tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) oraz czynnika denaturującego białka (PCA), a otrzymany po wirowaniu próbki roztwór znad osadu (*supernatant*) poddawany jest analizie HPLC-UV (Rysunek 4). W omawianym przypadku modyfikacja procedury analitycznej dotyczyła czasu trwania i warunków prowadzenia reakcji derywatyżacji. W trakcie badań wykazałam, że reakcja skutkująca powstaniem 2-S-chinoliniowej pochodnej HPPTCA-CMQT wymaga jej prowadzenia przez 5 godzin, od momentu zmieszania wszystkich reagentów, w warunkach redukująco-denaturujących. Zaobserwowałam, że pochodna HPPTCA-CMQT wykazuje absorpcję promieniowania elektromagnetycznego w zakresie światła UV (Rysunek 1 [H7]) oraz cechuje ją wysoka trwałość, co stwarza możliwość przygotowania serii pomiarowych o dużej liczbie próbek bez konieczności przestrzegania reżimu czasowego. Wykazałam, że uzyskanie miarodajnych wyników pomiarów jest możliwe przez co najmniej 48 godzin od momentu przygotowania próbek do analizy (Rysunek 3 [H7]), w przypadku ich przechowywania w temperaturze 25°C. Jest to niezwykle istotne z perspektywy możliwości wykorzystania metody [H7] do badań populacyjnych.



Rysunek 4. Schemat postępowania w trakcie przygotowania próbki osocza do analizy chromatograficznej techniką HPLC-UV na zawartość HPPTCA. **Objaśnienia:** CMQT, tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy; PB, bufor fosforanowy; PCA, kwas chlorowy(VII); HPLC-UV, chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem spektrofotometrycznym; TCEP, tris(2-karboksyetylo)fosfina. **Źródło:** opracowanie własne na podstawie [H7].

Podążając za współczesnymi trendami w analityce chemicznej, metody oznaczania HPPTCA w osoczu [H2,H7] poddałam ocenie w kontekście negatywnego wpływu na środowisko. W tym celu wykorzystałam komercyjnie dostępne narzędzie AGREE (*Analytical Greenness calculator*), opracowane przez zespół naukowców z Politechniki Gdańskiej [82–84], które umożliwia przeprowadzenia obliczeń niezbędnych do porównania i oszacowywania uciążliwości środowiskowej metodyk analitycznych, w oparciu o koncepcję zielonej chemii i dwanaście jej zasad. Co ciekawe, uzyskany wynik był porównywalny w przypadku obu metod, pomimo zastosowania odmiennych rozwiązań metodycznych. Analiza uzyskanych piktogramów umożliwiła mi określenie zalet i ograniczeń dostarczonych narzędzi (Rysunek 4 [H7]).

Podsumowując, zastosowane rozwiązania umożliwiły mi dostarczenie oryginalnych narzędzi analitycznych do monitorowania zawartości TCA [H5] i HPPTCA [H2,H7] w próbkach moczu i osocza człowieka. Nowatorski charakter przeprowadzonych przeze mnie badań dotyczył ich praktycznego wykorzystania, podobnie jak innych opracowanych z moim udziałem metod [78,85], w analityce próbek płynów ustrojowych człowieka. Dzięki temu możliwe stało się poczynienie szeregu ważnych ustaleń.

- **Wykazałam, że TCA [H5] stanowi składnik moczu.** Analizie poddałam próbki moczu pozyskane od 15 pozornie zdrowych osób, w których stwierdziłam obecność TCA [H5]. Jego zawartość mieściła się w zakresie od 0,18 $\mu\text{mol/l}$ do 6,92 $\mu\text{mol/l}$ (Tabela 3).
- **Potwierdziłam, że HPPTCA obok Hcy, Cys, Glu, Cys-Gly i PLP [28,29,31,33,36,79] stanowi składnik osocza [H2,H7].** Jego zawartość w próbkach osocza pozyskanych od 31 pacjentów mieściła się w zakresie od 18,86 $\mu\text{mol/l}$ do 65,60 $\mu\text{mol/l}$ (Tabela 3).
- **Zbadałam relację stężeniową pomiędzy zawartością HPPTCA i Cys w osoczu [H7].** W ramach badań analizie poddałam próbki osocza, dostarczone do laboratorium przez 18 pozornie zdrowych pacjentów, w których określiłam zawartość analitów. Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdziłam istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy zawartością HPPTCA i Cys (wartość współczynnika korelacji równa 0,6317).
- **Wykazałam, że HPPTCA powstaje w warunkach *in vivo* [H2,H7].** Analizie poddałam próbki osocza pobrane od 5 pozornie zdrowych osób przed i po spożyciu komercyjnie dostępnej witaminy B₆ w formie chlorowodoru pirydoksyny. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że HPPTCA jest obecny w próbkach osocza, a jego stężenie wzrasta po suplementacji witaminą B₆ (Rysunek 7c [H2], Rysunek 5b [H7]).
- **Określiłam trwałości HPPTCA w próbkach osocza [H2] uzależnioną od czynników, takich jak pH próbki, temperatura, czas i warunki jej przechowywania.** Wykazałam, że HPPTCA w próbkach osocza jest nietrwały i rozkłada się niezależnie od warunków ich przechowywania, czego skutkiem jest odtworzenie Cys i PLP (Rysunek 6 [H2])[77]. Jednocześnie zaobserwowałam, że pH próbki mieszczące się w zakresie od 4,0 do 8,0 ma wpływ na szybkość procesu rozkładu HPPTCA, gdyż postępował on szybciej w roztworze o odczynie zasadowym niż kwasowym. Wykazałam, że zawartość HPPTCA w próbkach

osocza przechowywanych w temperaturze 25°C spada nawet o 40% w ciągu 4 godzin od momentu ich pobrania do czasu poddania analizie (Rysunek 6 [H2]). W celu uzyskania miarodajnych wyników pomiarów konieczna jest ich analiza niezwłocznie po pobraniu.

Co warto podkreślić, uzyskane przeze mnie informacje stanowią jedyne ogólnodostępne dane literaturowe na temat trwałości, obecności i zawartości HPPTCA w osoczu [H2,H7] i TCA w próbkach moczu [H5]. Wyniki badań wstępnych pozwalają sądzić, że HPPTCA może stanowić rezerwuuar witaminy B₆ w organizmie człowieka, bądź jedną z jej form nieopisanych w literaturze, której stężenie zależy od zawartości Cys i PLP w osoczu. Powyższe fakty mogą w mojej opinii przyczynić się do lepszego zrozumienia roli witaminy B₆ w organizmie człowieka.

4.3.4. Chromatograficzne badania śliny pod kątem obecności niektórych związków siarki, powiązanych w szlaku przemian metabolicznych metioniny

Analityka krwi i jej pochodnych oraz moczu jest powszechnie uznawana za „złoty standard” w badaniach diagnostycznych. Wspomniane płyny biologiczne są również zwyczajowo wykorzystywane w badaniach dotyczących monitorowania przemian metabolicznych małowcząsteczkowych związków siarki, jak również podczas badania ich roli w organizmie człowieka [28,29,31–36][H6]. Doskonałym przykładem jest dostępne komercyjnie badanie laboratoryjne umożliwiające oznaczenie Hcy we krwi. W ostatnim czasie można jednak zaobserwować rosnące zainteresowanie śliną, której wykorzystanie w diagnostyce laboratoryjnej mogłoby w wielu aspektach stanowić realną alternatywę w stosunku do krwi i moczu [47–53][H1]. Ślina jako materiał diagnostyczny wykazuje wiele zalet w porównaniu ze wspomnianymi płynami biologicznymi [48,49,52,87][H1]. Przede wszystkim ślina stanowi płyn biologiczny o unikatowym składzie, który zawiera nie tylko substancje przenikające do niej z krwi przez naczynia krwionośne, oplatające gruczoły ślinowe, ale również te produkowane wyłącznie w obrębie ślinianek [47–52]. Jednak wykorzystanie śliny w diagnostyce laboratoryjnej nie jest powszechnie praktykowane. Dotychczas możliwości wykorzystania śliny jako materiału alternatywnego w stosunku do moczu i osocza zostały potwierdzone w badaniach dotyczących monitorowania poziomu wybranych leków i ich metabolitów oraz markerów kilku chorób [47–53]. Ponadto dostępnych jest kilka komercyjnych badań laboratoryjnych śliny, umożliwiających oznaczenie hormonów (dehydroepiandrosteronu, estradiolu, progesteronu, testosteronu, kortyzolu, melatoniny) i stwierdzenie/wykluczenie zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego czy wirusem cytomegalii. Ilość dostępnych informacji na temat możliwości wykorzystania śliny w kontekście oznaczania Hcy i metabolicznie powiązanych z nią związków siarki jest bardzo ograniczona [87][H1].

Dotychczas przeprowadzone badania pozwoliły potwierdzić obecność w próbkach śliny Hcy i spokrewnionych z nią w szlaku przemian metabolicznych małowcząsteczkowych związków siarki, takich jak Cys, Met, Glu, Cys-Gly i γ -glutamyl-cysteina [87][H1]. Jak wcześniej wspomniałam, w głównej mierze stało się to możliwe dzięki zastosowaniu w jej analizie metod opartych na technikach rozdzielania w fazie ciekłej, takich jak HPLC i CE [H1]. Co ważne z perspektywy zakresu zaplanowanych przeze mnie eksperymentów, nigdy wcześniej nie

przeprowadzono badań dotyczących obecności HTL w ślinie, pomimo że jest on obecny w moczu i osoczu człowieka [H6] a wyniki wskazują często na istnienie korelacji stężeniowej pomiędzy zawartością tych samych analitów we wspomnianych płynach biologicznych [48–50][H1]. Dodatkowo na podstawie dokonanego przeglądu literatury stwierdziłam, że nie podjęto również prób zastosowania techniki GC-MS w analityce śliny pod kątem oznaczania wspomnianych związków siarki. Fakty te stały się dla mnie przesłanką do przeprowadzenia badań nakierowanych na określenie możliwości wykorzystania śliny w oznaczaniu Hcy, Cys, Met i HTL z zastosowaniem techniki GC-MS.

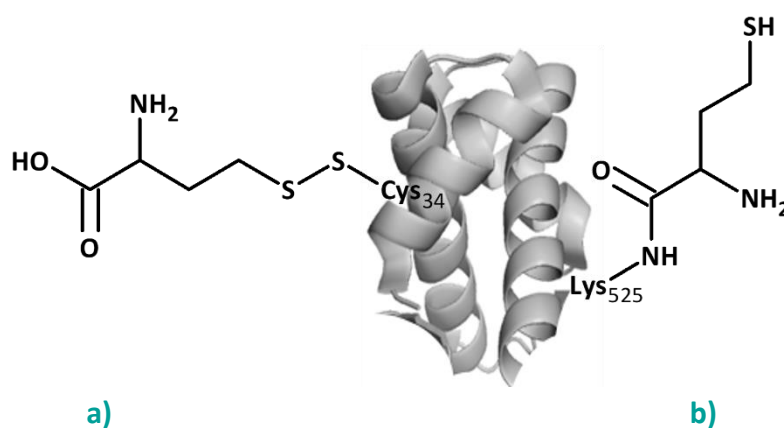
W efekcie podjętych w tym zakresie działań opracowałam dwie nowe, i jak dotąd jedyne, metody oznaczania Hcy i spokrewnionych z nią metabolicznie Cys, Met i HTL w próbkach śliny [H4] oraz HTL w próbkach moczu i śliny techniką GC-MS [H3]. Analityczne walory tych metod omówiłam w podrozdziale 4.3.2. Nowatorski charakter przeprowadzonych przeze mnie badań przejawiał się również w praktycznym wykorzystaniu opracowanych narzędzi w analityce próbek śliny (i moczu). Najważniejsze osiągnięcia i spostrzeżenia z tej części badań przedstawiłam poniżej.

- **Wykazałam, że HTL stanowi składnik śliny** obok Hcy, Cys i Met [H3,H4]. W ramach badań poddałam analizie próbki śliny pozyskane od 18 pozornie zdrowych osób, w których stwierdziłam obecność HTL [H3]. Jego zawartość mieściła się w zakresie od 0,07 $\mu\text{mol/l}$ do 0,19 $\mu\text{mol/l}$ i była porównywalna ze stężeniem analitu w próbach moczu (0,08 - 0,27 $\mu\text{mol/l}$) dostarczonych przez tych samych pacjentów (Tabela 3).
- **Określiłam trwałości HTL w próbkach śliny** [H3] uzależnioną od czynników, takich jak pH próbki, temperatura, czas i warunki jej przechowywania. Wykazałam, że zawartość HTL w próbkach śliny przechowywanych w temperaturze 25°C, 4°C i -81°C pozostaje na tym samym poziomie odpowiednio przez 8 godzin, 3 dni i 21 dni od momentu ich pobrania do czasu poddania analizie (Rysunek 1a,c [H3]). Jednocześnie dowiodłam, że pH próbki mieszczące się w zakresie od 6,5 do 7,0, nie ma wpływu na szybkość procesu rozkładu HTL. Dodatkowo stwierdziłam, że proces wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek śliny ma istotny wpływ na trwałość analitu. Jego zawartość w analizowanych próbach pozostała na stałym poziomie do 3 cykli. Co istotne, potwierdzenie faktu ograniczonej trwałości analitu uzyskałam poddając analizie próbki śliny, przechowywane przez 4 lata w temperaturze -81°C, w których nie wykryłam HTL [H4]. Jednocześnie możliwe było oznaczenie w tych próbach Hcy, Cys i Met, których stężenie w porównaniu z tym wyznaczonym w 2016 roku wzrosło o nie więcej niż 30%. Mogło to wynikać z wzbogacenia analitów wskutek odparowania rozpuszczalnika. Wyniki te mieściły się w zakresach wartości referencyjnych [H1].
- **Zbadałam relację stężeniową pomiędzy zawartością HTL w ślinie i moczu** [H3]. Analizie poddałam próbki śliny i moczu, dostarczone do laboratorium przez 18 pozornie zdrowych pacjentów, w których określiłam zawartość HTL. Dodatkowo w próbkach moczu oznaczyłam kreatyninę. Na podstawie uzyskanych wyników, nie stwierdziłam pozytywnej korelacji pomiędzy zawartością HTL w ślinie i moczu (Rysunek 6a,b [H3]).

Uzyskane przez mnie informacje stanowią jedyne ogólnodostępne dane literaturowe na temat obecności, trwałości i zawartości HTL w próbkach śliny [H3]. Dzięki nim możliwe stało się określenie sposobu przechowywania próbek śliny od momentu ich pobrania, ale także przygotowania do analizy na zawartość HTL, tak aby możliwe było uzyskanie miarodajnych wyników oznaczeń. Co więcej, wyniki badań wstępnych pozwalają sądzić, że tak jak w przypadku aminokwasów tiolowych [H1], również w przypadku HTL możliwe będzie wykorzystanie śliny jako materiału alternatywnego w stosunku do moczu i osocza w diagnostyce laboratoryjnej.

4.3.5. Narzędzia do badania roli tiolaktonu homocysteiny i homocysteiny związanej wiązaniem amidowym z białkami osocza w rozwoju chorób cywilizacyjnych

Pomimo prowadzonych na świecie od wielu lat badań, wciąż niedostatecznie wyjaśnioną pozostaje kwestia roli Hcy i jej metabolitów w patogenezie i przebiegu wielu chorób. Jedną z hipotez zakłada, że za szkodliwe działanie na organizm człowieka odpowiada HTL, nie zaś sama Hcy, której podwyższone stężenie w osoczu powszechnie uznawane jest za czynnik ryzyka przedwczesnego rozwoju tych chorób [4–7]. HTL jest cyklicznym tioestrem Hcy (Rysunek 2), wykazującym znaczną reaktywność w stosunku do białek osocza, a konkretnie do grup ε-aminowych bocznych łańcuchów Lys tych białek (Rysunek 5). Obecnie przyjmuje się, że cytotoksyczne działanie HTL polega na zaburzeniu (bądź nawet utracie) właściwości strukturalnych i funkcjonalnych białek wskutek ich *N*-homocysteinytacji. Proces ten jest łączony z występowaniem chorób układu sercowo-naczyniowego (miażdżyca), zaburzeniami płodności, chorobami metabolicznymi (cukrzyca) czy neurodegeneracyjnymi (choroba Alzheimera). Potranslacyjnie zmodyfikowane białka wykazują bowiem większą skłonność do uszkodzeń oksydacyjnych i agregacji niż białka niemodyfikowane, a ich obecność powoduje wzmożone reakcje autoimmunologiczne organizmu [4–7,15,17,88].



Rysunek 5. Poglądowa struktura a) *S*-homocysteinylowanego i b) *N*-homocysteinylowanego białka (albuminy ludzkiej). **Objaśnienia:** Cys, cysteina; Lys, lizyna. **Źródło:** opracowanie własne.

Co ciekawe, mimo dość dużego zainteresowania naukowców tematyką wpływu HTL na zaburzenia prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka i patologii towarzyszących procesowi *N*-homocysteinytacji białek, wciąż wiedza w tym zakresie jest bardzo ograniczona. Przykładem może być fakt, że nie określono zakresów wartości referencyjnych stężenia HTL czy *N*-Hcy w materiale biologicznym powszechnie wykorzystywanym w diagnostyce laboratoryjnej, co może wynikać z małej dostępności metod umożliwiających ich oznaczenie a tym samym miarodajnych wyników pomiarów. Dotychczas zaproponowano zaledwie kilka metod umożliwiających oznaczenie HTL [H6] czy *N*-Hcy [89–92] w próbkach biologicznych (mocz, osocze), które nie są pozbawione znaczących ograniczeń stanowiących o ich znikomym znaczeniu jako narzędzi odpowiednich do badań populacyjnych.

Mając na uwadze powyższe fakty, podjęłam intensywne działania, których celem było dostarczenie nowych, efektywnych narzędzi dla celów analityki płynów ustrojowych człowieka na zawartość HTL i *N*-Hcy, które charakteryzowałyby duży potencjał aplikacyjny. W efekcie podjętych w tym zakresie działań w pierwszej kolejności opracowałam (jak dotąd jedyne!) metody oznaczania HTL w próbkach śliny [H3,H4] i moczu [27][H3] wykorzystujące technikę GC-MS. Istotne cechy tych metod omówiłam w podrozdziale 4.3.2. oraz 4.3.4. Mając na uwadze ich ograniczenia, wynikające przede wszystkim z konieczności przestrzegania rygorystycznych zasad na etapie przygotowania próbek do analizy oraz ich małą trwałość, kontynuowałam poszukiwania lepszych rozwiązań. Zamierzony cel osiągnęłam, czego efektem było opracowanie pierwszej metody oznaczania HTL w próbkach moczu techniką HPLC-MS/MS [H9]. Powodzeniem zakończyła się również próba udoskonalenia opracowanej w Katedrze Chemii Środowiska metody oznaczania *N*-Hcy w próbkach osocza [91]. Jej efekty zawarłam w pracy [H8]. W niniejszym podrozdziale przybliżę najważniejsze cechy tych metod [H8,H9].

Metoda oznaczania N-Hcy w próbkach osocza techniką HPLC-FLD [H8]

Monitorowanie poziomu *N*-Hcy w próbkach biologicznych wiąże się z wieloma problemami. Jest to jeden z powodów, dla których zaproponowano jak dotąd zaledwie cztery metody umożliwiające oznaczenie tego analitu w próbkach osocza i moczu [89–92], które dodatkowo cechuje znikome znaczenie aplikacyjne. Jednym z głównych ograniczeń tych narzędzi jest konieczność poddania próbki pracochołonnemu, czasochłonnemu i wieloetapowemu procesowi jej przygotowania trwającemu więcej niż 8 godzin. Ponadto procesowi towarzyszy wielokrotne przenoszenie próbki pomiędzy probówkami, co skutkuje zwiększeniem ilości zużywanych materiałów jednorazowego użytku i ryzyka utraty analitu, a w konsekwencji spadkiem precyzji i dokładności oznaczeń (Tabela 1 [H8]). Doświadczenie zespołu Katedry Chemii Środowiska w zakresie oznaczania *N*-Hcy w próbkach osocza [93], pokazało że stosowane dotychczas autorskie narzędzie [91] również posiada wspomniane ograniczenia. Z tego też powodu jako kolejny cel swojej pracy badawczej wybrałam znalezienie bardziej praktycznych rozwiązań metodycznych, a tym samym zwiększenie potencjału aplikacyjnego metody.

W badaniach zastosowałam typowe podejście w zakresie sposobu przygotowania próbek osocza, które poddałam analizie chromatograficznej w warunkach opisanych w literaturze [91]. Zaproponowana przeze mnie metoda oznaczania *N*-Hcy uwzględnia potrzebę poddania próbki działaniu odczynnika redukującego wiązania disiarczkowe (TCEP) oraz czynnika denaturującego białka (PCA), jak również przemycia strąconego białka (osadu) roztworem PCA w celu selektywnej izolacji analitu z osocza [29,94]. Wytrącone białka poddawane są następnie hydrolizie kwasowej, a powstały w tych warunkach HTL jest oznaczany techniką HPLC-FLD z wykorzystaniem derywatywacji z aldehydem *orto*-ftalowym (OPA) [H8]. Uwzględniając wszystkie istotne szczegóły dobrałam parametry metody na etapie przygotowania próbki do analizy, co ostatecznie przyczyniło się do zwiększenia jej czułości stężeniowej. Z praktycznego punktu widzenia najważniejsze wydaje się jednak to, że zastosowane usprawnienia uczyniły metodę oznaczania *N*-Hcy w osoczu o wiele bardziej precyzyjną i dokładną. Dzięki połączeniu i częściowej automatyzacji etapów procesu analitycznego, takich jak redukcja wiązań disiarczkowych i odbiarczenie oraz hydroliza białek i wzbogacenie analitu, jak również prowadzenia go w jednym naczyniu, możliwe stało się ograniczenie czasu przygotowania próbki do 4 godzin. Udało się również znacząco zminimalizować zużycie odczynników w przeliczeniu na próbkę (do 0,375 ml) oraz ograniczyć zużycie materiałów. Co chciałabym podkreślić to fakt, że warunki prowadzenia procesu dobrałam w sposób zapewniający wysoką trwałość próbek na każdym z etapów ich obróbki, co stwarza możliwość przygotowania serii pomiarowych o dużej liczebności, bez konieczności przestrzegania reżimu czasowego. W przypadku przechowywania próbek w temperaturze 25°C, uzyskanie miarodajnych wyników pomiarów jest możliwe nawet po upływie 21 dni od momentu ich przygotowania do analizy. Główne osiągnięcia w tym obszarze przedstawiłam poniżej [H8].

- **Zastosowanie roztworu czynnika denaturującego białka na etapie przemywania osadu**, w miejsce stosowanej dotychczas wody [91]. Umożliwiło to zwiększenie odzysku analitu poprzez ograniczenie rozpuszczania się zdenaturowanego białka w wodnym roztworze PCA.
- **Przeprowadzenie redukcji wiązań disiarczkowych w warunkach denaturujących**, co przyczyniło się do uproszczenia procedury analitycznej. Dzięki połączeniu tych etapów zwiększona została wydajność procesu usuwania Hcy związanej wiązaniem disiarczkowym z białkami osocza (Rysunek 5a) i innych małowcząsteczkowych form Hcy i HTL z próbki przed poddaniem jej hydrolizie kwasowej. Badania wykazały, że TCEP cechuje się większą skutecznością działania w środowisku kwaśnym niż alkalicznym [95][H4], a niekowalencyjnie związane z białkami osocza cząsteczki różnych form Hcy są najefektywniej ekstrahowane z powierzchni po ich denaturacji [H1].
- **Wykazanie, że hydroliza kwasowa białek osocza musi być prowadzona w szklanych fiolkach I klasy hydrolitycznej**. Zastąpienie ich próbkami polipropylenowymi skutkowało około 90-krotnym spadkiem intensywności rejestrowanych sygnałów analitycznych. Przyczyny zaistniałej sytuacji upatruję w tłumieniu sygnału detektora

przez uwolnione monomery, bądź utracie analitu wskutek jego reakcji z materiałem zastosowanym do produkcji tworzywa termoplastycznego.

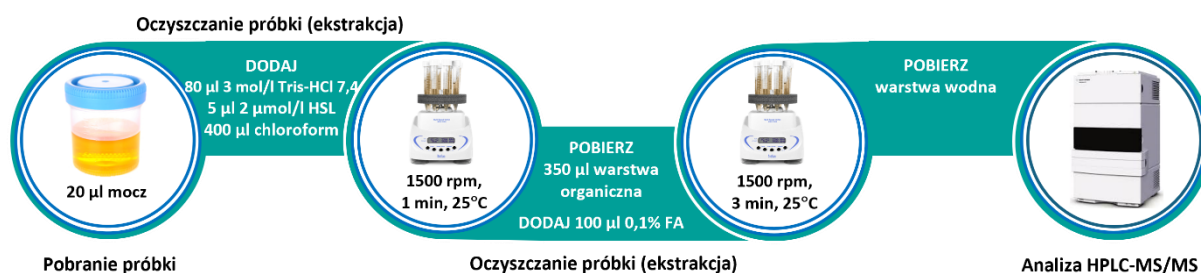
Z praktycznego punktu widzenia najważniejsze wydaje się jednak, że znaczące uproszczenie procedury analitycznej, w porównaniu do metod już znanych [89–92], umożliwia przeprowadzenie oznaczeń *N-Hcy* w osoczu nawet przez mało doświadczonego eksperymentatora. Metodę zastosowałam w analizie próbek osocza pochodzących od 15 wolontariuszy, w których stężenie analitu zawierało się w zakresie od 0,74 $\mu\text{mol/l}$ do 1,58 $\mu\text{mol/l}$ (Tabela 3). Wartości te mieściły się w zakresach wskazanych przez innych badaczy dla tego rodzaju próbek [89–91,93,96].

Metoda oznaczania HTL w próbkach moczu techniką HPLC-MS/MS [H9]

W przypadku badań, których celem jest określenie roli HTL w patogenezie i przebiegu chorób, związek ten jest oznaczany w moczu [20][H6]. HTL jako zbędny produkt przemian metabolicznych jest bowiem wydalany z organizmu człowieka przez nerki. Szacuje się, że jego stężenie w moczu jest około 100-krotnie wyższe niż w osoczu, stąd mocz jest zazwyczaj pierwszym wyborem w przypadku diagnostyki laboratoryjnej [5][H6]. Dotychczas zaprezentowano zaledwie kilka metod oznaczania HTL w próbkach moczu człowieka [27,91,97–100][H3], w tym dwie uprzednio omówione, opracowane z moim udziałem [27][H3]. Metody te, w obszarze przygotowania próbki, opierają się na wykorzystaniu technik ekstrakcyjnych, takich jak LLE [27,98–100][H3] czy ekstrakcja ciecz-ciało stałe [91,97], oraz derywatywacji chemicznej analitu za pomocą OPA [91,97], MSTFA [H3] i IBCF [27]. W kontekście separacji bazują na technikach HPLC-FLD [91,97], CE-UV [98–100] oraz GC-MS [27][H3]. Jednocześnie nie wszystkie wymienione metody cechuje wysoka czułość stężeniowa, co często uniemożliwia ich zastosowanie w analizie próbek rzeczywistych [99,100]. Co istotne, na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań literaturowych [H6] stwierdziłam, że nie podjęto prób wykorzystania do tego celu techniki HPLC-MS/MS, pomimo że wykazano jej użyteczność do oznaczania HTL w osoczu [101]. Było to o tyle zaskakujące, że HPLC-MS/MS jest dynamicznie rozwijającą się techniką łączoną, która znajduje szerokie zastosowania w analizie jakościowej i ilościowej złożonych próbek biologicznych. Postanowiłam dokładniej zbadać przyczyny takiego stanu rzeczy i wypełnić lukę w tym obszarze.

W pierwszej kolejności ustaliłam, że chromatograficzna metoda oznaczania HTL w osoczu techniką HPLC-MS/MS [101] nie może zostać adaptowana na potrzeby oznaczania HTL w moczu. Stąd zastosowałam bardzo szczegółowe podejście, dobierając wszystkie istotne parametry opisywanej metody, zarówno na etapie przygotowania próbek jak i ich analizy chromatograficznej. W trakcie projektowania i opracowywania metodologii szczególną uwagę poświęciłam doborowi warunków przygotowania próbek do analizy. Jednym z największych wyzwań było znalezienie rozwiązań metodycznych, które umożliwiłyby zminimalizowanie, bądź wręcz eliminację wpływu efektów matrycowych na końcowe wyniki analiz. W badaniach zastosowałam typowe podejście w zakresie sposobu przygotowania próbek moczu do

oznaczenia HTL [H6], które ostatecznie umożliwiło mi osiągnięcie zamierzonego celu. Zaproponowana przeze mnie procedura przygotowania próbek moczu obejmuje ekstrakcję chloroformem, a następnie reekstrakcję analitu i laktonu homoseryny (HSL) (wzorzec wewnętrzny) z fazy organicznej roztworem 0,1% kwasu mrówkowego. Końcowa analiza chromatograficzna bazowała na technice chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) sprzężonej z detektorem MS/MS (Rysunek 6), której użyteczność do oznaczania HTL w osoczu została wcześniej wykazana przez innych badaczy [101]. Próbki moczu poddawałam analizie w dobranych eksperymentalnie optymalnych warunkach chromatograficznych i detekcji, które zapewniły efektywne rozdzielenie składników analizowanych próbek oraz rejestrację sygnałów analitycznych generowanych wyłącznie przez analit i HSL (Rysunek 3 [H9]).



Rysunek 6. Schemat procedury przygotowania próbek moczu do ich analizy techniką HPLC-MS/MS na zawartość HTL. **Objaśnienia:** FA, kwas mrówkowy; HPLC-MS/MS, chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas z analizatorem mas typu potrójny kwadrupol; HSL, lakton homoseryny; Tris-HCl, bufor chlorowodorek tris(hydroksymetylo)aminometanu. **Źródło:** opracowanie własne na podstawie [H9].

Jak wspomniałam, specyfika prowadzonych prac badawczych oraz wykorzystywanej techniki pomiarowej wymusiła konieczność zastosowania dodatku wzorca wewnętrznego do próbki w celu ograniczenia wpływu na wyniki oznaczeń powszechnie kojarzonych z techniką HPLC-MS/MS efektów matrycowych. Bazując na własnym doświadczeniu [27] wykorzystałam HSL jako wzorzec wewnętrzny, który podobnie jak HTL ulega jonizacji metodą elektrorozpylania, wyłącznie w warunkach tworzenia jonów dodatnich (Rysunek 1 [H9]). Innym nowatorskim elementem tych badań było wyznaczenie wartości stałej dysocjacji (pK_a) HSL. Ze względu na fakt, że metoda przygotowania próbki opierała się na technice LLE, a dane literaturowe na temat wartości pK_a HSL nie były dostępne, postanowiłam wyznaczyć wspomniany parametr. Wyznaczona przeze mnie eksperymentalnie, metodą CE-UV, wartość pK_a dla HSL wynosi 6,32. Jednocześnie wyznaczona wartość pK_a 6,66 dla HTL (Materiały uzupełniające, Rysunek 7 [H9] doskonale koreluje z wielkością wskazaną przez innych badaczy [71][H6].

Co istotne, zastosowane rozwiązania metodyczne umożliwiły mi dostarczenie oryginalnego i czułego narzędzia analitycznego o udokumentowanej użyteczności do monitorowania zawartości HTL w moczu (Tabela 3). Istotną zaletą opracowanej metodologii jest możliwość poddania analizie próbek przygotowanych w ten sam sposób (Rysunek 6),

zarówno techniką HPLC-MS/MS [H9] jak również techniką HPLC-FLD po derywatywacji analitu OPA w warunkach opisanych w literaturze [91][H8]. Dzięki doborowi parametrów metody, częściowej automatyzacji procesu LLE oraz eliminacji potrzeby konwersji analitu w pochodną, możliwe stało się ograniczenie czasu jej przygotowania do 5 minut, zużycia odczynników do 0,585 ml, a w konsekwencji praco- i energochłonności postępowania analitycznego w przeliczeniu na próbkę. Niewątpliwie, dzięki zastosowanym rozwiązaniom znacząco ograniczyłam uciążliwość środowiskową metody w porównaniu ze znanymi procedurami (Tabela 3 [H6]). Uważam, że ze względu na prostotę sposobu przygotowania próbek do analizy oraz ich wysoką trwałość (do 28 dni w temperaturze 25°C) metoda posiada duży potencjał aplikacyjny.

4.3.6. Podsumowanie i wnioski końcowe

W latach 2018 - 2024, czyli w okresie po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych do dnia zgłoszenia wniosku w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego, prowadziłam działalność badawczo-dydaktyczną w Katedrze Chemii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. W zakresie działalności naukowej, moje szczególne zainteresowanie wzbudziły zagadnienia, które zasadniczo mieszczą się w trzech obszarach badawczych.

Obszar 1. Problematyka oznaczania małowcząsteczkowych związków siarki (HTL, N-Hcy, Cys, Hcy, Met, TCA, HPPTCA) w próbkach moczu, osocza i śliny metodami opartymi na technikach chromatograficznych [27–29][H1-H9], szczególnie technice GC [27][H2-H5]. Osiągnięcia w tym obszarze omówiłam w podrozdziałach 4.3.2. i 4.3.5.

Obszar 2. Poszukiwanie nowych metabolitów w szlaku transsulfuracji Hcy w płynach ustrojowych człowieka, to znaczy produktów interakcji Hcy, HTL i Cys z aldehydem mrówkowym oraz PLP [H2,H5,H7]. Swoje osiągnięcia w tym obszarze omówiłam w podrozdziale 4.3.3.

Obszar 3. Badanie śliny pod kątem obecności HTL oraz możliwości jej wykorzystania w badaniach nakierowanych na poznanie roli HTL, Hcy, Cys i Met w rozwoju chorób cywilizacyjnych [28,29][H1,H3,H4,H6]. Zagadnienia omówiłam w podrozdziale 4.3.4.

Za swoje szczególnie wartościowe osiągnięcie naukowe uważam opracowanie szeregu nowych narzędzi analitycznych [27][H2-H5,H7,H9] i udoskonalenie jednej istniejącej już metody [H8], umożliwiających analizę płynów ustrojowych człowieka na zawartość wybranych małowcząsteczkowych związków siarki. W szczególności metody te:

- opierają się na wykorzystaniu nowoczesnych technik rozdzielania w fazie ciekłej i gazowej w połączeniu z różnymi rodzajami detektorów, a mianowicie: HPLC-UV [H7], HPLC-FLD [H8,H9], GC-MS [27][H2-H5] oraz HPLC-MS/MS [H9];

- umożliwiają monitorowanie poziomu HTL [27][H3,H4,H9], N-Hcy [H8], Cys [H4,H7], Hcy [H4,H7], Met [H4], TCA [H5], HPPTCA [H2,H7], Glu [H7] i Cys-Gly [H7] w próbkach osocza [H2,H7,H8], śliny [H3,H4] oraz moczu człowieka [27][H3,H5,H9].

Opracowane przeze mnie metody stanowią pierwsze i jak dotąd jedyne narzędzia analityczne umożliwiające oznaczenie:

- TCA w moczu [H5], HPPTCA w osoczu [H2,H7], HTL w ślinie człowieka [H3,H4];
- związków siarki, takich jak HTL i tiole (Cys, Hcy, Met) w ślinie [H3,H4] oraz moczu [27][H3] techniką GC-MS, jak również HTL w moczu techniką HPLC-MS/MS [H9].

Metody zaprojektowałam z uwzględnieniem konieczności ograniczenia ich uciążliwości środowiskowej. Co więcej, w badaniach zastosowałam w wielu aspektach podejście odmienne od klasycznego, zarówno w zakresie doboru technik analitycznych jak i sposobu przygotowania próbek do analizy. W wyniku kompleksowo przeprowadzonego procesu walidacji, zgodnie z wytycznymi FDA [30], dowiodłam że dostarczone metody stanowią efektywne narzędzia analityczne (Tabela 3). W znakomitej większości opierają się one na wykorzystaniu ogólnodostępnej i stosunkowo taniej w eksploatacji aparatury pomiarowej, co niesie za sobą możliwość ich zastosowania komercyjnego. Ze względu na prostotę sposobu przygotowania próbki do analizy oraz ich wysoką trwałość, trzy spośród opracowanych przeze mnie metod charakteryzuje duży potencjał aplikacyjny [H7-H9]. Z praktycznego punktu widzenia najważniejsze wydaje się jednak, że ich wykorzystanie pozwoliło mi na wykazanie, często po raz pierwszy, wielu bardzo istotnych faktów.

- TCA, czyli produkt reakcji Hcy i jej metabolitu (HTL) z aldehydem mrówkowym, występuje w organizmie człowieka i jest z niego wydalany z moczem. Kwestia roli i źródła pochodzenia TCA w organizmie człowieka pozostaje do wyjaśnienia [H5].
- HPPTCA, który stanowi produkt interakcji aktywnej biologicznie formy witaminy B₆ - PLP oraz Cys, jest obecny w osoczu człowieka. Wyniki badań pilotażowych uprawniają do postawienia hipotezy, że HPPTCA stanowi rezerwuar witaminy B₆ bądź jedną z jej form w organizmie człowieka [H2,H7].
- HTL jest obecny w ślinie człowieka, a jego stężenie w tej matrycy jest zbliżone do zawartości HTL w próbkach moczu. Co więcej, wyniki badań wstępnych wskazują na możliwość zastąpienia obecnie wykorzystywanego w diagnostyce laboratoryjnej moczu, śliną. Trafność tej hipotezy musi zostać zweryfikowana ze względu na brak możliwości wyciągnięcia jednoznacznych wniosków na temat istnienia korelacji między zawartością HTL w ślinie i moczu, co może być wynikiem małej liczebności grupy badanej [H3,H4].
- Ślina posiada potencjał, aby w niedalekiej przyszłości stać się materiałem biologicznym powszechnie wykorzystywanym w diagnostyce laboratoryjnej w kontekście oznaczania HTL, Cys, Hcy i Met [H1,H3,H4].
- Technika GC-MS stanowi użyteczne narzędzie do monitorowania poziomu HTL, Cys, Hcy, Met, HPPTCA i TCA w próbkach biologicznych, takich jak mocz, osocze i ślina człowieka.

Jej wykorzystanie do tego celu stanowi niekonwencjonalne podejście do analityki hydrofilowych związków siarki [27][H2-H5].

Ponadto praktyczne wykorzystanie opracowanych narzędzi, obok wcześniej zaprojektowanych i zwalidowanych z moim udziałem metod, umożliwiło mi przeprowadzenie eksperymentów i uzyskanie wyników, których wnikliwa analiza pozwoliła na sformułowanie i przedstawienie szeregu innych, ważnych w mojej ocenie wniosków.

- Połączenie etapów przygotowania próbki, takich jak redukcja wiązań disiarczkowych i odbiałczanie [H4,H8], hydroliza białek i wzbogacanie analitów poprzez odparowanie rozpuszczalnika [H8], jak również ekstrakcja i derywatywacja analitu [27][H5] umożliwia zwiększenie efektywności tych procesów. Jednocześnie zastosowanie takich rozwiązań metodologicznych umożliwia zmniejszenie czasochłonności i pracochłonności, a ostatecznie kosztochłonności całej analizy.
- Ograniczenie udziału człowieka w procesie, poprzez częściowe zautomatyzowanie etapów przygotowania próbek do analizy, sprzyja ograniczeniu jego pracochłonności oraz poprawie dokładności i powtarzalności wyników pomiarów [H2-H5,H7-H9].
- Zakres zastosowań CMQT jako odczynnika derywatyzującego może być poszerzony o kwasy 1,3-tiazolidyno-4-karboksylowe [H7]. W odróżnieniu od małowcząsteczkowych związków siarki czy albuminy [28,29,34,80,81,85][H1,H7], HPPTCA reaguje z CMQT w środowisku kwaśnym. Reakcja zachodzi wyłącznie w warunkach redukująco-denaturujących, w środowisku wodnym, w temperaturze otoczenia i prowadzi do utworzenia, trwałej przez co najmniej 48 godzin, w warunkach prowadzenia eksperymentu, 2-S-chinoliniowej pochodnej HPPTCA-CMQT.
- HSL może być stosowany jako wzorzec wewnętrzny w metodach oznaczania HTL w próbkach moczu, które opierają się na wykorzystaniu techniki GC-MS [27] i HPLC-MS/MS [H9]. Wyznaczona eksperymentalnie wartość pK_a HSL wynosi 6,32 [H9]. Są to pierwsze dane literaturowe na ten temat.
- Technika HILIC w połączeniu z detektorem MS/MS [H9], obok metod bazujących na innych technikach separacji w fazie ciekłej (HPLC-UV, HPLC-FLD i CE-UV) oraz gazowej (GC-MS) [27][H3,H4,H6], stanowi użyteczne narzędzie do monitorowania poziomu HTL w próbkach biologicznych. Metody te stanowią komplementarne wobec siebie rozwiązania metodyczne, co dotychczas nie zostało stwierdzone w odniesieniu do HTL.
- Metody oznaczania HPPTCA w osoczu, opierające się na wykorzystaniu techniki GC-MS [H2] oraz HPLC-UV [H7], stanowią jedyne dostępne narzędzia analityczne reprezentujące dodatkowo komplementarne wobec siebie rozwiązania metodyczne.
- Derywatywacja chemiczna stanowi niezbędny etap procedury przygotowania próbek biologicznych do analizy chromatograficznej technikami GC-MS, HPLC-UV i HPLC-FLD na zawartość HTL, Cys, Hcy, Met, HPPTCA, TCA i N-Hcy [27][H2-H5,H7-H9]. W przypadku metod oznaczania HTL techniką HPLC-MS/MS, konwersja analitu w pochodną nie jest

konieczna [101][H9]. Jednocześnie próbki należy odbiąć, szczególnie gdy poddawane są analizie techniką GC [H2-H4].

- Skutecznymi sposobami minimalizowania wpływu efektów matrycowych na wyniki analiz, uzyskiwanych metodami bazującymi na wykorzystaniu technik separacyjnych (HPLC, GC) sprzężonych z detektorem MS i MS/MS [H2-H5,H9], jest zastosowanie kalibracji ilościowej metodami wzorca wewnętrznego oraz pojedynczego dodatku wzorca. W przypadku metod opierających się na wykorzystaniu techniki HPLC-UV czy HPLC-FLD nie stwierdziłam występowania efektów matrycowych [H7-H9].
- Komercyjnie dostępne odczynniki derywatywizujące, takie jak MSTFA-TMCS [H2-H4] i IBCF [27][H5] z powodzeniem mogą być stosowane do derywatywizacji HTL [27][H3,H4], TCA [H5] i HPPTCA [H2] w celu otrzymania ich lotnych pochodnych rozdzielanych techniką GC-MS, co dotychczas nie zostało stwierdzone w odniesieniu do tych związków. W celu zapewnienia powtarzalności i odtwarzalności wyników pomiarów należy jednak ściśle kontrolować warunki prowadzenia reakcji.
- Wykorzystanie narzędzia AGREE (*Analytical Greenness calculator*) umożliwia wieloaspektowe określenie uciążliwości środowiskowej opracowanych metod analitycznych i ułatwia ich ocenę w oparciu o dwanaście zasad zielonej chemii [H7,H9].
- Zastosowanie technik ekstrakcyjnych na etapie przygotowania próbek biologicznych do analizy techniką GC-MS [27][H3,H5] czy HPLC-MS/MS [H9] umożliwia selektywną izolację analitu oraz jego wzbogacenie, jak również jednoczesne odbięcie próbki [H3]. Takie podejście jest również korzystne w kontekście minimalizowania wpływu efektów matrycowych na wyniki analiz [H9].

Za swoje równie istotne osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę zgłoszenia wniosku w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego, obok opracowania szeregu metod analitycznych o udokumentowanej przydatności [27][H2-H5,H7-H9], uważam przygotowanie opracowań naukowych o charakterze przeglądowym [28,29][H1,H6]. Są to obszernie prace poświęcone problematyce oznaczania biologicznie ważnych związków siarki, w tym HTL, N-Hcy, Cys, Hcy, Met, Glu i Cys-Gly, w próbkach moczu, osocza i śliny, metodami opartymi na technikach chromatograficznych i elektroforetycznych. Prace te stanowią szczegółowe i krytyczne opracowania naukowe, w których wraz ze współautorami, podjęłam próbę nakreślenia dalszych kierunków rozwoju metod oznaczania wymienionych wyżej związków.

Uważam że, wyniki mojej pracy badawczej znacząco wzbogacają praktyczną wiedzę z zakresu analityki śliny, osocza i moczu w kontekście oznaczania HTL, N-Hcy, Cys, Hcy, Met, TCA, HPPTCA, Glu i Cys-Gly w oparciu o techniki separacyjne (HPLC, GC) sprzężone z różnymi rodzajami detektorów (UV, FLD, MS, MS/MS). Opracowane przeze mnie metody mogą stanowić użyteczne narzędzia analityczne w przypadku badań populacyjnych. Szczególnie mogą one znaleźć zastosowanie w badaniach zmierzających do lepszego zrozumienia roli wspomnianych związków w organizmie człowieka. Równie istotne będzie ich wykorzystanie w obszarze rozwijania potencjału diagnostycznego śliny.

Tabela 3. Zestawienie podstawowych informacji na temat metod oznaczania wybranych małowcząsteczkowych związków siarki w próbkach biologicznych, opartych na wykorzystaniu technik HPLC i GC. **Źródło:** opracowanie własne na podstawie [H2-H5,H7-H9].

Analityk (Wzorzec)	Rodzaj próbki	Objętość próbki [μl]	Technika pomiarowa	Zakres liniowości [μmol/l]	LOQ [μmol/l]	Zużycie odczynników* [ml]	Czas analizy** [min]	Próba badana (grupa kontrolna) [μmol/l]	Publikacja
HPPTCA	Osocze	250	GC-MS	1,0 - 20,0	1,0	0,250	~165	18,86 - 35,34 (n = 13)	[H2]
HTL	Ślina Mocz	300 300	GC-MS	0,05 - 1,0	0,05	0,925 0,950	~30	0,07 - 0,19 0,08 - 0,27 (n = 18)	[H3]
HTL Cys Hcy Met	Ślina	50	GC-MS	1,0 - 20,0 0,5 - 20,0 0,5 - 20,0 0,5 - 20,0	0,05 0,10 0,10 0,10	0,270	~65	Nie wykryto 3,73 - 16,63 0,32 - 1,67 12,07 - 51,0 (n = 10)	[H4]
TCA	Mocz	50	GC-MS	1,0 - 50,0	1,0	0,336	~30	0,18 - 6,92 (n = 15)	[H5]
HPPTCA	Osocze	50	HPLC-UV	1,0 - 100,0	1,0	0,075	~345	19,20 - 65,60 (n = 18)	[H7]
N-Hcy	Osocze	25	HPLC-FLD	0,25 - 10,0	0,25	0,375	~240	0,74 - 1,58 (n = 15)	[H8]
HTL (HSL)	Mocz	20 80	HPLC-MS/MS HPLC-FLD	0,02 - 0,40	0,02	0,585 2,020	~11 ~8	0,02 - 0,09 (n = 15)	[H9]

Tabela 3. Ciąg dalszy.

Legenda: (*) zużycie odczynników na etapie przygotowania próbki do analizy, wyrażone w przeliczeniu na próbkę; (**) przybliżony czas analizy uwzględniający czas przygotowania próbki i jej analizy, wyrażony w przeliczeniu na próbkę. **Objaśnienia:** Cys, cysteina; GC-MS, chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrem mas wyposażonym w analizator mas typu pojedynczy kwadrupol; Hcy, homocysteina; HPPTCA, kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy; HSL, lakton homoseryny; HTL, tiolakton homocysteiny; HPLC-FLD, chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem fluorescencyjnym; HPLC-MS/MS, chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas z analizatorem mas typu potrójny kwadrupol; HPLC-UV, chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem spektrofotometrycznym; LOQ, granica oznaczalności; Met, metionina; n, liczebność grupy badanej; N-Hcy, homocysteina związana wiązaniem amidowym z białkami; TCA, kwas 1,3-tiazinano-4-karboksylowy.

4.3.7. Perspektywy badań i planowane kierunki rozwoju

Na podstawie przeprowadzonej wnikliwej analizy literatury naukowej oraz wyników uzyskanych w toku przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów mogę stwierdzić że zasadne jest kontynuowanie badań w zakresie opracowywania nowych metod analizy próbek biologicznych na zawartość istotnych z biologicznego punktu widzenia związków siarki oraz ich zastosowania do monitorowania przemian metabolicznych. Jak już wspomniałam, pomimo prowadzonych od wielu lat badań, rola Hcy i powiązanych z nią w szlaku metabolicznym małowęzłeczkowych związków siarki w patogenezie wielu chorób cywilizacyjnych budzi wiele wątpliwości. Niewyjaśniona pozostaje również kwestia roli oraz źródeł pochodzenia TCA i HPPTCA w organizmach żywych, czyli związków których, obecność w płynach ustrojowych człowieka wykazałam eksperymentalnie. Według mojej najlepszej wiedzy, współautorskie opracowania naukowe naszego zespołu dotyczące ich wykrycia są pierwszymi w tym obszarze [H2,H5,H7]. Mając na uwadze znikomą ilość posiadanych informacji o TCA i HPPTCA oraz małą dostępność metod umożliwiających ich oznaczenie, w niedalekiej przyszłości planuję stworzyć odpowiednie narzędzia i wykorzystać je do badań populacyjnych w celu uzyskania dodatkowych informacji na temat wspomnianych związków.

Nie zamierzam jednak ograniczać swoich działań wyłącznie do analityki płynów biologicznych. Jednym z zagadnień, które budzi moje zainteresowanie, jest oznaczanie substancji bioaktywnych wykazujących działanie prozdrowotne w żywności funkcjonalnej. Jest ona sprzedawana pod chwytliwą marketingową nazwą „super żywność - *superfoods*”. Na przestrzeni ostatnich lat znacząco wzrosło zainteresowanie konsumentów tego rodzaju produktami spożywczymi, które z definicji powinny stanowić nieprzetworzoną żywność pochodzenia naturalnego, bogatą w składniki odżywcze, których ilość i właściwości mają działać korzystnie na organizm człowieka. W przypadku wielu cenionych za swoje prozdrowotne właściwości i wartości odżywcze produktów spożywczych, brakuje podstawowych informacji o ich składzie jakościowym i ilościowym, a tym bardziej danych na temat substancji, które miałyby wykazywać takie działanie. Z tego powodu chciałabym wykorzystać zdobyte doświadczenie i wiedzę, w zakresie opracowywania i kompleksowej walidacji chromatograficznych metod bioanalitycznych w badaniach nakierowanych na poszukiwanie odpowiedzi na pytanie: Które ze składników produktów spożywczych, zaliczanych do „super żywności”, decydują o ich własnościach funkcjonalnych i prozdrowotnych? Realizacja zamierzonych celów będzie możliwa dzięki:

- budowaniu zespołu, składającego się z grupy studentów i doktorantów ukierunkowanego na osiągnięcie wspólnych, wyznaczonych celów;
- zabezpieczeniu środków koniecznych na realizację planowanych przedsięwzięć poprzez aplikowanie w konkursach o finansowanie projektów badawczych zarówno ze źródeł zewnętrznych, jak i wewnętrznych;

- doskonaleniu warsztatu naukowego, z uwzględnieniem najnowszych metod i technik badawczych, między innymi poprzez podejmowanie aktywności naukowej w uznanych (zagranicznych i krajowych) ośrodkach badawczych oraz akademickich;
- nawiązaniu nowej oraz kontynuacji dotychczasowej współpracy ze specjalistami z poszczególnych dziedzin medycyny i nauk pokrewnych, dzięki czemu możliwe będzie zastosowanie opracowanych metod do badań populacyjnych oraz uzyskanie fachowego wsparcia merytorycznego w analizie i interpretacji danych biomedycznych.

4.3.8. Wykaz cytowanej literatury

(z pominięciem pozycji wymienionych w punkcie 4.2.)

- [1] L. Włodek, E. Bald, Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2003.
- [2] G. Wu, Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition, *Amino Acids*. 37 (2009) 1-17.
- [3] Y. Martínez, X. Li, G. Liu, P. Bin, W. Yan, D. Más, M. Valdivié, C.A.A. Hu, W. Ren, Y. Yin, The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases, *Amino Acids*. 49 (2017) 2091-2098.
- [4] H. Jakubowski, Homocysteine in protein structure/function and human disease. Chemical biology of homocysteine-containing proteins, Wydawnictwo Springer, Wiedeń, 2013.
- [5] H. Jakubowski, R. Głowacki, Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites, *Adv. Clin. Chem.* 55 (2011) 81-103.
- [6] H. Jakubowski, Homocysteine modification in protein structure/function and human disease, *Physiol. Rev.* 99 (2019) 555-604.
- [7] J. Perła-Kaján, T. Twardowski, H. Jakubowski, Mechanisms of homocysteine toxicity in humans, *Amino Acids*. 32 (2007) 561-572.
- [8] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, Identification and origin of *N*ε-homocysteinyl-lysine isopeptide in humans and mice, *Amino Acids*. 39 (2010) 1563-1569.
- [9] J. Perła-Kaján, H. Jakubowski, Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 3140-3181.
- [10] P. Oliveira, F. Laurindo, Implications of plasma thiol redox in disease, *Clin. Sci.* 132 (2018) 1257-1280.
- [11] R. Moretti, P. Caruso, The controversial role of homocysteine in neurology: From labs to clinical practice, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 231: 1-22.
- [12] S.G. Chrysant, G.S. Chrysant, The current status of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: a mini review, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 16 (2018) 559-565.
- [13] E. Muzurović, I. Kraljević, M. Solak, S. Dragnić, D.P. Mikhailidis, Homocysteine and diabetes: Role in macrovascular and microvascular complications, *J. Diabetes Complications*. 35 (2021) 107834: 1-16.
- [14] T. Hasan, R. Arora, A. Bansal, R. Bhattacharya, G. Sharma, L. Singh, Disturbed

- homocysteine metabolism is associated with cancer, *Exp. Mol. Med.* 51 (2019) 21-34.
- [15] G.S. Sharma, T. Kumar, T.A. Dar, L.R. Singh, Protein N-homocysteinylation: From cellular toxicity to neurodegeneration, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850 (2015) 2239-2245.
- [16] A. Kumar, H.A. Palfrey, R. Pathak, P.J. Kadowitz, T.W. Gettys, S.N. Murthy, The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health, *Nutr. Metab.* 14 (2017) 78: 1-12.
- [17] R. Esse, M. Barroso, I.T. De Almeida, R. Castro, The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: State-of-the-art, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 867: 1-24.
- [18] E. Azzini, S. Ruggeri, A. Polito, Homocysteine: Its possible emerging role in at-risk population groups, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1421: 1-27.
- [19] A.D. Smith, H. Refsum, Homocysteine – from disease biomarker to disease prevention, *J. Intern. Med.* 290 (2021) 826-854.
- [20] K. Borowczyk, J. Piechocka, R. Głowacki, I. Dhar, Ø. Midtun, G.S. Tell, P.M. Ueland, O. Nygård, H. Jakubowski, Urinary excretion of homocysteine thiolactone and the risk of acute myocardial infarction in coronary artery disease patients: the WENBIT trial, *J. Intern. Med.* 285 (2019) 232-244.
- [21] M.R. Azarpazhooh, C. Bogiatzi, J.D. Spence, Stroke prevention: Little-known and neglected aspects, *Cerebrovasc. Dis.* 50 (2021) 622-635.
- [22] D.M. Zhang, J.X. Ye, J.S. Mu, X.P. Cui, Efficacy of vitamin B supplementation on cognition in elderly patients with cognitive-related diseases: A systematic review and meta-analysis, *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 30 (2017) 50-59.
- [23] P.R. Mandaviya, L. Stolk, S.G. Heil, Homocysteine and DNA methylation: A review of animal and human literature, *Mol. Genet. Metab.* 113 (2014) 243-252.
- [24] A. Martí-Carvajal, I. Solà, D. Lathyris, M. Dayer, Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events, *Cochrane Database Syst. Rev.* 1 (2015) CD006612: 1-109.
- [25] A.D. Smith, H. Refsum, Homocysteine, B vitamins, and cognitive impairment, *Annu. Rev. Nutr.* 36 (2016) 211-239.
- [26] S. Koka, T.J. Beebe, S.P. Merry, R.S. DeJesus, L.D. Berlanga, A.L. Weaver, V.M. Montori, D.T. Wong, The preferences of adult outpatients in medical or dental care settings for giving saliva, urine or blood for clinical testing, *J. Am. Dent. Assoc.* 139 (2008) 735-740.
- [27] M. Wrońska, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, R. Głowacki, Application of GC–MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine, *J. Chromatogr. B.* 1099 (2018) 18-24.
- [28] R. Głowacki, J. Piechocka, E. Bald, G. Chwatko, Techniki separacyjne w analizie materiału biologicznego na zawartość wybranych związków siarki, *Bioanalitika w nauce i życiu. Tom 1* (red. I. Staneczko-Baranowska, B. Buszewski), Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2020.
- [29] R. Głowacki, J. Piechocka, E. Bald, G. Chwatko, Application of separation techniques in

- analytics of biologically relevant sulfur compounds, Handbook of Bioanalytics (red. B. Buszewski, I. Baranowska), Wydawnictwo Springer, Cham, 2022.
- [30] FDA. M10 Bioanalytical method validation and study sample analysis. Guidance for industry, Rockville, MD, 2022.
- [31] T. Toyo'oka, Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples, *J. Chromatogr. B.* 877 (2009) 3318-3330.
- [32] K. Kuśmierk, G. Chwatko, R. Głowacki, E. Bald, Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B.* 877 (2009) 3300-3308.
- [33] F. Carlucci, A. Tabucchi, Capillary electrophoresis in the evaluation of aminothiols in body fluids, *J. Chromatogr. B.* 877 (2009) 3347-3357.
- [34] K. Kuśmierk, 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 Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1290-1307.
- [35] A. Tsiasioti, P.D. Tzanavaras, Determination of glutathione and glutathione disulfide using liquid chromatography: A review on recent applications, *Microchem. J.* 193 (2023) 109157.
- [36] M. Isokawa, T. Kanamori, T. Funatsu, M. Tsunoda, Analytical methods involving separation techniques for determination of low-molecular-weight biothiols in human plasma and blood, *J. Chromatogr. B.* 964 (2014) 103-115.
- [37] P. Daneshvar, M. Yazdanpanah, C. Cuthbert, D.E.C. Cole, Quantitative assay of plasma homocysteine thiolactone by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 358-362.
- [38] P. Hušek, P. Matucha, A. Vránková, P. Šimek, Simple plasma work-up for a fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic amino acids, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 789 (2003) 311-322.
- [39] S.P. Stabler, P.D. Marcell, E.R. Podell, R.H. Allen, Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 185-196.
- [40] Z. Švagera, D. Hanzlíková, P. Šimek, P. Hušek, Study of disulfide reduction and alkyl chloroformate derivatization of plasma sulfur amino acids using gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2953-2963.
- [41] A. Windelberg, O. Årseth, G. Kvalheim, P.M. Ueland, Automated assay for the determination of methylmalonic acid, total homocysteine, and related amino acids in human serum or plasma by means of methylchloroformate derivatization and gas chromatography-mass spectrometry, *Clin. Chem.* 51 (2005) 2103-2109.
- [42] R.R. De la Flor St. Remy, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, Determination of total homocysteine in human serum by capillary gas chromatography with sulfur-specific detection by double focusing ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 299-305.
- [43] S.W. Myung, M. Kim, H.K. Min, E.A. Yoo, K.R. Kim, Determination of homocysteine and

- its related compounds by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 727 (1999) 1-8.
- [44] C.J. Tsai, F.Y. Liao, J.R. Weng, C.H. Feng, Tandem derivatization combined with salting-out assisted liquid-liquid microextraction for determination of biothiols in urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1524 (2017) 29-36.
- [45] H. Kataoka, H. Tanaka, A. Fujimoto, I. Noguchi, M. Makita, Determination of sulphur amino acids by gas chromatography with flame photometric detection, *Biomed. Chromatogr.* 8 (1994) 119-124.
- [46] J.I. Sigit, M. Hages, K.A. Brensing, U. Frotscher, K. Pietrzik, K. Von Bergmann, D. Lütjohann, Total plasma homocysteine and related amino acids in end-stage renal disease (ESRD) patients measured by gas chromatography-mass spectrometry - comparison with the Abbott IMx homocysteine assay and the HPLC method, *Clin. Chem. Lab. Med.* 39 (2001) 681-690.
- [47] E. Roblegg, A. Coughran, D. Sirjani, Saliva: An all-rounder of our body, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 142 (2019) 133-141.
- [48] K. Ngamchuea, K. Chaisiwamongkhol, C. Batchelor-Mcauley, R.G. Compton, Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers - a tutorial review, *Analyst.* 143 (2018) 81-99.
- [49] H. Elmongy, M. Abdel-Rehim, Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis. A review, *Trends Anal. Chem.* 83 (2016) 70-79.
- [50] B. Viswanath, C.S. Choi, K. Lee, S. Kim, Recent trends in the development of diagnostic tools for diabetes mellitus using patient saliva, *Trends Anal. Chem.* 89 (2017) 60-67.
- [51] K.E. Kaczor-Urbanowicz, F. Wei, S.L. Rao, J. Kim, H. Shin, J. Cheng, M. Tu, D.T.W. Wong, Y. Kim, Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1872 (2019) 49-59.
- [52] A. Roi, L.C. Rusu, C.I. Roi, R.E. Luca, S. Boia, R.I. Munteanu, A new approach for the diagnosis of systemic and oral diseases based on salivary biomolecules, *Dis. Markers.* 2019 (2019) 8761860: 1-11.
- [53] N.J. Ashton, M. Ide, H. Zetterberg, K. Blennow, Salivary biomarkers for Alzheimer's disease and related disorders, *Neurol. Ther.* 8 (2019) S83-S94.
- [54] N. Sarigul, F. Korkmaz, İ. Kurultak, A new artificial urine protocol to better imitate human urine, *Sci. Rep.* 9 (2019) 20159: 1-11.
- [55] S. Aitekenov, A. Gaipov, R. Bukasov, Review: Detection and quantification of proteins in human urine, *Talanta.* 223 (2021) 121718: 1-20.
- [56] P. Hušek, Chromatography: Gas| Derivatization, *Encyclopedia of Separation Science* (red. C.F. Poole, I.D. Wilson, M. Cooke), Wydawnictwo Academic Press, 2000.
- [57] P. Hušek, P. Šimek, Alkyl chloroformates in sample derivatization strategies for GC analysis. Review on a decade use of the reagents as esterifying agents, *Curr. Pharm. Anal.* 2 (2006) 23-43.
- [58] J. Halket, V. Zaikin, Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9 (2003) 1-21.

- [59] V. Zaikin, J. Halket, Derivatization in mass spectrometry - 2. Acylation, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9 (2003) 421-434.
- [60] J.M. Halket, V.G. Zaikin, Derivatization in mass spectrometry– 3. Alkylation (arylation), *Eur. J. Mass Spectrom.* 10 (2004) 1-19.
- [61] M.J.N. de Paiva, H.C. Menezes, P.P. Christo, R.R. Resende, Z. de L. Cardeal, An alternative derivatization method for the analysis of amino acids in cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 931 (2013) 97-102.
- [62] F. Shahrokhi, C.W. Gehrke, Quantitative gas-liquid chromatography of sulfur containing amino acids, *J. Chromatogr. A.* 36 (1968) 31-41.
- [63] V.T.P. Vinod, R.B. Sashidhar, V.U.M. Sarma, S.S. Raju, Comparative amino acid and fatty acid compositions of edible gums kondagogu (*Cochlospermum gossypium*) and karaya (*Sterculia urens*), *Food Chem.* 123 (2010) 57-62.
- [64] H. Hellmann, S. Mooney, Vitamin B6: A molecule for human health?, *Molecules.* 15 (2010) 442-459.
- [65] V.R. da Silva, K.A. Russell, J.F. Gregory, Vitamin B6, Present Knowledge in Nutrition (red. J. Erdman, I. Macdonald, S. Zeisel), Wydawnictwo Wiley, Blackwell, 2012.
- [66] H. Kalász, Biological role of formaldehyde, and cycles related to methylation, demethylation, and formaldehyde production, *Mini-Reviews Med. Chem.* 3 (2003) 175-192.
- [67] M. Pietzke, G. Burgos-Barragan, N. Wit, J. Tait-Mulder, D. Sumpton, G.M. Mackay, K.J. Patel, A. Vazquez, Amino acid dependent formaldehyde metabolism in mammals, *Commun. Chem.* 3 (2020) 1-10.
- [68] J.D. Rizak, Formaldehyde and Alzheimer’s disease: A brief history, *Formaldehyde: Synthesis, applications and potential health effects* (red. A. Patton), Wydawnictwo Nova Science Publishers, Nowy Jork, 2015.
- [69] J. Wriston, C. Mackenzie, Synthesis and metabolism of 1, 3-thiazane-4-carboxylic acid derived from formaldehyde and homocysteine, *J. Biol. Chem.* 225 (1957) 607-614.
- [70] W.B. Neely, Action of formaldehyde on microorganisms II.: Formation of 1, 3-thiazane-4-carboxylic acid in *Aerobacter Aerogenes* treated with formaldehyde, *J. Bacteriol.* 85 (1963) 1420-1422.
- [71] H. Jakubowski, Mechanism of the condensation of homocysteine thiolactone with aldehydes, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 8039-8043.
- [72] Y. Matsuo, Formation of Schiff bases of pyridoxal phosphate. Reaction with metal ions, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 2011-2015.
- [73] M.V. Buell, R.E. Hansen, Reaction of pyridoxal-5-phosphate with aminothiols, *J. Am. Chem. Soc.* 82 (1960) 6042-6049.
- [74] F. Bergel, K. Harrap, Interaction between carbonyl groups and biologically essential substituents. Part 111 The formation of a thiazolidine derivative in aqueous solution from pyridoxal phosphate and L-cysteine, *J. Chem. Soc.* 789 (1961) 4051-4056.
- [75] D. Mackay, The mechanism of the reaction of cysteine with pyridoxal 5'-phosphate,

- Arch. Biochem. Biophys. 99 (1962) 93-100.
- [76] D. Mackay, D.M. Shepherd, Inhibition of histidine decarboxylases and interaction of the inhibitors with pyridoxal 5'-phosphate, *Biochim. Biophys. Acta.* 59 (1962) 553-561.
- [77] L. Terzuoli, R. Leoncini, R. Pagani, R. Guerranti, D. Vannoni, F. Ponticelli, E. Marinello, Some chemical properties and biological role of thiazolidine compounds, *Life Sci.* 63 (1998) 1251-1267.
- [78] R. Głowacki, J. Stachniuk, K. Borowczyk, H. Jakubowski, Quantification of homocysteine and cysteine by derivatization with pyridoxal 5'-phosphate and hydrophilic interaction liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 1935-1941.
- [79] Ø. Midttun, S. Hustad, J. Schneede, S.E. Vollset, P.M. Ueland, Plasma vitamin B-6 forms and their relation to transsulfuration metabolites in a large, population-based study, *Am. J. Clin. Nutr.* 86 (2007) 131-138.
- [80] 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 Biomed. Sci. Appl.* 877 (2009) 3400-3404.
- [81] R. Głowacki, E. Bald, Determination of N-acetylcysteine and main endogenous thiols in human plasma by HPLC with ultraviolet detection in the form of their S-quinolinium derivatives, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32 (2009) 2530-2544.
- [82] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE - Analytical GREENness metric approach and software, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10076-10082.
- [83] F. Pena-Pereira, M. Tobiszewski, W. Wojnowski, E. Psillakis, A tutorial on AGREEprep an analytical greenness metric for sample preparation, *Adv. Sample Prep.* 3 (2022) 100025: 1-7.
- [84] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, E. Psillakis, AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 149 (2022) 116553: 1-9.
- [85] J. Stachniuk, P. Kubalczyk, P. Furmaniak, R. Głowacki, A versatile method for analysis of saliva, plasma and urine for total thiols using HPLC with UV detection, *Talanta.* 155 (2016) 70-77.
- [86] J. Piechocka, M. Wrońska, G. Chwatko, H. Jakubowski, R. Głowacki, Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 1149 (2020) 122155: 1-7.
- [87] J. Stachniuk, P. Furmaniak, R. Głowacki, Potencjał diagnostyczny śliny w kontekście oznaczania aminokwasów tiolowych i ich związku z chorobami, *Analityka Nauka i Praktyka.* 1 (2016) 64-68.
- [88] W.K.C. Lai, M.Y. Kan, Homocysteine-induced endothelial dysfunction, *Ann. Nutr. Metab.* 67 (2015) 1-12.
- [89] Y. Uji, Y. Motomiya, N. Hanyu, F. Ukaji, H. Okabe, Protein-bound homocystamide measured in human plasma by HPLC, *Clin. Chem.* 48 (2002) 941-944.
- [90] A.F. Perna, E. Satta, F. Acanfora, C. Lombardi, D. Ingrosso, N.G. De Santo, Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients, *Kidney Int.* 69 (2006)

869-876.

- [91] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, An on-column derivatization method for the determination of homocysteine-thiolactone and protein *N*-linked homocysteine, *Amino Acids*. 41 (2011) 187-194.
- [92] H. Jakubowski, Quantification of urinary *S*- and *N*-homocysteinylation of protein and homocysteine-thiolactone in mice, *Anal. Biochem.* 508 (2016) 118-123.
- [93] A. Szlauer, A. Mielimonka, R. Głowacki, K. Borowczyk, J. Stachniuk, A. Undas, Protein *N*-linked homocysteine is associated with recurrence of venous thromboembolism, *Thromb. Res.* 136 (2015) 911-916.
- [94] L. Turell, R. Radi, B. Alvarez, The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes, *Free Radic. Biol. Med.* 65 (2013) 244-253.
- [95] J.M. Yost, J.D. Knight, D.M. Coltart, E.W. Li, Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, *Encyclopedia of reagents for organic chemistry* (red. L.A. Paquette, D. Crich, P.L. Fuchs, G.A. Molander), Wydawnictwo John Wiley & Sons, 2001.
- [96] H. Jakubowski, New method for the determination of protein *N*-linked homocysteine, *Anal. Biochem.* 380 (2008) 257-261.
- [97] G. Chwatko, H. Jakubowski, Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans, *Clin. Chem.* 51 (2005) 408-415.
- [98] P. Furmaniak, P. Kubalczyk, R. Głowacki, Determination of homocysteine thiolactone in urine by field amplified sample injection and sweeping MEKC method with UV detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 961 (2014) 36-41.
- [99] K. Purgat, P. Olejarz, I. Kośka, R. Głowacki, P. Kubalczyk, Determination of homocysteine thiolactone in human urine by capillary zone electrophoresis and single drop microextraction, *Anal. Biochem.* 596 (2020) 113640: 1-6.
- [100] K. Purgat, I. Kośka, P. Kubalczyk, The use of single drop microextraction and field amplified sample injection for CZE determination of homocysteine thiolactone in urine, *Molecules*. 26 (2021) 5687: 1-13.
- [101] B. Arora, A. Narayanasamy, J. Nirmal, N. Halder, S. Patnaik, A.K. Ravi, T. Velpandian, Development and validation of a LC–MS/MS method for homocysteine thiolactone in plasma and evaluation of its stability in plasma samples, *J. Chromatogr. B.* 944 (2014) 49-54.

5. Informacja o aktywności naukowej zrealizowanej w podmiocie innym niż jednostka macierzysta

Dotychczas **odbyłam kilka krótkoterminowych krajowych oraz zagranicznych staży, trwających łącznie 11 miesięcy.** Aktywność naukową realizowałam w:

a) University of Ljubljana, Faculty of Health Sciences, Lublana

W 2017 oraz 2019 roku odbyłam odpowiednio **3-tygodniowy** (06.2017) oraz **3-miesięczny** (05 - 07.2019) **staż naukowy** w laboratorium prof. dr Polonca Trebše. Tematyka badawcza

obejmowała zagadnienia związane z określeniem potencjału alg (*Chlorella vulgaris*) w procesie oczyszczania ścieków komunalnych, do celów usuwania związków z grupy bisfenoli i produktów ich biotransformacji, które sklasyfikowano jako szczególnie niebezpieczne dla istot żywych. Pobyt w jednostce zrealizowałam dzięki uzyskaniu **2-krotnie stypendium** (07.2016, 03.2019) w ramach Środkowoeuropejskiego Programu Wymiany Uniwersyteckiej - **CEEPUS** (CIII-SI-0905-03-1617-M-98347). Wymiernym **efektem aktywności naukowej** jest **publikacja**:

- F. Prosenc*, **J. Piechocka**, D. Škufca, E. Heath, T. Griessler Bulc, D. Istenič, G. Buttiglieri*, Microalgae-based removal of contaminants of emerging concern: mechanisms in *Chlorella vulgaris* and mixed algal-bacterial cultures, **Journal of Hazardous Materials** (2021) 418: 126284, 1-11. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126284.

CiteScore - Top 10% | Punkty MNiSW₂₀₂₄ 200 | Wartość IF₂₀₂₂ 13,6

b) University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Nowy Sad

W 2016 roku odbyłam **3-tygodniowy** (06.2016) **staż naukowy** w laboratorium prof. dr Valéria Guzsvány. Tematyka badawcza obejmowała zagadnienia związane z woltamperometrycznym oznaczaniem fungicydu (karbendazynu) w próbkach wody rzecznej z wykorzystaniem zmodyfikowanej nanocząstkami kompleksu inkluzyjnego (wielościennie nanorurki węglowe - β -cyklodekstryna) elektrody diamentowej domieszkowanej borem. Pobyt w jednostce zrealizowałam dzięki uzyskaniu **stypendium** (01.2016) w ramach **programu CEEPUS** (CIII-CZ-0212-09-1516-M-92063). Wymiernym **efektem aktywności naukowej** jest **publikacja**:

- M. Brycht*, O. Vajdle, K. Sipa, J. Robak, K. Rudnicki, **J. Piechocka**, A. Tasic, S. Skrzypek, V. Guzsvány*, β -cyclodextrin and multiwalled carbon nanotubes modified boron-doped diamond electrode for voltammetric assay of carbendazim and its corrosion inhibition behavior on stainless steel, **Ionics** (2018) 24: 923-934. DOI: 10.1007/s11581-017-2253-0.

Punkty MNiSW₂₀₂₄ 70 | Wartość IF₂₀₂₂ 2,8

c) Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Analitycznej, Gdańsk

W 2015 roku odbyłam **3-tygodniowy** (03.2015) **staż naukowy** w laboratorium prof. dr hab. inż. Żanety Polkowskiej. Celem wyjazdu było zapoznanie się z problematyką i wyzwaniem związanymi z oznaczaniem zanieczyszczeń w próbkach wód powierzchniowych pobranych na obszarach polarnych, oraz wykorzystywanymi narzędziami analitycznymi (chromatografia jonowa, analizator zawartości węgla organicznego).

d) Aflofarm Farmacja Polska Sp. z o. o, Pion Rozwoju, Dział Technologii, Laboratorium Analityczne, Pabianice

W 2014 roku odbyłam **4-tygodniową** (07 - 08.2014) **praktykę**, a następnie w latach 2017 - 2018 **4-miesięczny** (09.2017 - 01.2018) **staż zawodowy** na stanowisku młodszy technolog - analityk. Zakres powierzonych obowiązków obejmował prace rozwojowe w zakresie projektowania i tworzenia metod badania ulepszonych/nowych produktów, umożliwiającymi określenie ich podstawowych właściwości fizykochemicznych oraz składu jakościowego i ilościowego, przede wszystkim metodami chromatograficznymi.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzujących naukę

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

6.1.1. Wykaz prowadzonych i/lub koordynowanych przedmiotów

W latach 2014 - 2024 prowadziłam/prowadzę zajęcia dla studentów Wydziału Chemii oraz Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego zarówno w języku polskim, jak i języku angielskim. Działalność dydaktyczną realizowałam początkowo jako doktorant(ka), a następnie pracownik Uniwersytetu Łódzkiego. Od 01.04.2018 r. jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego w Katedrze Chemii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. W okresie zatrudnienia wypracowałam/wypracuję 100%, 100%, 105%, 104%, 117%, 107% i 100% godzin dydaktycznych w odniesieniu do pensum (230 godzin), odpowiednio w roku akademickim 2017/18, 2018/19, 2019/20, 2020/21, 2021/22, 2022/23 oraz 2023/24. Szczegółowy wykaz prowadzonych przeze mnie przedmiotów zamieściłam poniżej.

a) Studia podyplomowe, Chromatografia i techniki pokrewne we współczesnej analizie, Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

- Chromatografia cieczowa, laboratorium
- Chromatografia gazowa, laboratorium
- Zarządzanie jakością w laboratorium analitycznym, laboratorium

b) Studia I i II stopnia, Analityka Chemiczna, Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

- Chromatografia cieczowa w analizie chemicznej, konwersatorium i laboratorium
- Techniki elektromigracyjne w analizie chemicznej, laboratorium
- Techniki przygotowania próbek do analizy, laboratorium
- Praktyczne aspekty przygotowania próbek do analizy. Procedury przygotowania próbek roślinnych, laboratorium

- Praktyczne aspekty przygotowania próbek do analizy. Procedury przygotowania próbek zwierzęcych, laboratorium
 - Seminarium dyplomowe na kierunku eksperymentalnym, seminarium
 - Pracownia specjalizacyjna, blok zajęć: Zajęcia specjalistyczne, Specjalistyczne warsztaty chemiczne, Nowoczesne metody badań substancji chemicznych, laboratorium
 - Nowoczesne techniki analizy instrumentalnej, wykład i laboratorium
 - Projekt indywidualny I, laboratorium - **koordynowany przedmiot**
 - Projekt Indywidualny II, laboratorium - **koordynowany przedmiot**
 - Praktyczne aspekty przygotowania opracowań naukowych, konwersatorium - **koordynowany przedmiot**
- c) **Studia I stopnia, Ochrona Środowiska, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego**
- Wpływ czynników chemicznych na środowisko, laboratorium
 - Czynniki chemiczne w środowisku, laboratorium
 - Analiza chemiczna skażeń środowiska, laboratorium
- d) **Studia II stopnia, Chemia kosmetyków i farmaceutyków z elementami biznesu, Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego**
- Wybrane techniki separacyjne w analizie kosmetyków, laboratorium
 - Zastosowanie nowoczesnych technik analitycznych, laboratorium
- e) **Studia I i II stopnia, Chemistry course in English, Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego**
- Instrumental Analysis, wykład i konwersatorium
 - Modern Instrumental Methods of Analysis, wykład i konwersatorium
 - Selected separation techniques for analysis of cosmetics, wykład i laboratorium

6.1.2. Informacja o prowadzonych pracach dyplomowych

W latach 2014 - 2024 sprawowałam/sprawuję **opiekę nad 27 studentami** realizującymi prace dyplomowe w Katedrze Chemii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, w tym 17 pracami magisterskimi oraz 9 pracami licencjackimi. W tym czasie **kierowałam 4 pracami magisterskimi** oraz **9 pracami licencjackimi**, jak również **sprawowałam opiekę nad przebiegiem części eksperymentalnej 17 prac dyplomowych**. Ponadto zostałam wyznaczona na **promotora pomocniczego doktoranta** kształcącego się w Szkole Doktorskiej

Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego. Szczegółowy wykaz prowadzonych przeze mnie prac dyplomowych zamieściłam poniżej.

a) Wykaz prac licencjackich

(Rok złożenia egzaminu / Temat pracy dyplomowej / Dyplomant / Sprawowana funkcja)

- **2019**, Białko - błogosławieństwo czy przekleństwo dla analityka, D. Pietrzyk - **promotor**
- **2019**, N-homocysteinylowane białka - metody oznaczania, możliwości i ograniczenia, E. Kowalska - **promotor**
- **2020**, Metody oznaczania biologicznie istotnych związków siarki w wybranych płynach biologicznych, oparte o wykorzystanie technik separacji w fazie gazowej - badania literaturowe, I. Leśniewska - **promotor**
- **2020**, Niekonwencjonalne płyny biologiczne jako źródło informacji o stanie zdrowia człowieka, M. Gawęł - **promotor**
- **2021**, Tiazolidynowe pochodne cysteiny i endogennych aldehydów, U. Sudomir - **promotor**
- **2022**, Przegląd metod oznaczania kreatyniny w ślinie opartych na wykorzystaniu technik separacyjnych, A. Juszcak - **promotor**
- **2022**, Tiazynowe pochodne homocysteiny i wybranych endogennych aldehydów, K. Zamróż - **promotor**
- **2023**, Opracowanie metody oznaczania kwasu moczowego i kreatyniny techniką HILIC-ELS, S. Guzek - **promotor i opiekun**
- **W toku realizacji**, Przegląd wytycznych dotyczących walidacji chromatograficznych metod analitycznych, S. Yakubouska - **promotor** (planowany termin złożenia pracy 06.2024)

b) Wykaz prac magisterskich

(Rok złożenia egzaminu / Temat pracy dyplomowej / Dyplomant / Sprawowana funkcja)

- **2015**, Chromatograficzne badania albuminy osocza człowieka, M. Materkowska - **opiekun** - praca wyróżniona przez Fundację Uniwersytetu Łódzkiego Nagrodą za najlepszą pracę magisterską w roku akademickim 2014/2015
- **2016**, Oznaczanie aminokwasów tiolowych techniką chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych, Ł. Majchrzyk - **opiekun**
- **2016**, Oznaczanie kwasu 1,3-tiazyno-4-karboksyłowego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, A. Przygocka - **opiekun**
- **2017**, Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w próbkach biologicznych, K. Wiśniewska - **opiekun**

- **2019**, Chromatograficzne badania tiazynowej pochodnej fosforanu 5'-pirydoksalu i homocysteiny, J. Smuga - **opiekun**
- **2020**, Zastosowanie chromatografii cieczowej w analizie wybranych wód mineralnych, A. Ladowska - **opiekun**
- **2021**, Liza komórkowa jako etap przygotowania próbki do analizy. Stworzenie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów kierunków ścisłych i przyrodniczych, D. Pietrzyk - **promotor i opiekun**
- **2021**, Badanie właściwości detekcyjnych tiazynowej pochodnej fosforanu 5'-pirydoksalu i homocysteiny, D. Pietrzyk - **opiekun**
- **2022**, Optymalizacja procedury przygotowania próbek owoców jagodowych do oznaczania całkowitej zawartości wybranych aminokwasów tiolowych techniką LC-DAD, M. Gawęł - **opiekun**
- **2022**, Opracowanie metody oznaczania kwasu foliowego w preparatach farmaceutycznych techniką LC-DAD, N. Litwicka - **opiekun**
- **2022**, Oznaczanie wybranych kwasów karboksylowych w herbacie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej, J. Krawczykowska - **opiekun**
- **2022**, Chromatografia w praktyce szkolnej, N. Litwicka - **promotor**
- **2023**, Badanie wybranych właściwości fizykochemicznych kwasu 1,3-tiazyno-4-karboksylowego, B. Kukuła - **opiekun**
- **2023**, Optymalizacja procesu przygotowania próbek śliny do oznaczania całkowitej zawartości wybranych niskocząsteczkowych związków siarki, U. Sudomir - **opiekun**
- **2023**, Przygotowanie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych dotyczących sposobów odbiaćczania próbek biologicznych, A. Sarniak - **promotor i opiekun**
- **W toku realizacji**, Opracowanie metody przygotowania próbek osocza do oznaczania pochodnej cysteiny i witaminy B6 techniką LC-MS/MS - badania pilotażowe, M. Pietrzak - **promotor i opiekun** (planowany termin złożenia pracy 06.2024)
- **W toku realizacji**, Opracowanie chromatograficznej metody oznaczania kwasu azelainowego w kosmetykach, K. Witkowska - **opiekun** (planowany termin złożenia pracy 06.2024)

c) Wykaz prac doktorskich

(Rok złożenia egzaminu / Temat pracy dyplomowej / Dyplomant / Sprawowana funkcja)

- **W toku realizacji**, Zastosowanie chromatografii cieczowej sprzężonej z różnymi trybami detekcji do oznaczania wybranych małowcząsteczkowych związków siarki, M. Gawęł - **promotor pomocniczy** (planowany termin złożenia pracy 09.2026)

6.1.3. Informacja o sprawowanej opiece naukowej nad studentami

W latach 2014 - 2024 sprawowałam/sprawuję **opiekę nad 14 studentami prowadzącymi ponadprogramowe prace badawcze** w Katedrze Chemii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w ramach programów wymiany międzynarodowej (2 osoby, Erasmus+ Traineeship Program), praktyk nieobligatoryjnych - wolontariatu (3 osoby) oraz programu stażowego Students` Power (11 osób). Ponadto we wskazanym okresie sprawowałam/sprawuję opiekę nad studentami realizującymi Indywidualny Program Studiów (3 osoby) oraz projekty badawcze finansowane przez Uniwersytet Łódzki w ramach konkursu Studenckie Granty Badawcze (9 osób). Szczegółowy wykaz podjętych w tym zakresie aktywności zamieściłam poniżej.

a) Wykaz uczestników programów wymiany międzynarodowej

01.10 - 31.11.2018	A. Uysal, Erasmus+ Traineeship Program
05.06 - 31.07.2023	M. Fauvel, Erasmus+ Traineeship Program

b) Wykaz praktykantów oraz uczestników programu stażowego Students` Power

03.08 - 03.11.2020	D. Pietrzyk, Students` Power
23.11.2020 - 19.02.2021	M. Gaweł, Students` Power
05.07 - 24.09.2021	N. Litwicka, Students` Power
02.08 - 15.10.2021	N. Matwiej, Students` Power
02.11.2021 - 14.01.2022	U. Sudormir, Students` Power
11.04 - 23.06.2022	A. Sarniak, Students` Power
21.04 - 31.08.2022	J. Krawczykowska, nieobligatoryjna praktyka (wolontariat)
08.08 - 31.10.2022	B. Kukuła, Students` Power
12.12.2022 - 27.02.2023	S. Guzek, Students` Power
09.01 - 09.06.2023	U. Sudomir, nieobligatoryjna praktyka (wolontariat)
01.02 - 11.06.2023	B. Kukuła, nieobligatoryjna praktyka (wolontariat)
13.02 - 21.04.2023	E. Martirosyan, Students` Power
15.05 - 07.07.2023	K. Witkowska, Students` Power
15.05 - 03.07.2023	M. Pietrzak, Students` Power

c) Wykaz beneficjentów konkursu Studenckie Granty Badawcze

11.2020 - 09.2021	opiekun projektu: Na tropie nowych metabolitów homocysteiny i witaminy B6 - badania chromatograficzne (kierownik projektu D. Pietrzyk) - projekt zrealizowany
-------------------	---

- 11.2020 - 09.2021 **opiekun projektu:** Stworzenie chromatograficznych narzędzi do oceny walorów prozdrowotnych tzw. superowoców dostępnych na rynku polskim (kierownik projektu M. Gawęł) - **projekt zrealizowany**
- 11.2021 - 09.2022 **opiekun projektu:** Opracowanie elektroforetycznej metody oznaczania wybranych niskocząsteczkowych związków siarki w ślinie (kierownik projektu U. Sudomir) - **projekt zrealizowany**
- 11.2021 - 09.2022 **opiekun projektu:** HeadSpace i SolidPhaseMicroExtraction jako wiodące techniki przygotowania próbek do analizy. Stworzenie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych dedykowanych studentom kierunków ścisłych i przyrodniczych (kierownik projektu N. Litwicka) - **projekt zrealizowany**
- 11.2022 - 06.2023 **opiekun projektu:** Próby zwiększenia czułości stężeniowej elektroforetycznej metody oznaczania wybranych niskocząsteczkowych związków siarki w ślinie (kierownik projektu U. Sudomir) - **projekt zrealizowany**
- 11.2022 - 06.2023 **opiekun projektu:** Odbiałczanie próbek biologicznych jako niezbędny etap ich przygotowania do analizy. Stworzenie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów kierunków ścisłych i przyrodniczych (kierownik projektu A. Sarniak) - **projekt zrealizowany**
- 11.2022 - 06.2023 **opiekun projektu:** Badanie wybranych właściwości fizykochemicznych kwasu 1,3-tiazyno-4-karboksylowego (kierownik projektu B. Kukuła) - **projekt zrealizowany**
- 11.2022 - 06.2023 **opiekun projektu:** Opracowanie metody oznaczania kwasu moczowego i kreatyniny w moczu techniką HILIC-ELS (kierownik projektu S. Guzek) - **projekt zrealizowany**
- 11.2023 - obecnie **opiekun projektu:** Opracowanie chromatograficznej metody oznaczania wybranych kwasów rozjaśniająco - wybielających przebarwienia skórne w produktach kosmetycznych (kierownik projektu K. Witkowska) - **projekt w toku realizacji**

d) Wykaz studentów realizujących Indywidualny Program Studiów

- 2018 - 2020 D. Pietrzyk, student kierunku Analityka Chemiczna
- 2020 - 2022 M. Gawęł, student kierunku Analityka Chemiczna
- 2022 - 2024 K. Witkowska, student kierunku Chemia kosmetyków i farmaceutyków z elementami biznesu

6.1.4. Wykaz zrecenzowanych prac dyplomowych (z pominięciem wypromowanych prac)

- **2018**, Nowoczesne techniki analityczne w książkach Robina Cooka, M. Pawlak - praca licencjacka
- **2020**, Wykorzystanie chromatografii cieczowej w oznaczaniu bisfenoli, J. Stefaniak - praca licencjacka

6.2. Osiągnięcia organizacyjne (z pominięciem pozycji wymienionych w punkcie 6.3. oraz w załączniku 4 do przedmiotowego wniosku)

6.2.1. Wykaz zorganizowanych spotkań o charakterze naukowym

- 31.08 - 04.09.2014, Stambuł, EYCN Career Days: Creating a successful career w ramach 5th European Chemical Society Chemistry Congress - **członek zespołu organizującego wydarzenie satelitarne**
- 14 - 18.09.2014, Częstochowa, Forum Młodych w ramach 57. Zjazdu Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego - **członek zespołu organizującego wydarzenie satelitarne**
- 21 - 25.09.2015, Gdańsk, Forum Młodych w ramach 58. Ogólnopolskiego Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego - **członek zespołu organizującego wydarzenie satelitarne**
- 17 - 21.09.2018, Kraków, Forum Młodych w ramach 61 Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego - **członek zespołu organizującego wydarzenie satelitarne**

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

6.3.1. Informacja o zorganizowanych warsztatach o charakterze naukowym

W latach 2011 - 2017 uczestniczyłam jako **kierownik i główny wykonawca** w realizacji kilku **projektów popularyzujących wiedzę z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych** wśród dzieci i młodzieży szkolnej. Projekty były prowadzone przez Studenckie Koło Naukowe Chemików Uniwersytetu Łódzkiego we współpracy z Centrum Promocji Uniwersytetu Łódzkiego **w ramach akcji Uniwersytet Łódzki dla Dzieci**. Do moich obowiązków należało (i) opracowanie koncepcji (główny pomysłodawca); (ii) zdefiniowanie zakresu prac, zaprojektowanie eksperymentów oraz dobór narzędzi; (iii) przygotowanie środków dydaktycznych i współprowadzenie warsztatów; (iv) pozyskanie materiałów i środków finansowych; (v) zarządzanie projektem od strony merytorycznej i finansowej, w tym nadzór nad terminową realizacją działań; (vi) przygotowanie sprawozdań merytorycznych i finansowych. Podejmowane działania obejmowały organizację serii spotkań.

10.2011 - 06.2012 **warsztaty dla dzieci** Jak zostać chemikiem w kuchni?

10.2012 - 06.2013	warsztaty dla dzieci Zostań magikiem razem z chemikiem
10.2013 - 06.2014	warsztaty dla dzieci Młody Chemik
10.2014 - 06.2015	warsztaty dla dzieci Twój dom Twoim laboratorium
10.2015 - 06.2016	warsztaty dla dzieci Analityk w akcji, czyli kilka słów o rozdzielaniu mieszanin
10.2016 - 06.2017	warsztaty dla dzieci Szczypta Chemii

6.3.2. Informacja o udziale w wydarzeniach popularyzujących naukę

W latach 2008 - 2013 uczestniczyłam jako **główny wykonawca** w realizacji kilku projektów popularyzujących wiedzę z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych, które polegały na przeprowadzeniu **pokazów doświadczeń chemicznych**. Projekty były prowadzone przez Studenckie Koło Naukowe Chemików Uniwersytetu Łódzkiego. Do moich obowiązków należało (i) współtworzenie koncepcji; (ii) zdefiniowanie zakresu prac, zaprojektowanie eksperymentów oraz dobór narzędzi; (iii) przygotowanie środków dydaktycznych i współudział w przeprowadzeniu pokazów. Pokazy prezentowane były wielokrotnie w ramach działań promocyjnych Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego (Akademia Ciekawej Chemii, Uniwersytet zawsze otwarty), oraz licznych festiwali i akcji dobroczynnych. Wykaz obejmujący, moim zdaniem, najciekawsze/najistotniejsze wydarzenia zamieściłam poniżej.

- Festiwal Kół Naukowych Uniwersytetu Łódzkiego (20.11.2008, Łódź)
- Salon Maturzystów, edycja 2009 (16.09.2009, Łódź)
- Wielka Orkiestra Świątecznej Pomocy, 4-krotnie (11.01.2009, 10.01.2010, 09.01.2011, 08.01.2012, Łódź)
- Festiwal Nauki, Kultury i Sztuki, edycje IX - XII 4-krotnie (25 - 26.04.2009, 24 - 25.04.2010, 16 - 17.04.2011, 21 - 22.04.2012, Łódź)
- Dzień Dziecka z Radiem Łódź (01.06.2011, Łódź)
- Piknik Wiedzy i Nauki Uniwersytetu Łódzkiego, edycje II - III, 2-krotnie (03.06.2011, 01.06.2012, Łódź)
- VI Międzynarodowy Festiwal Designu - Łódź Design Festival 2012 Awareness (18 - 28.10.2012, Łódź) (stoisko poświęcone tematyce zjawiska luminescencji oraz jego powiązania ze sztuką, realizacja we współpracy z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi)

6.3.3. Wykaz przeprowadzonych wykładów popularnonaukowych

- Nie taka chemia straszna jak ją malują, wykład dla uczestników Akademii Profesora Einsteina w Centrum Nauki Eksperymentarium (12.03.2011, Łódź)
- Magia chemii, wykład dla uczestników Magic Festival 2015 (23 - 24.05.2015, Łódź)

7. Inne, nieokreślone w punkcie 2 - 6, ważne informacje dotyczące kariery zawodowej (z pominięciem pozycji wymienionych w załączniku 4 do przedmiotowego wniosku)

7.1. Informacja o udokumentowanej współpracy z innymi ośrodkami naukowymi

W 2013 r. dołączyłam do zespołu Katedry Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego i rozpoczęłam współpracę ze specjalistami z ośrodków krajowych oraz zagranicznych. Szczegółowy wykaz podjętych w tym zakresie aktywności zamieściłam poniżej.

7.1.1. Wykaz zagranicznych ośrodków naukowych

- **Prof. dr hab. H. Jakubowski**, Rutgers - New Jersey Medical School, Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Newark, New Jersey
- **Prof. dr V. Guzsvány**, University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Nowy Sad
- **Dr F. Prosenc**, University of Ljubljana, Faculty of Health Sciences, Lublana

7.1.2. Wykaz krajowych ośrodków naukowych

- **Prof. dr hab. n. med. A. Undas**, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Collegium Medicum, Instytut Kardiologii, Zakład Kardiochirurgii, Anestezjologii i Kardiologii Doświadczalnej, Kraków
- **Dr hab. J. Kołodziejczyk-Czepas**, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii Ogólnej, Łódź
- **Prof. dr hab. inż. M. Kozanecki**, Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny, Katedra Fizyki Molekularnej, Łódź
- **Dr hab. A. Torzewska**, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biologii Bakterii, Łódź
- **Dr hab. n. med. J. Natorska**, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Collegium Medicum, Instytut Kardiologii, Zakład Chorób Zatorowo-Zakrzepowych, Kraków

7.2. Informacja o uzyskanych nagrodach, stypendiach i wyróżnieniach

7.2.1. Wykaz otrzymanych nagród oraz wyróżnień za działalność naukową

- List gratulacyjny za wyróżniające się wyniki w nauce od Rektora Uniwersytetu Łódzkiego, 4-krotnie (10.11.2010, 07.11.2011, 29.10.2012, 10.10.2013)
- Medal za chlubne studia przyznany przez Senat Uniwersytetu Łódzkiego (18.11.2013)
- Nagroda II stopnia w konkursie na najlepszy plakat prezentowany podczas 7 Konferencji Chromatograficznej (13.05.2016)

- Nagroda Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk w konkursie na najlepsze prace doktorskie edycja 2019, Nagroda Perlan Technologies za najlepszą pracę związaną z rozwojem technik rozdzielania (22.03.2019)
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego zespołowa I stopnia za osiągnięcia naukowo - badawcze, 3-krotnie (14.10.2019, 14.10.2021, 14.10.2023)
- Naukowa Nagroda Dziekana za najlepszą publikację naukową Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2020 r. i 2022 r., kategoria prace oryginalne, nagroda II stopnia za pracę w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences DOI: 10.3390/ijms21239252 (03.2021) oraz nagroda I stopnia za pracę w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences DOI: 10.3390/ijms23020598 (03.2023)
- List gratulacyjny od Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za istotny wkład w ewaluację jakości działalności naukowej w Uniwersytecie Łódzkim w latach 2017 - 2021 w ramach dyscypliny nauki chemiczne (15.12.2022)
- List gratulacyjny za istotny wkład w opis wpływu w obszarze III kryterium podczas ewaluacji jakości działalności naukowej w Uniwersytecie Łódzkim w latach 2017 - 2021, finansowanej z programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w ramach dyscypliny nauki chemiczne (10.05.2023)
- Naukowa Nagroda Dziekana za najlepszą publikację naukową Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2023 r., kategoria prace przeglądowe, nagroda II stopnia za pracę w czasopiśmie TrAC - Trends in Analytical Chemistry DOI: 10.1016/j.trac.2022.116906 (03.2024)

7.2.2. Wykaz otrzymanych nagród oraz wyróżnień za działalność dydaktyczną

- Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego zespołowa I stopnia za osiągnięcia dydaktyczne (14.10.2022)

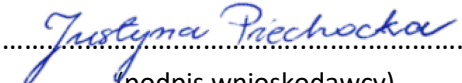
7.2.3. Wykaz otrzymanych nagród oraz wyróżnień za działalność organizacyjną

- Wyróżnienie za działalność doktorancką na rzecz i dla dobra Uniwersytetu Łódzkiego (22.05.2017)
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego indywidualna II stopnia za osiągnięcia organizacyjne, 2-krotnie (14.10.2021, 14.10.2023)

7.2.4. Wykaz otrzymanych stypendiów za działalność naukową i organizacyjną

- Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcia w nauce, 2-krotnie (17.02.2011, 09.12.2011)
- Stypendium Rektora Uniwersytetu Łódzkiego dla najlepszych studentów 2-krotnie (25.11.2011, 23.10.2012)
- Stypendium Marszałka Województwa Łódzkiego w kategorii "student" (17.06.2013)

- Stypendium naukowe Miasta Łodzi w roku akademickim 2013/2014 (15.11.2013)
- Stypendium w ramach projektu Doktoranci - Regionalna Inwestycja w Młodych naukowców nauk przyrodniczych i technologicznych. Akronim DRIM BIO (03.03.2014)
- Stypendium Naukowe Marszałka Województwa Łódzkiego dla wybitnych młodych naukowców (08.06.2015)
- Stypendium Rektora Uniwersytetu Łódzkiego dla najlepszych doktorantów, 2-krotnie (06.11.2015, 17.11.2016)
- Zwiększenie stypendium doktoranckiego z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych, 4-krotnie (17.12.2013, 09.01.2015, 16.12.2015, 09.01.2017)
- Stypendium CEEPUS (CIII-CZ-0212-09-1516-M-92063) Education of Modern Analytical and Bioanalytical Methods (16.01.2016)
- Stypendium CEEPUS (CIII-SI-0905-03-1617-M-98347) Training and research in environmental chemistry and toxicology, 2-krotnie (27.07.2016, 04.03.2019)
- Stypendium Santander Universidades za pracę na rzecz społeczności uniwersyteckiej, promocję nauki, współpracę z podmiotami zewnętrznymi oraz dobre wyniki w nauce (27.06.2017)


.....
(podpis wnioskodawcy)