AUTOREFERAT

(*Załącznik 2a*)

dr Grażyna Chwatko

Katedra Chemii Środowiska

Wydział Chemii

Uniwersytet Łódzki

2014

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Grażyna Chwatko

Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- Magister chemii, Uniwersytet Łódzki, 1994 rok, po przedstawieniu pracy na temat: „Analiza kaptoprylu w próbkach biologicznych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej po ekstrakcji na fazie stałej".
- Doktor nauk chemicznych, Uniwersytet Łódzki, 2002 rok, po przedstawieniu pracy na temat: „Wyznaczanie statusu *redox* tioli w osoczu krwi ludzkiej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej".

Informacje o przebiegu pracy zawodowej:

- 1994-1996, nauczyciel w Liceum Ogólnokształcącym w Mońkach,
- 1996-2002, asystent w Uniwersytecie Łódzkim, na Wydziale Chemii w Katedrze Technologii Chemicznej i Ochrony Środowiska, w Zakładzie Chemii Środowiska,
- 2002-obecnie, adiunkt w Uniwersytecie Łódzkim, na Wydziale Chemii, w Katedrze Chemii Środowiska.

Dane scjentometryczne

- Liczba publikacji przed osiągnięciem stopnia doktora – 9
- Liczba publikacji po osiągnięciu stopnia doktora – 33, w tym:
  - prace oryginalne z listy Journal Citation Reports (JCR) – 26
  - prace oryginalne z poza listy JCR – 4
  - prace przeglądowe z listy JCR – 2
  - prace przeglądowe spoza listy JCR – 1
- Liczba publikacji wchodzących w skład cyklu – 7
- Sumaryczny współczynnik wpływu (*Impact Factor*, IF) dla wszystkich publikacji:
  - zgodnie z rokiem 2012 – 107,048
  - zgodnie z rokiem publikacji – 93,296
- Sumaryczny IF dla publikacji w cyklu:
  - zgodnie z rokiem 2012 – 19,737
  - zgodnie z rokiem publikacji – 19,646
- Liczba cytowań wszystkich publikacji wg bazy Web of Science:
  - całkowita – 667 (Indeks Hirscha – 14)
  - bez autocytowań – 636 (Indeks Hirscha – 14)

2. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Analiza próbek biologicznych na zawartość metabolicznie spokrewnionych związków siarki

2.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Prace zostały przedstawione w kolejności ich omawiania w tekście autoreferatu. Współczynnik wpływu (IF) podany został wg roku opublikowania poszczególnych prac bądź z roku 2012 dla prac z lat 2013 i 2014. Podana liczba cytowań prac pochodzi z bazy Web of Science. Gwiazdka przy nazwisku oznacza, że autorka osiągnięcia jest autorem do korespondencji.

H1 G. Chwatko*, V.M. Darras, E. Bald, A method for the determination of total and reduced methimazole in various biological samples. Food Addit. Contam. A, DOI: 10.1080/19440049.2014.905878

IF(2012) 2,22, liczba cytowań 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu wszystkich eksperymentów, opisaniu i interpretacji uzyskanych wyników, udziale w dyskusji ze współautorami nad wynikami badań, redagowaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

H2 G. Chwatko, E. Bald, Determination of thiosulfate in human urine by high performance liquid chromatography, Talanta, 79 (2009) 229-234.

IF 3,498, liczba cytowań 7

Mój wkład polegał na zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, opisaniu wyników, dyskusji ze współautorem nad interpretacją wyników i współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H3 K. Kuśmerek, G. Chwatko, E. Bald, Redox status of main urinary sulfur amino acids evaluation by liquid chromatography, Chromatographia, 68 (2008) S91-S95.

IF 1,312, liczba cytowań 6

Mój wkład polegał na zaplanowaniu badań dotyczących oznaczania aminokwasów tiolowych w moczu, opisaniu i interpretacji wyników oraz współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

H4 G. Chwatko*, Spectrophotometric method for the determination of total thiols in human urine. Ann. Clin. Lab. Sci. 43 (2013) 424-428.

IF(2012) 0,879, liczba cytowań 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu wszystkich eksperymentów, interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy wynosi 100%.

H5 G. Chwatko*, P. Kubalczyk, E. Bald, Determination of lipoic acid in the form of 2-S-pyridinium derivative by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Curr. Anal. Chem. DOI: 10.2174/157341101099913121910134O.

IF(2012) 1,558, liczba cytowań 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, wykonaniu większości eksperymentów, opisaniu i interpretacji wyników, udziale w dyskusji ze współautorami nad wynikami badań, redagowaniu manuskryptu i korespondencji z edytorem czasopisma. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

H6 G. Chwatko, H. Jakubowski, The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma, Anal. Biochem. 337 (2005) 271-277.

IF 2,996, liczba cytowań 66

Mój wkład polegał na przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, wykonaniu obliczeń, dyskusji ze współautorem nad interpretacją wyników. Mój udział procentowy szacuję na 33%.

H7 G. Chwatko, H. Jakubowski, Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans, Clin. Chem. 51 (2005) 408-415.

IF 7,149, liczba cytowań 46

Mój wkład polegał na przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, wykonaniu obliczeń, dyskusji ze współautorem nad interpretacją wyników. Mój udział procentowy szacuję na 33%.

2.3. Omówienie celu naukowego pracy i osiągniętych wyników

Najważniejsze stosowane skróty

BCPB – bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy

CMQT – tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy

CGSH – cysteinyloglicyna

CSH – cysteina

DHLA – kwas dihydroliponowy

Hcy – homocysteina

HTL – tiolakton homocysteiny

LA – kwas liponowy

MMI – metimazol

OPA – aldehyd *o*-ftalowy

TCEP – tris(2-karboksyetylo)fosfina

Wstęp

Związki zawierające siarkę są przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków zajmujących się badaniami biomedycznymi z uwagi na ich istotną rolę w różnorodnych fizjologicznych i patologicznych przemianach [1, 2].

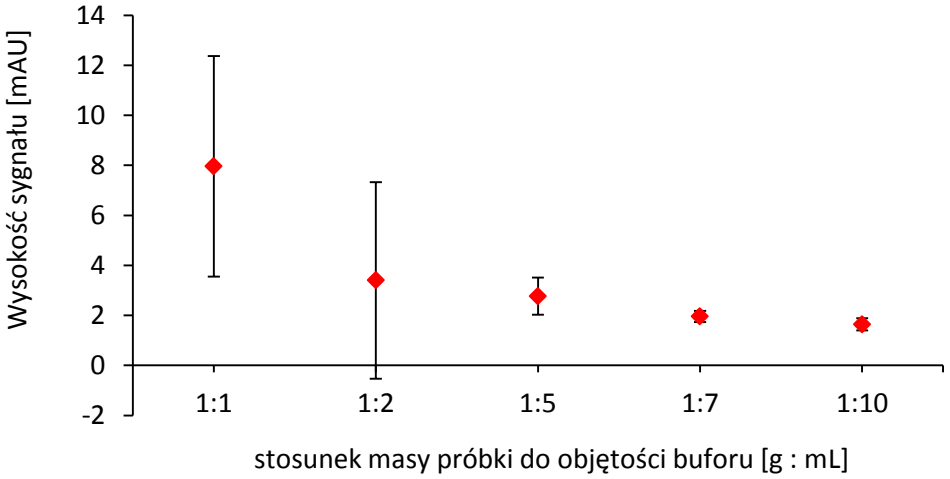
Próbki biologiczne należą do najbardziej złożonych, gdyż ich matryce składają się z dużej liczby składników o różnym stężeniu. Analiza próbek biologicznych jest niełatwym zadaniem, gdyż charakteryzują się one skomplikowaną matrycą oraz często małą trwałością. W próbkach tych obiektowi analitycznemu o stężeniu śladowym lub ultraśladowym towarzyszą często substancje o podobnych właściwościach fizykochemicznych i dużym stężeniu, ponadto anality mogą tworzyć koniugaty z białkami bądź innymi związkami obecnymi w próbkach. Uzyskanie wiarygodnego wyniku analizy chemicznej, złożonych próbek biologicznych, wymaga od analityka poświęcenia uwagi wszystkim etapom składającym się na proces analityczny. Do etapów tych zalicza się pobieranie i przechowywanie próbki, przygotowanie jej do analizy, walidacja metody, pomiar oraz obróbka danych. Najkrótszym etapem procesu analitycznego jest pomiar, gdyż szacuje się, że stanowi on około 6% całkowitego czasu analizy, podczas gdy obróbka danych pochłania aż 27% czasu [3]. Prawidłowe pobranie i przygotowanie próbek okazuje się jednym z trudniejszych i czasochłonnych etapów, gdyż zajmuje około 67% całkowitego czasu analizy. Należy również nadmienić, że etap ten stanowi największe źródło

całkowitego błędu analizy i szacuje się, że wynosi statystycznie 60%. Pozostałe 40% całkowitego błędu analizy przypada na pomiar wraz z walidacją metody i obróbkę danych, odpowiednio w ilości 30% i 10%.

Głównym celem prowadzonych przeze mnie badań było dostarczenie narzędzi badawczych, które w dokładny i precyzyjny sposób pozwolą analizować zależności pomiędzy występowaniem podwyższonego stężenia związków zawierających siarkę i procesem starzenia, obecnością chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych. Narzędzia te dodatkowo pozwolą śledzić w organizmach żywych przemiany jakim ulegają wybrane leki czy suplementy diety, to jest transport międzypokoleniowy i farmakokinetyka.

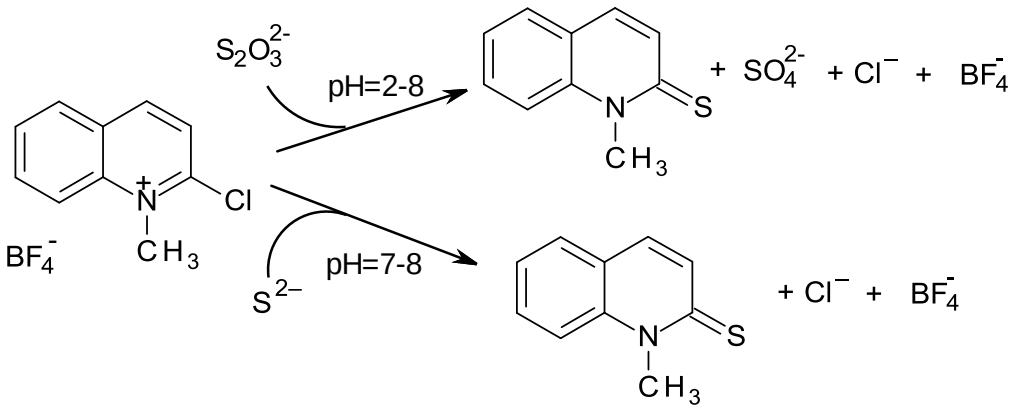
Przygotowanie próbki do analizy

Stosowane do analizy próbek biologicznych techniki nie są na tyle uniwersale, by pozwoliły na oznaczanie zawartości śladowych składników próbki bez jej wstępnego przygotowania. Nie ma jednej, uniwersalnej metody przygotowania próbek, która byłaby odpowiednia dla wszystkich analizowanych materiałów. Sposób przygotowania próbki zależy przede wszystkim od stanu jej skupienia. Ogólnie wiadomo, że utrudnienia w analizie próbek biologicznych rosną wraz ze zmniejszaniem się stopnia płynności analizowanego materiału. W związku z tym, najłatwiej analizuje się próbki płynne, takie jak mocz i osocze, a więcej trudności sprawiają tkanki stałe np. mózg, wątroba czy tarczyca. Tkanki stałe przed analizą technikami separacyjnymi w fazie ciekłej muszą być poddawane homogenizacji, która prowadzi do rozdrobnienia i ujednorodnienia próbki. Podczas tego procesu należało zwrócić uwagę na fakt, że wraz z rozcieńczeniem próbki w trakcie homogenizacji maleje całkowity błąd metody (Rys. 1), ponieważ w mniej gęstych roztworach lepiej zachodzą reakcje chemiczne, ponadto podczas pomiaru objętości popełnia się mniejszy błąd. Z drugiej strony wraz ze wzrastającym rozcieńczeniem uzyskujemy gorszą granicę wykrywalności i oznaczalności metody. W swoich badaniach optymalizowałam parametry homogenizacji tkanek tarczycy, wątroby i mózgu kur, kurzych embrionów oraz białka i żółtka jaja kurzego **[H1]**.



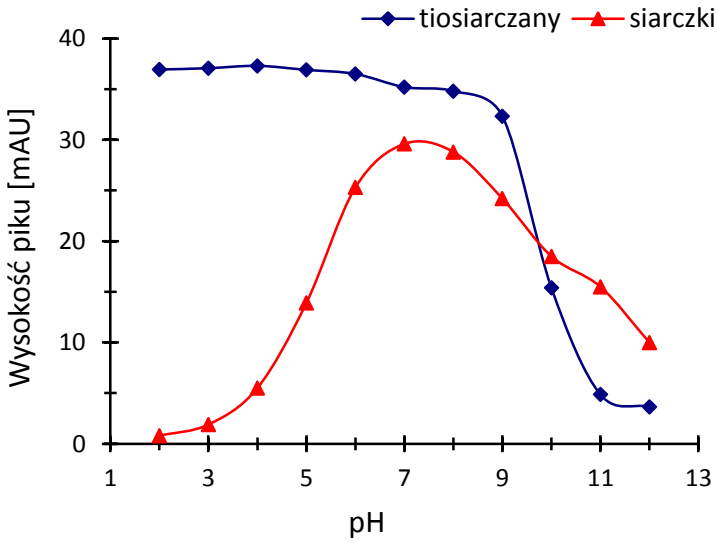
Rys. 1. Wpływ rozcieńczenia próbki na dokładność oznaczeń. (G. Chwatko, dane niepublikowane)

Biologicznie ważne związki siarki, takie jak aminokwasy siarkowe i tiosiarczany nie posiadają strukturalnych właściwości pozwalających na ich bezpośrednie wykrywanie przy pomocy detektora spektrofotometrycznego i fluorymetrycznego. Tiolakton homocysteiny (HTL) absorbuje promieniowanie UV i posiada maksimum absorpcji przy 240 nm, jednak jego molowy współczynnik absorpcji wynosi 3500 $dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ [4]. Metody analityczne opierające się na pomiarze absorbancji przy 240 nm mają wysoką granicę wykrywalności uniemożliwiającą skuteczne oznaczanie zawartości tiolaktonu w próbkach osocza [4]. W związku z powyższym na etapie przygotowania próbki do oznaczania wspomnianych związków zawierających siarkę wykorzystałam reakcję derywatyzacji. Do tego celu użyłam następujące odczynniki derywatyzujące: tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy (CMQT) [**H1-H3**], bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy (BCPB) [**H4, H5**] i aldehyd *o*-ftalowy (OPA) [**H6, H7**]. CMQT jest powszechnie znanym odczynnikiem stosowanym do derywatyzacji związków zawierających funkcję –SH [5, 6], który w wyniku reakcji daje stabilną *S*-chinoliniową pochodną o wysokim molowym współczynniku absorpcji wynoszącym około 20000 $dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ [7]. Prowadzone przeze mnie badania, z wykorzystaniem CMQT jako odczynnika derywatyzującego, wykazały że reaguje on z siarką sulfanową zawartą w anionie tiosiarczanowym. W związku z tym, jako pierwsza, zastosowałam CMQT do oznaczania tiosiarczanów w moczu [**H2**]. Wykazałam, że reakcja tiosiarczanów z CMQT zachodzi w stosunku stechiometrycznym 1:1, w pH 7, w czasie 2 minut, przy dziesięciokrotnym nadmiarze CMQT, z utworzeniem stabilnej tioeterowej pochodnej, 1-metylo-2-tiochinolonu, zgodnie ze schematem reakcji zamieszczonym na rysunku 2 [**H2**].



Rys. 2. Schemat reakcji derywatyzacji tiosiarczanów i siarczków z użyciem CMQT.

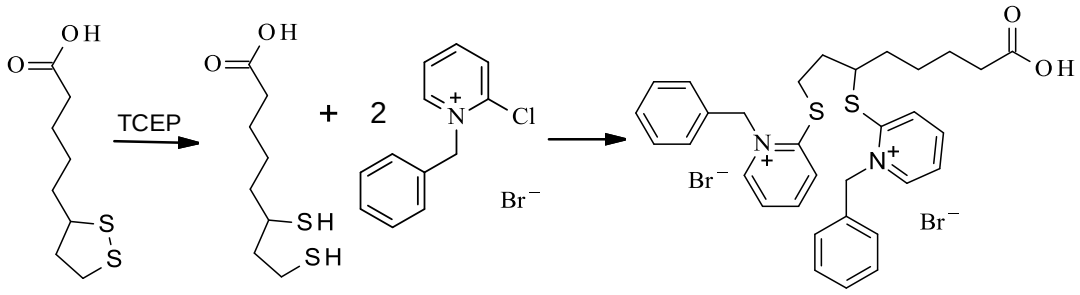
Jak można zauważyć zarówno tiosiarczany jak i siarczki w reakcji z CMQT dają tą samą pochodną, 1-metylo-2-tiochinolon, zatem istotnym jest dobór warunków reakcji pozwalający na różnicowanie tych związków w przypadku ich równoczesnego występowania w badanych próbkach. Dowiodłam, że pH środowiska reakcji jest czynnikiem różnicującym reaktywność siarczków i tiosiarczanów w stosunku do CMQT (Rys. 3). Prowadząc reakcję derywatyzacji równolegle w pH 2 (reagują tylko tiosiarczany) oraz pH 7 (reagują tiosiarczany i siarczki) i oznaczając ilość powstałego 1-metylo-2-tiochinolonu w tych próbkach można z różnicy wyliczyć ilość siarczków.



Rys. 3. Wpływ pH na wydajność reakcji derywatyzacji tiosiarczanów i siarczków. Warunki reakcji: dziesięciokrotny nadmiar CMQT, czas reakcji 5 min, stężenie analitów 10 nmol/mL. Rysunek 4 w pracy **H2.**

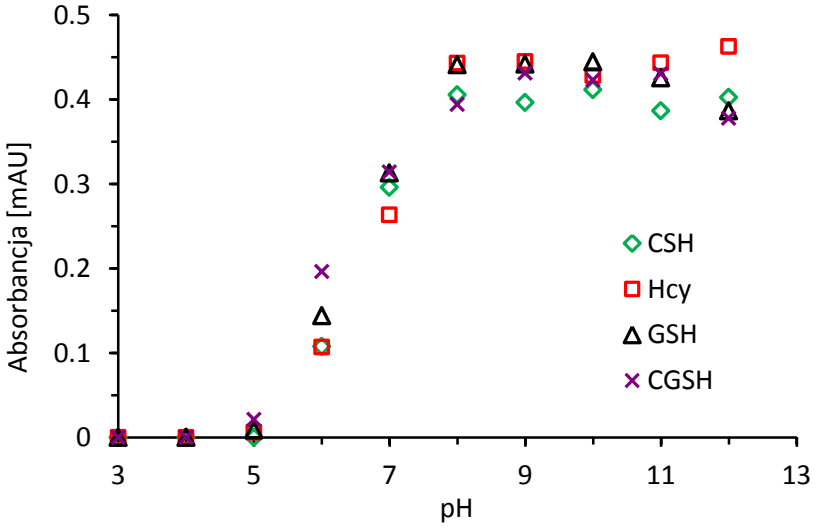
BCPB wykorzystałam do oznaczania sumy tioli całkowitych [**H4**] i kwasu liponowego (LA) [**H5**] w moczu. W swoich badaniach opracowałam procedury derywatyzacji kwasu dihydroliponowego (DHLA) uzyskanego po redukcji LA za pomocą

chlorowodorku tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP). Stosując metodę zmian ciągłych wyznaczyłam stechiometrię reakcji. DHLA reaguje z BCPB w stosunku molowym 1:2 z utworzeniem stabilnej 2-*S*-pirydyniowej pochodnej. Reakcja ta przebiega w wyniku nukleofilowego ataku grup tiolowych DHLA na atom chloru w cząsteczce BCPB, zgodnie z poniższym równaniem reakcji [**H5**].



Rys. 4. Schemat reakcji redukcji LA do DHLA i derywatyzacji DHLA z użyciem BCPB.

Ustaliłam, że optymalnym środowiskiem reakcji jest bufor o pH 9. W środowisku tym reakcja pomiędzy DHLA i BCPB przebiega w ciągu 5 minut, w temperaturze pokojowej, przy 5-krotnym nadmiarze odczynnika derywatyzującego. BCPB reaguje również z innymi związkami zawierającymi grupę –SH w zakresie pH 8-12 (Rys. 5) [**H4].**

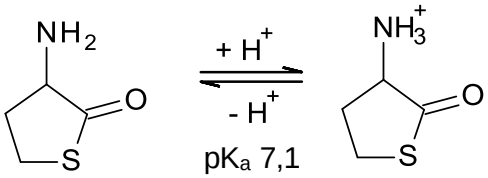


Rys. 5. Wpływ pH na wydajność reakcji derywatyzacji aminokwasów siarkowych. Warunki reakcji: 10-krotny nadmiar odczynnika derywatyzującego – BCPB, czas reakcji 5 min, stężenie każdego z analitów 50 nmol/mL. CSH – cysteina, Hcy – homocysteina, GSH – glutation, CGSH – cysteinyloglicyna. Rysunek 4 w pracy **H4**.

Istotną zaletą stosowania BCPB jest występowanie dużego, wynoszącego około 45 nm, batochromowego przesunięcia maksimum absorpcji dla powstałych *S*-pirydyniowych pochodnych w stosunku do odczynnika. Występowanie tego przesunięcia pozwoliło mi zastosować tę reakcję do oznaczania sumy tioli całkowitych występujących w moczu, przy

wykorzystaniu spektrofotometrii w zakresie UV, przy jednoczesnym uproszczeniu procedury przygotowania próbki do reakcji redukcji i derywatyzacji [**H4**].

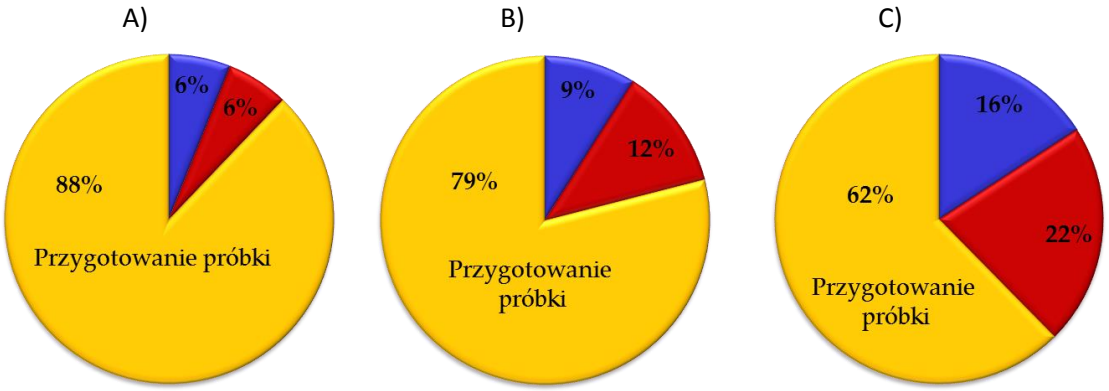
Pokolumnowa reakcja derywatyzacji homocysteiny (Hcy) i tiolaktonu homocysteiny (HTL) z wykorzystaniem OPA została opisana w literaturze [8] i zastosowana do oznaczania ich zawartości w medium pochodzącym z hodowli komórek Hep G2. Metoda ta ze względu na granicę wykrywalności, równą 10 nmol/L, nie jest użyteczna do bezpośredniego oznaczania HTL w osoczu, gdyż jego średnie stężenie jest mniejsze i wynosi 1,9 ± 3,9 i 3,3 ± 7,3 nmol/L odpowiednio u kobiet i mężczyzn [**H6**]. W związku z tym w trakcie opracowywania metody oznaczania HTL na etapie przygotowania próbek osocza i moczu wykorzystałam odpowiednio techniki ekstrakcji, ciecz-ciecz [**H6**] i ciecz-ciało stałe [**H7**]. Wykorzystanie selektywnej ekstrakcji HTL z próbek biologicznych było możliwe ze względu na jego właściwości. W przeciwieństwie do większości aminokwasów, których grupa α-aminowa posiada pK_a około 9,5, pK_a grupy α-aminowej obecnej w cząsteczce HTL jest równe 7,1 [9]. Względnie niska wartość pK_a i brak grupy karboksylowej w HTL powoduje, że w pH około 8 cząsteczka tiolaktonu pozbawiona jest ładunku, a w środowisku lekko kwaśnym naładowana dodatnio (Rys. 6). Zmiany pH w zakresie od 6 do 8 zasadniczo nie wpływają na właściwości innych, obecnych w próbce aminokwasów, z wyjątkiem histydyny.



Rys. 6. Zmiana ładunku na grupie aminowej HTL w zależności od pH środowiska.

Próbki moczu i osocza po filtracji na membranach typu „*cut-off*", zatrzymujących cząsteczki większe od 10kD, alkalizowałam do pH ok. 8 i ekstrahowałam odpowiednio na węglu aktywnym bądź za pomocą mieszaniny składającej się z chloroformu i metanolu. W obu przypadkach do re-ekstrakcji HTL używałam roztworu kwasu solnego. Wydajność procesu ekstrakcji za pomocą mieszaniny chloroform/metanol wynosiła 61,8 ± 7,7% (n = 30) [**H6**]. Badania wydajności prowadziłam dla próbek osocza zaszczepionych HTL w zakresie stężeń od 1 do 20 nmol/L, bądź wykorzystując HTL zawierający radioaktywny atom siarki ^{35}S. Ekstrakcja mieszaniną chloroform/metanol okazała się bardziej selektywna niż ekstrakcja na węglu aktywnym. Zastosowanie ekstrakcji pozwoliło mi obniżyć granicę detekcji metody oznaczania HTL w osoczu do wartości 0,36 nmol/L.

W opracowanych metodach etap przygotowania próbki do końcowej analizy obejmuje różne procesy, takie jak: homogenizacja, reakcja derywatyzacji, reakcja redukcji, ekstrakcja czy deproteinizacja. W zależności od metody etap przygotowania próbki zajmuje od 62 do 88% całkowitego czasu analizy (Rys. 7).



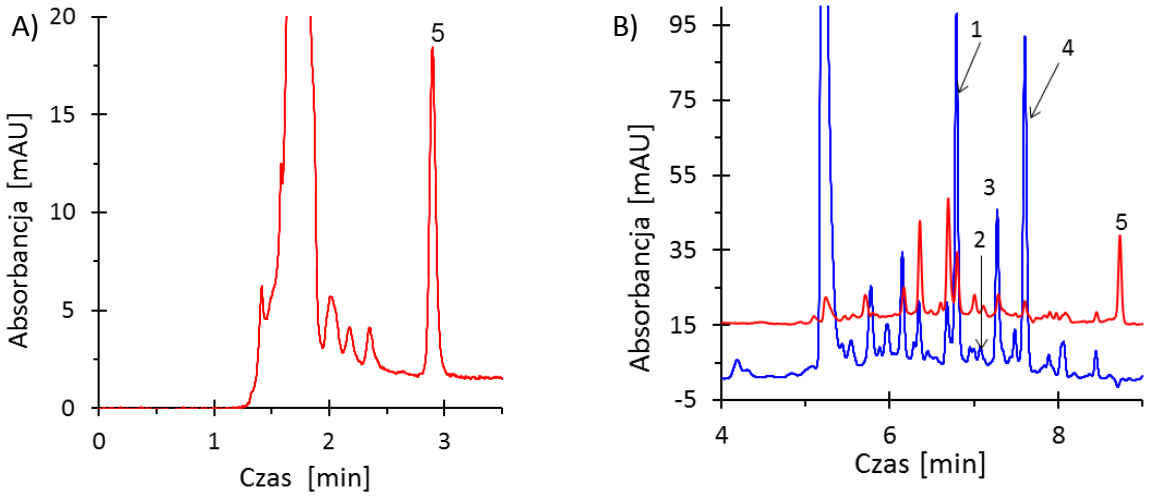
Rys. 7. Udział przygotowania próbki (kolor żółty), pomiaru i kalibracji (kolor niebieski) oraz obróbki danych (kolor czerwony) w całkowitym czasie analizy. A) Metoda oznaczania HTL w moczu i osoczu [**H6**, **H7**], B) metoda oznaczania MMI w homogenatach tkanek [**H1**], C) metoda oznaczania tiosiarczanów w moczu [**H2**].

Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego

Podczas prowadzonych badań opracowałam metody umożliwiające oznaczanie stężenia tiosiarczanów [**H2**], aminokwasów siarkowych [**H2, H3**], tiolaktonu homocysteiny [**H6**, **H7**], kwasu liponowego [**H5**] i metimazolu [**H1**] w próbkach biologicznych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

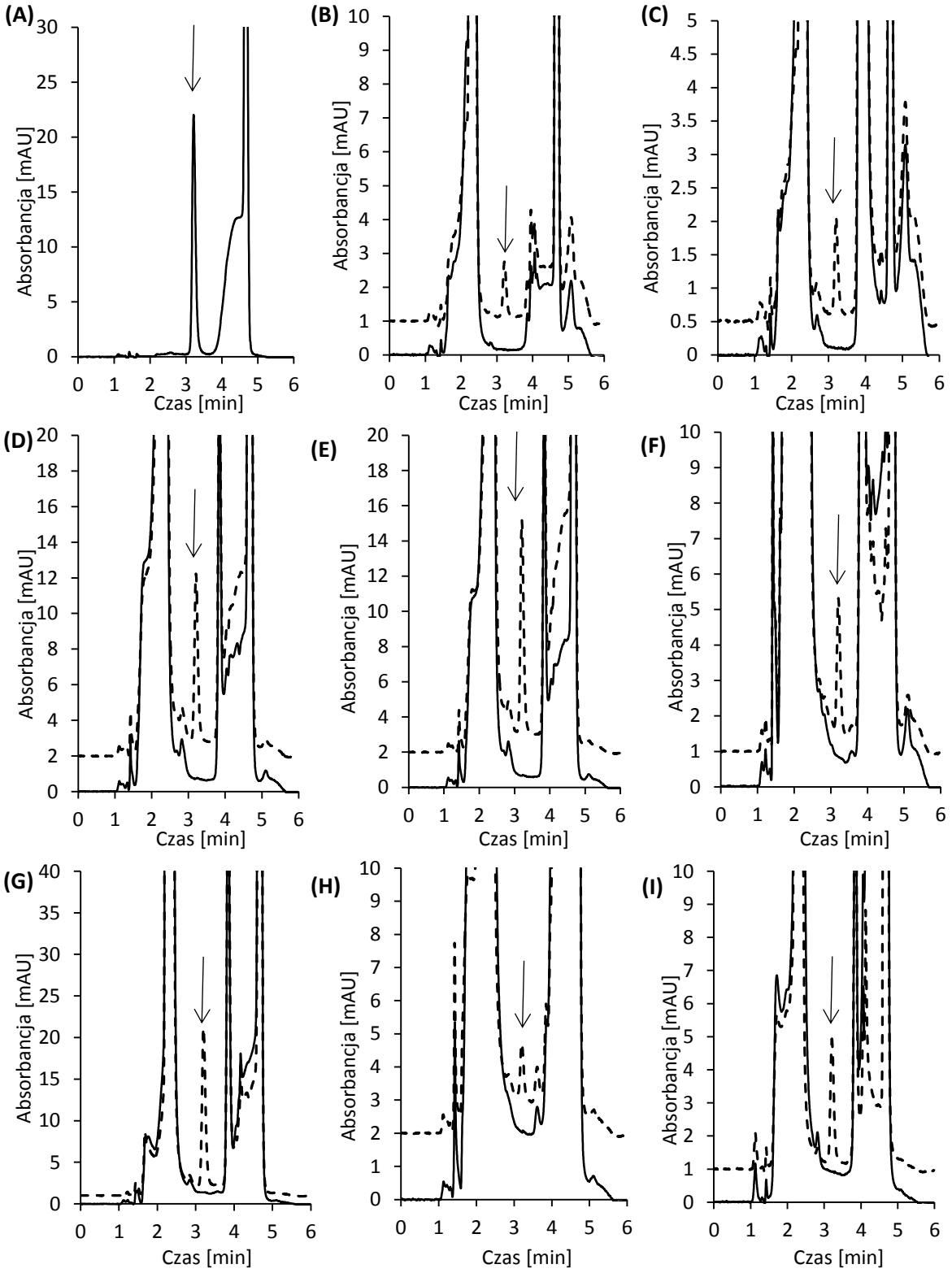
Jak wspomniałam wcześniej tiosiarczany w reakcji z CMQT tworzą niepolarną pochodną – 1-metylo-2-tiochinolon, który oznaczałam techniką HPLC w odwróconym układzie faz [**H2**]. Cząsteczka 1-metylo-2-tiochinolonu efektywnie ulega retencji na niepolarnej kolumnie (C-18), a rozdzielenie wszystkich składników zawartych w próbkach moczu, przy zastosowaniu elucji izokratycznej zajmuje 3,5 minuty (Rys. 8A). W przeciwieństwie do 1-metylo-2-tiochinolonu, 2-*S*-chinoliniowe pochodne tioli posiadają dodatni ładunek netto, w związku z tym istnieje potrzeba dodania do fazy ruchomej odczynnika par jonowych, rolę tą spełnia kwas trichlorooctowy. Ponieważ rozdzielane pochodne znacznie różnią się hydrofobowością koniecznym było zastosowanie elucji gradientowej umożliwiającej wymycie z kolumny bardziej lipofilowych analitów (Rys. 8B). Całkowity czas analizy chromatograficznej próbek moczu, w których oznaczałam jednocześnie tiosiarczany, cysteinę (CSH) i cysteinyloglicynę (CGSH) wynosił 11 minut. 1-metylo-2-tiochinolon jest wymywany z kolumny w formie

symetrycznego piku po czasie 2,9 min (elucja izokratyczna) i 8,7 min (elucja gradientowa) bez zakłóceń ze strony innych składników obecnych w próbkach moczu. Z uwagi na występowanie różnic w maksimach absorpcji 1-metylo-2-tiochinolonu i 2-*S*-chinoliniowych pochodnych tioli, chromatogramy rejestrowałam przy dwóch różnych długościach fali, tj. 375 i 355 nm odpowiednio dla pochodnych tiosiarczanów i aminokwasów siarkowych [**H2**].

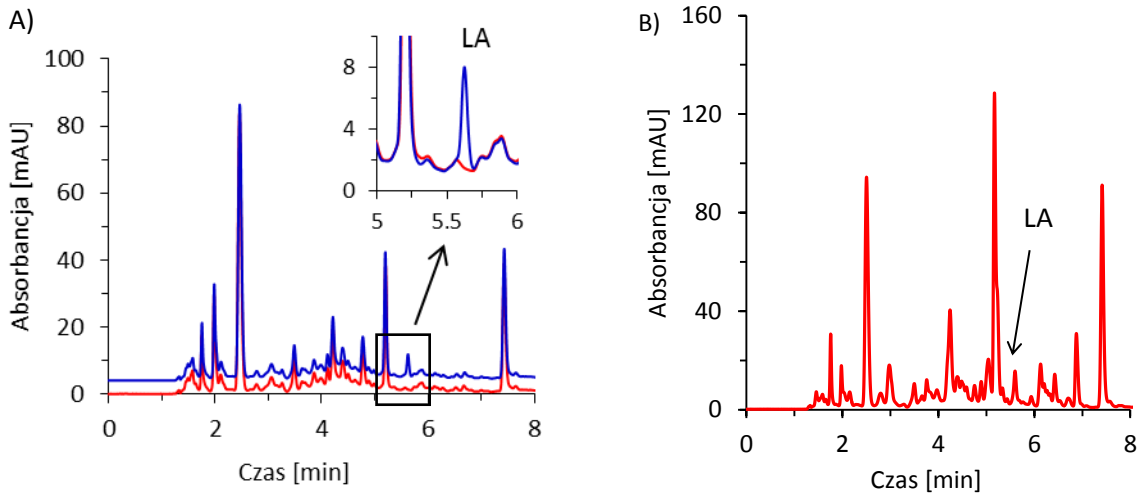


Rys. 8. Przykładowe chromatogramy próbki moczu (A) elucja izokratyczna, (B) gradientowa. Piki: 1 – CSH-CMQT (20,26 µmol/L), 2 – CGSH-CMQT (1,39 µmol/L), 3 – standard wewnętrzny, 4 - CMQT, 5 – 1-metylo-2-tiochinolon (18,7 µmol/L). Warunki chromatograficzne: kolumna Zorbax C-18, temp. 25 °C, prędkość przepływu 1,2 mL/min, analityczna długość fali 355 nm dla tioli (linia niebieska) i 375 nm dla tiosiarczanów (linia czerwona). A – elucja izokratyczna 60/40 (v/v) acetonitryl/woda; B – elucja gradientowa, faza ruchoma TCA/acetonitryl. Rysunek 5b i 5c w pracy **H2**.

Na tym samym schemacie opierały się opracowane przeze mnie metody oznaczania metimazolu (MMI) [**H1**] i LA [**H5**] w próbkach biologicznych. Próbki zawierające MMI lub LA poddawane były derywatyzacji z CMQT bądź BCPB, a powstałe *S*-pirydyniowe bądź *S*-chinolinowe pochodne separowane w odwróconych układzie faz. Stężenie MMI w homogenatach tkanek kurzych i osoczu oznaczałam po derywatyzacji z CMQT przy analitycznej długość fali wynoszącej 345 nm (Rys. 9). Zawartość LA w moczu i preparatach farmaceutycznych oznaczałam stosując 321 nm, jako analityczną długość fali (Rys. 10).

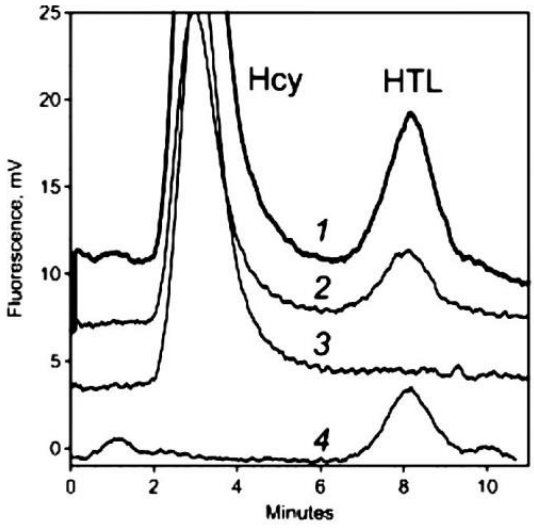


Rys. 9. Przykładowe chromatogramy homogenatów tkanek. Linia ciągła – próbki nie zawierające MMI, linia przerywana – próbki doszczepione MMI. Pik MMI-CMQT zaznaczono na chromatogramach strzałką. A) roztwór standardowy MMI o stężeniu 1 µg/mL (20 ng w piku), B) homogenat białka, stężenie MMI 2 µg/g (3,6 ng w piku), C) homogenat żółtka, stężenie MMI 2 µg/g (3,6 ng w piku), D) homogenat głowy embrionu, stężenie MMI 13,1 µg/g (23,3 ng w piku), E) homogenat tułowia embrionu, stężenie MMI 15,6 µg/g (27,8 ng w piku), F) homogenat wątroby kury, stężenie MMI 2,1 µg/g (9,0 ng w piku), G) homogenat tarczycy kury, stężenie MMI 25,2 µg/g (44,9 ng w piku), H) homogenat mózgu kury, stężenie MMI 1,9 µg/g (3,4 ng w piku), I) osocze kury, stężenie MMI 4,9 µg/ml (8,7 ng w piku). Rysunek 2 w pracy **H1.**



Rys. 10. Przykładowe chromatogramy próbek moczu: (A) próbka moczu porannego osoby niezażywającej LA (czerwona linia) i po doszczepieniu LA o stężeniu 1 µmol/L (linia niebieska), (B) próbka moczu otrzymana po 1 godzinie od osoby, która przyjęła LA w ilości 600 mg. Warunki chromatograficzne: kolumna Zorbax C-18; profil gradientu 0–6 min, 10–48% B; 6–10 min, 48–10% B; 10–12 min, 10% B; Rozpuszczalniki: (A) 2% roztwór kwasu octowego o pH 2,54 i (B) acetonitryl; temp. kolumny 25 °C, prędkość przepływu 1 mL/min, analityczna długość fali 321 nm. Rysunek 4a i 4b w pracy **H5**.

W celu oznaczenia HTL w osoczu i moczu opracowałam metodę opartą na chromatografii jonowymiennej [**H6**, **H7**]. Wykorzystałam fakt, że cząsteczka HTL jest dodatnio naładowana w pH poniżej pK_a (Rys. 6), w związku z czym powinna ulegać retencji na kolumnie kationitowej. Dobrą separację HTL od innych składników próbki (glutation, histydyna, homocysteina) uzyskałam stosując elucję izokratyczną i fazę ruchomą zawierającą bufor fosforanowy o pH 6,6 i chlorek sodu (Rys. 11).



Rys. 11. Przykładowe chromatogramy próbek osocza i roztworu standardowego HTL. 1–próbka osocza zawierająca HTL o stężeniu 6,7 nmol/L, 2–próbka osocza zawierająca HTL o stężeniu 2,8 nmol/L, 3–próbka osocza po dodaniu NaOH przed analizą HPLC, 4–roztwór standardowy HTL (0,1 pmol w piku). Warunki chromatograficzne: kolumna: kationit PolySULFOETHYL A, faza ruchoma: 10 mmol/L bufor fosforanowy pH 6,6 zawierający 5 mmol/L NaCl, prędkość przepływu fazy ruchomej 0,15 mL/min. Piki monitorowano przy fali wzbudzenia 370 nm i emisji 480 nm, z zastosowaniem pokolumnowej derywatyzacji z OPA. Rysunek 1 w pracy **H6**.

Połączenie opracowanych warunków rozdzielania chromatograficznego z ekstrakcją pozwala na dokładne oznaczanie HTL w badanych próbkach osocza i moczu, a dzięki temu może pomóc w wyjaśnieniu związku HTL z niektórymi chorobami.

Walidacja metod

Opracowane w trakcie badań metody analityczne zostały poddane walidacji zgodnie z procedurami zalecanymi w literaturze [10]. W trakcie prowadzonych przeze mnie eksperymentów sprawdziłam zakres liniowości metod, precyzję, dokładność, granice oznaczalności (LOQ) i wykrywalności (LOD) oraz stabilność analitów. Zebrane wyniki dla poszczególnych metod przedstawiłam w tabeli 1. Opracowane metody charakteryzują się dobrą dokładnością (odzysk) i precyzją (względne odchylenie standardowe, RSD), a uzyskane wartości LOQ pozwalają na śledzenie stężenia omawianych analitów w badanych próbkach biologicznych.

Tabela 1. Rezultaty procedur walidacji opracowanych metod.

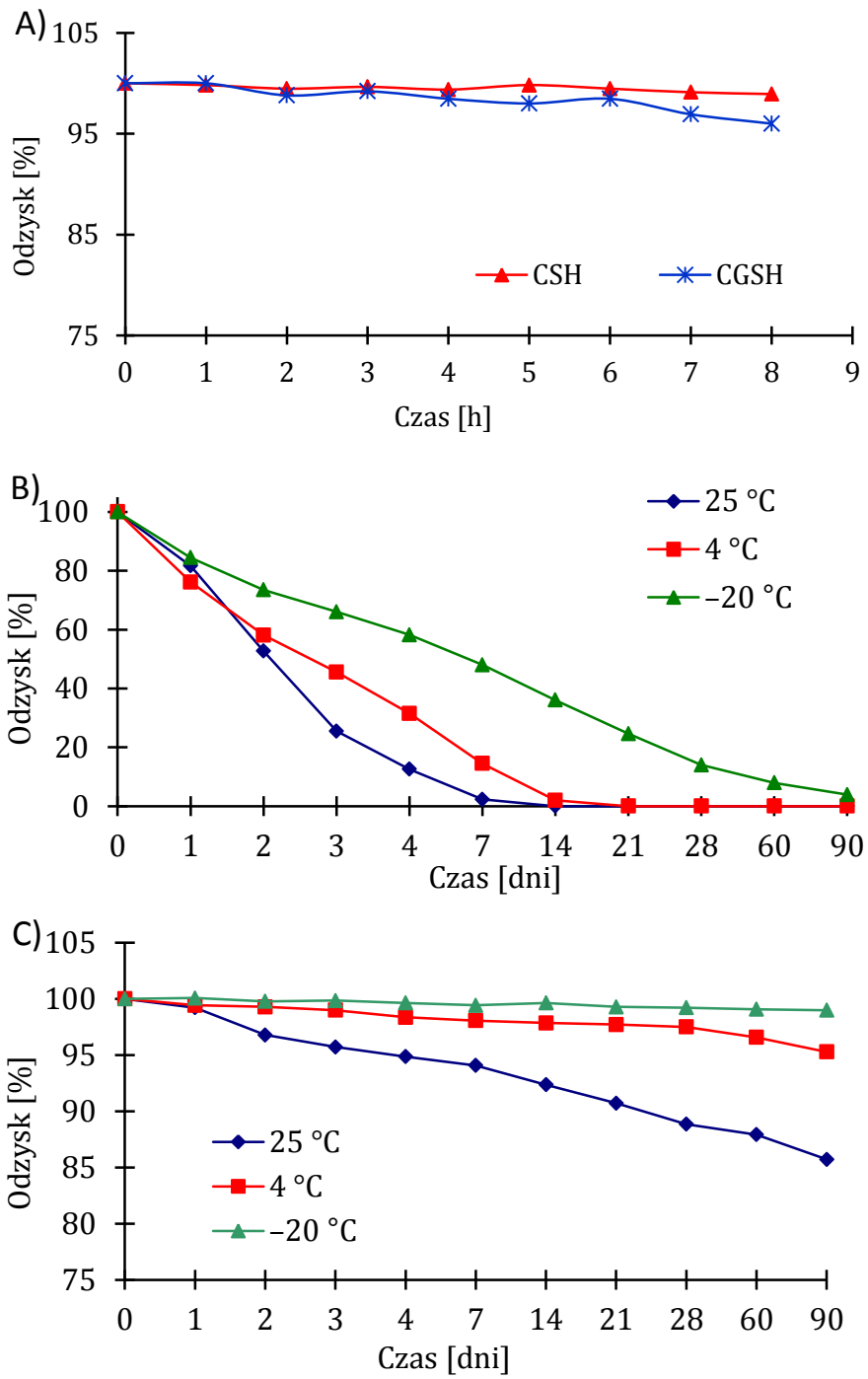
Analit	Matryca	Zakres liniowości	RSD [%]		Odzysk [%]		LOD [a]	LOQ [a]	Ref.
			min	max	min	max			
MMI	Osocze, tkanki	0,5 – 20 (mg/L, mg/kg)	0,5	12,1	88,5	109,7	0,1	0,5	**H1**
$S_2O_3^{2-}$	Mocz	0,5 – 50 (µmol/L)	1,4	7,9	91,2	108,2	0,3	0,5	**H2**
Tiole	Mocz	50 – 500 (µmol/L)	2,1	8,4	95,7	102,9	14,5	48,4	**H4**
LA	Mocz	0,2 – 50 (µmol/L)	0,9	7,0	96,5	111,5	0,1	0,2	**H5**
HTL	Mocz, osocze	1 – 40 (nmol/L)	6,7	10,5	93,4	113,5	0,36	1	**H6** **H7**

[a] Wartości LOD i LOQ są w tych samych jednostkach co zakres liniowości

Sprawdziłam również trwałość analitów lub ich pochodnych w badanych próbkach. Określenie trwałości analitu jest istotne, gdyż determinuje ona czas i warunki przechowywania pobranego materiału. HTL, jako tioeter jest bardzo reaktywny i z natury nietrwały. Sprawdziłam, że w próbkach osocza przechowywanych w temperaturach 4 i 23 °C po 1 godzinie pozostaje odpowiednio 98,0 ± 1,8% i 86,5 ± 3,8% zawartości początkowej HTL, a po 5 godzinach 87,8 ± 3,8% i 43,9 ± 2,0% [**H6**]. Oznacza to, że pobrana do badań krew powinna być natychmiast schłodzona do temp. 4 °C, a osocze uzyskane po odwirowaniu krwi w 4 °C niezwłocznie zamrożone. Stężenie HTL

w próbkach osocza przechowywanych w -80 °C przez 18 miesięcy pozostaje praktycznie na stałym poziomie (97,4%). W porównaniu do osocza większość próbek moczu jest wolna od białek i posiada lekko kwaśny odczyn (pH < 7,0), w związku z tym HTL powinien być bardziej stabilny w moczu niż w osoczu, gdyż szybkość reakcji hydrolizy HTL odpowiedzialnej za jego rozkład rośnie ze wzrostem pH próbki. Zaobserwowałam, że nie ma istotnych statystycznie zmian w stężeniu HTL w próbkach moczu o pH z zakresu 5,2 – 6,3, przechowywanych w temp. 4 °C przez 24 godziny i w 23 °C przez 9 godzin. Jeśli te same próbki moczu pozostawiłam w temp. pokojowej przez 24 godziny, wówczas wystąpił około 20% ubytek HTL w stosunku do wartości początkowej. W przypadku próbek moczu o pH 7,3 obserwowałam szybszy ubytek stężenia HTL niż w próbkach lekko kwaśnych. W próbkach tych przechowywanych w temp. 4 °C nie było istotnych zmian w stężeniu przez 9 godzin, natomiast po upływie 24 godzin ubywało około 30% HTL. Podczas gdy te same próbki były przechowywane w temp. 23 °C przez 9 i 24 godziny, wówczas z próbki ubyło odpowiednio 40 i 70% HTL [**H7**]. Uzyskane wyniki pokazują, że próbki moczu w odróżnieniu do próbek osocza, mogą być przechowywane przez kilka godzin w temp. pokojowej zanim zostaną poddane analizie na zawartość HTL.

Równie reaktywne jak HTL są aminokwasy zawierające wolną grupę –SH. Sprawdziłam, że w próbkach moczu przechowywanych w temperaturze pokojowej stężenie CSH i CGSH nie zmienia się znacząco przez 4-5 godzin (Rys. 12A) [**H3**]. Całkowity zanik zredukowanej formy CSH w moczu występował po 14 dniach przechowywania próbek w temperaturze pokojowej i po 21 dniach, kiedy próbki znajdowały się w temperaturze 4 °C (Rys. 12B). Natychmiastowe zamrożenie próbek moczu do temperatury -20 °C spowalnia proces utleniania grup –SH, lecz go nie hamuje. Po upływie 3 miesięcy, w tak przechowywanych próbkach moczu, ubywa 96% CSH. W kolejnym kroku sprawdziłam trwałość 2-*S*-chinolinowej pochodnej CSH w roztworze uzyskanym po derywatyzacji moczu. Jak przedstawiłam na rysunku 12C, stężenie pochodnej CSH nie zmienia się co najmniej 1, 3 i 90 dni, gdy roztwór jest przechowywany odpowiednio w temperaturach 25, 4 i -20 °C. Natomiast po upływie 3 miesięcy w próbkach przechowywanych w 25, 4 i -20 °C znajduje się odpowiednio 85, 96 i ponad 99% wartości początkowej badanej pochodnej [**H3**].



Rys. 12. Badania trwałości aminokwasów siarkowych i ich *S*-chinoliniowych pochodnych w moczu. A) Trwałość występujących endogennie, zredukowanych form CSH i CGSH w moczu przechowywanym w temp. pokojowej. B) Ubytek endogennej zredukowanej formy CSH w przez 90 dni. C) Trwałość 2-*S*-chinolinowej pochodnej CSH w końcowym analitycznym roztworze przechowywanym przez 90 dni. Rysunek 1 w pracy **H3**.

Badałam również trwałość tiosiarczanów w próbkach moczu przechowywanych w różnych temperaturach. Nie zaobserwowałam znaczących zmian w stężeniu tiosiarczanów w próbkach moczu przechowywanego przez 8 godzin w temperaturze pokojowej, jak i przez 24 godziny w temp. 4 °C [**H2**]. Po upływie 24 godzin w próbkach

moczu przechowywanych w 25 i 4 °C pozostaje odpowiednio 67,9 i 95,8% wartości początkowej tiosiarczanów. Wyniki opisane powyżej wskazują, że forma zredukowana aminokwasów siarkowych jest mniej trwała niż jony tiosiarczanowe. W związku z tym, jeśli oznaczane będą jednocześnie tiosiarczany i tiole zredukowane wówczas próbki moczu powinny być poddane analizie, bądź derywatyzacji, w ciągu 4 godzin od pobrania. Uzyskany po derywatyzacji moczu roztwór może być przechowywany w temperaturze -20 °C nawet 3 miesiące [**H3**]. Fakt ten umożliwia gromadzenie większej liczby próbek przed ich końcową analizą chromatograficzną.

Największą trwałość w moczu, spośród badanych analitów, wykazuje LA, którego stężenie nie zmienia się przez 24 godziny w próbkach przechowywanych zarówno w temp. 4 °C jak i pokojowej [**H5**]. Stabilna jest również, uzyskana po derywatyzacji z CMQT, 2-*S*-chinoliniowa pochodna MMI. Jej stężenie w osoczu i homogenatach tkanek nie zmienia się znacząco przez 24 godziny w przypadku przechowywania próbek w temp. pokojowej, a nawet przez 10 dni gdy próbki znajdują się w temp. 4 °C [**H1**].

Uzyskane rezultaty

Tiole endogenne i tiosiarczany w moczu

Tiole obecne w organizmach żywych pełnią szereg ważnych funkcji związanych z metabolizmem oraz homeostazą komórkową [11, 12]. W związku z tym, szybkie, proste i dokładne metody ich oznaczania ciągle są poszukiwane przez badaczy. Opracowana przeze mnie spektrofotometryczna metoda oznaczania sumy tioli całkowitych w moczu [**H4**] spełnia te kryteria i umożliwiła mi zbadanie zależności pomiędzy stężeniem tioli a wiekiem badanych osób. Badaniu poddałam 38 próbek uzyskanych od kobiet (n = 19) i mężczyzn (n = 19) w wieku od 14 do 82 lat. W celu wyeliminowania rozbieżności wynikających z różnej objętości moczu wydalanego w ciągu doby uzyskane wyniki normalizowałam na kreatyninę. Oznaczone stężenia tioli całkowitych mieściły się w przedziale 17,2 – 83,6 mmol/mol kreatyniny i były podobne do wartości uzyskiwanych innymi metodami [6, 13, 14]. Nie zaobserwowałam różnic w wydalaniu tioli z moczem w badanej grupie kobiet i mężczyzn. Zauważyłam natomiast istotną statystycznie, pozytywną korelację pomiędzy stężeniem tioli całkowitych w moczu i wiekiem osób badanych ($r = 0{,}661$, $p < 0{,}05$) [**H4**], która nie występowała we wcześniejszych badaniach obejmujących CSH i CGSH w moczu [**H3**]. Różnica może wynikać z faktu, że zaproponowana przeze mnie metoda pozwala na oznaczenie sumy wszystkich związków zawierających grupy tiolowe, a nie tylko pojedynczych aminokwasów siarkowych.

Oprócz wyznaczenia poziomów tioli całkowitych w moczu zbadałam również stosunek formy zredukowanej i utlenionej głównych aminokwasów siarkowych wydalanych z moczem u 45 ochotników [**H3**]. Stężenie formy zredukowanej i całkowitej CSH i CGSH oznaczałam bezpośrednio techniką HPLC, podczas gdy stężenie form utlenionych tych aminokwasów wyliczałam z różnicy pomiędzy zawartością formy całkowitej i zredukowanej. Grupę badawczą podzieliłam ze względu na wiek na 6 podgrup. Uzyskane wyniki zestawiłam w Tabelach 2 i 3.

Tabela 2. Stężenie formy całkowitej CSH i CGSH w moczu w różnych grupach wiekowych [**H3**].

Wiek [lata]	N	CSH [a]		CGSH [a]	
		Średnia ± SD	Mediana	Średnia ± SD	Mediana
< 10	11	30,37 ± 6,96	28,57	1,72 ± 0,46	1,70
20-29	7	30,39 ±11,54	22,87	1,58 ±0,35	1,42
30-39	6	29,99 ± 7,80	31,03	1,70 ± 0,40	1,73
40-49	3	29,63 ± 1,32	29,22	1,67 ± 0,10	1,70
50-59	8	30,49 ± 9,53	27,88	1,70 ± 0,47	1,67
> 60	10	30,01 ± 5,25	30,81	1,76 ± 0,73	1,72

[a] Stężenie wyrażone w mmol/mol kreatyniny

W badanych próbkach stężenie całkowitej CSH i CGSH w moczu utrzymywało się na podobnym poziomie i nie zaobserwowałam istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi ($p > 0,05$). Średnia zawartość CSH i CGSH, obliczona dla wszystkich ochotników ($N = 45$) wynosiła odpowiednio 30,15 i 1,69 mmol/mol kreatyniny. Uzyskane wartości są zgodne z podawanymi przez innych badaczy [6, 14 - 16]. Całkowita pula CSH składa się w 6,1% z formy zredukowanej i w 93,9% z formy utlenionej. Po uwzględnieniu podziału na dwie grupy obejmujące dzieci i dorosłych, zawartości formy zredukowanej i utlenionej wynosi odpowiednio u dzieci 6 i 94%, a u dorosłych 6,3 i 93,7%. W przypadku CGSH całkowita pula tego aminokwasu u dzieci składała się w 9,6% z formy zredukowanej i w 90,4% z formy utlenionej, podczas gdy u dorosłych w 13,9% z formy zredukowanej i w 86,1% z formy utlenionej.

Tabela 3. Status redox dla CSH i CGSH w moczu w różnych grupach wiekowych [**H3**].

Wiek [lata]	N	Status redox CSH		Status redox CGSH	
		Średnia ± SD	Mediana	Średnia ± SD	Mediana
< 10	11	0,0577 ± 0,0371	0,0478	0,0805 ± 0,0208[a]	0,0808
20-29	7	0,0668 ± 0,0282	0,0719	0,1408 ± 0,0374	0,1307
30-39	6	0,0698 ± 0,0365	0,0800	0,1549 ± 0,0638	0,1519
40-49	3	0,0704 ± 0,0054	0,0705	0,1493 ± 0,0189	0,1455
50-59	8	0,0709 ± 0,0467	0,0639	0,1553 ± 0,0336	0,1663
> 60	10	0,0703 ± 0,0316	0,0762	0,1545 ± 0,0805	0,1413

[a] Różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą dzieci a grupami pozostałymi, $p < 0,01$

Stosunek formy zredukowanej do utlenionej (status redox) dla CSH występującej w moczu rósł w poszczególnych grupach wiekowych z 0,0577 do 0,0709 (Tabela 3), jakkolwiek różnice te nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). W przypadku CGSH zaobserwowałam istotną statystycznie pozytywną korelację pomiędzy statusem redox a wiekiem ($p = 0,0013$, $r = 0,4976$). Dodatkowo w grupie dzieci status redox jest istotnie statystycznie niższy ($p < 0,01$) niż w grupie dorosłych, podczas gdy nie było istotnych statystycznie różnic pomiędzy wszystkimi grupami dorosłych ($p > 0,05$). Stosunek formy zredukowanej do utlenionej dla CGSH przesunięty jest w kierunku występowania większej ilości formy utlenionej w grupie dzieci w stosunku do dorosłych [**H3**].

Wykorzystując opracowaną chromatograficzną metodę oznaczania tiosiarczanów [**H2**] ustaliłam, że w moczu osób zdrowych występują one w zakresie 0,7 – 4,5 mmol/mol kreatyniny, a wartość średnia obliczona dla grupy 98 osób wynosi 1,9 mmol/mol kreatyniny [**H2**, 17]. Wyznaczony poziom jest zbliżony do wartości średniej 2,59 mmol/mol kreatyniny uzyskanej przez Belardinelli i in. [18].

Korelacja pomiędzy tiolaktonem homocysteiny a homocysteiną w moczu i osoczu

Tiolakton homocysteiny (HTL) jest bardzo reaktywnym metabolitem homocysteiny (Hcy), która jest wiązana z chorobami sercowo-naczyniowymi [19, 20]. Jego metabolizm nie jest do końca poznany. Wykorzystując opracowaną metodę oznaczania HTL w osoczu wyznaczyłam zakres stężeń w jakich on występuje (Tabela 4). Stężenie HTL w osoczu pochodzącym od 60 osób waha się od 0 do 34,8 nmol/L, co stanowi od 0 do 0,28% w stosunku do tzw. Hcy całkowitej. Obliczona dla tych próbek wartość średnia wynosi 2,82 ± 6,13 nmol/L [**H6**]. W badanych próbkach nie znalazłam

korelacji pomiędzy stężeniem HTL i Hcy w grupie kobiet (r = -0,21, p > 0,05) jak i mężczyzn (r = 0,19, p > 0,05). Zaobserwowałam natomiast słabą, lecz nie istotną statystycznie, korelację pomiędzy stężeniem HTL a wiekiem mężczyzn (r = 0,295, p > 0,05). Podobnej zależności nie stwierdziłam w przebadanej grupie kobiet (r = 0,02).

Tabela 4. Stężenie HTL i Hcy w osoczu krwi człowieka [**H6**].

Analit	Płeć [a] (liczba próbek)	Zakres	Mediana	Średnia ± SD
HTL (nmol/L)	M (35)	0 – 34,8[b]	0,5	3,3 ± 7,3
	K (25)	0 – 16,0[b]	0,0	1,9 ± 3,9
Hcy (µmol/L)	M (35)	8,0 – 35,4	13,5	14,9 ± 5,2
	K (25)	5,25 – 24,4	12,5	13,1 ± 4,7
HTL/Hcy (%)	M (35)	0 – 0,281	0,000	0,020 ± 0,051
	K (25)	0 – 0,1444	0,013	0,035 ± 0,047

[a] nie ma różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą kobiet i mężczyzn.
[b] HTL był poniżej granicy oznaczalności w 29 próbkach (16 mężczyzn i 13 kobiet).

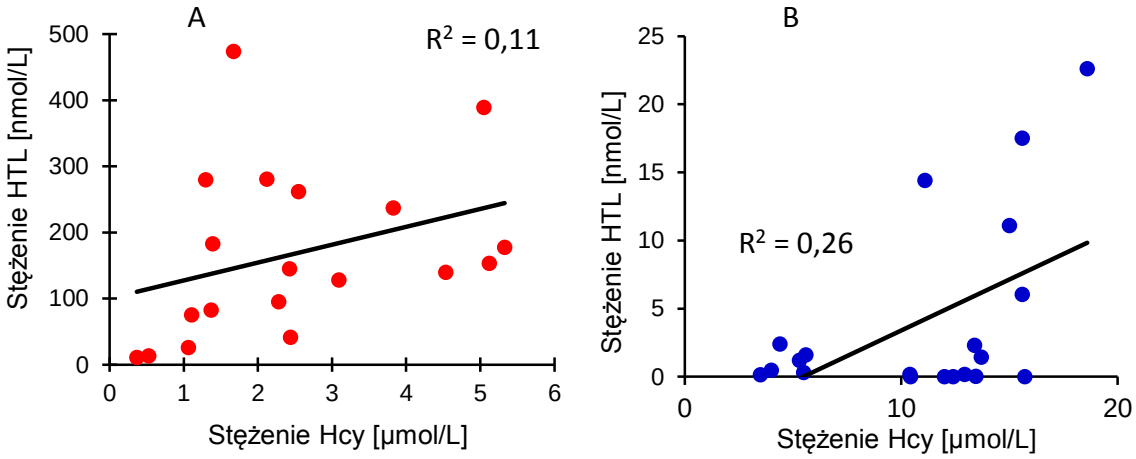
Wykorzystując opracowaną i opisaną wcześniej metodę oznaczania HTL w moczu odkryłam nieopisaną dotychczas jego pulę [**H7**]. We wszystkich przebadanych próbkach moczu HTL występował w zakresie stężeń od 11,0 do 473,7 nmol/L (Tabela 5). Ponieważ HTL jest metabolicznie powiązany z Hcy, w badanych próbkach moczu oznaczyłam również zawartość Hcy, której stężenie wynosiło od 0,4 do 5,3 µmol/L. W próbkach tych HTL stanowił od 2,5 do 28,3% całkowitej zawartości Hcy.

Tabela 5. Zawartość HTL i Hcy w moczu i osoczu [**H7**].

Analit	Mocz (n = 19)			Osocze (n = 20)		
	Średnia (SD)	Mediana	Zakres	Średnia (SD)	Mediana	Zakres
HTL (nmol/L)	168 (127)	144,8	11,0-473,7	4,1 (6,7)	0,56	<0,1-22,6
Hcy (µmol/L)	2,5 (1,6)	2,3	0,4-5,3	10,9 (4,6)	12,2	3,5-18,6
HTL/Hcy (%)	7,7 (7,0)	6,0	1,7-28,3	0,03 (0,04)	0,01	<0,001-0,29

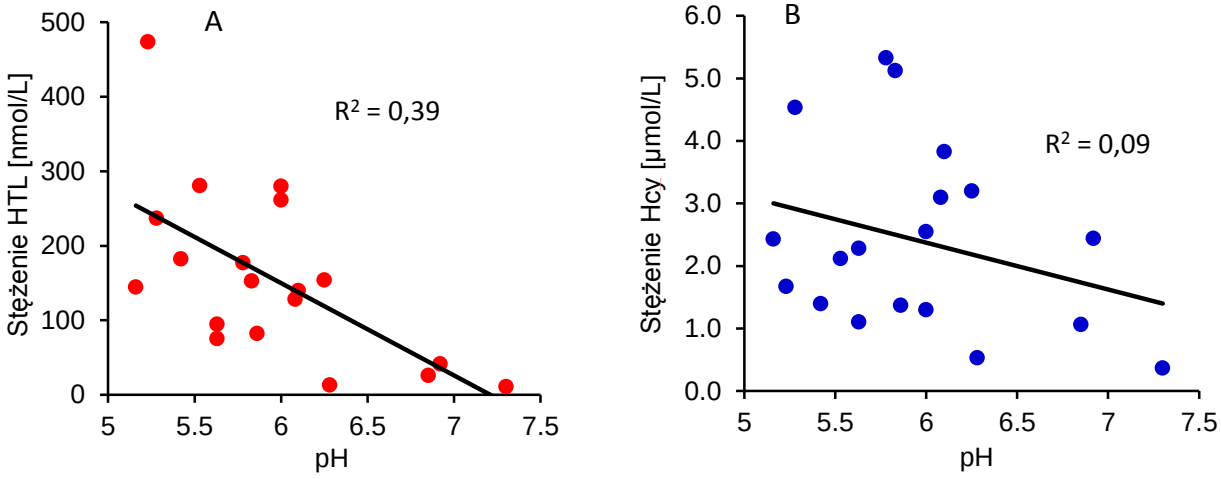
W następnym etapie badałam czy występuje zależność pomiędzy stężeniem HTL i Hcy w moczu i osoczu. Nie znalazłam istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem HTL i Hcy w moczu (Rys. 13A), natomiast w próbkach osocza (Rys. 13B) wystąpiła słaba, pozytywna korelacja pomiędzy stężeniem HTL a Hcy (r = 0,51,

p = 0,02). Uzyskane zależności mogą sugerować, że Hcy, będąca metabolicznym prekursorem HTL nie jest głównym determinantem stężenia HTL. Inne czynniki takie jak stężenie kwasu foliowego, metioniny czy aktywność tiolaktonazy są równie ważne.



Rys. 13. Zależność pomiędzy stężeniem HTL i Hcy w moczu (A) i osoczu (B). Rysunek 2 w pracy **H7**.

W kolejnym kroku sprawdziłam czy pH próbki moczu ma jakikolwiek wpływ na stężenie występujących w nim HTL i Hcy. Zaobserwowałam znaczącą statystycznie, ujemną korelację (r = -0,63, p < 0,01) pomiędzy stężeniem HTL i pH moczu (Rys. 14A), która nie występuje w przypadku Hcy (Rys. 14B). Może to sugerować zależny od pH mechanizm wydalania HTL z moczem, który nie występuje w przypadku Hcy.



Rys. 14. Zmiany stężenia HTL (A) i Hcy (B) w zależności od pH moczu, n = 19. Rysunek 3 w pracy **H7**.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że ilość HTL zawartego w moczu jest około 100 razy większa od ilości występującej w osoczu. Fakt ten sugeruje, że HTL jak każdy inny, zbędny w organizmie metabolit, jest usuwany przez nerki. Potwierdzeniem tej tezy może być zbadany i wyliczony względny klirens HTL i Hcy dla 5 ochotników

(Tabela 6). HTL i Hcy są wydalane z moczem odpowiednio w ilościach 286 – 415 nmol/dzień i 1,6 – 5,5 µmol/dzień. Przeprowadzone obliczenia wykazały, że ponad 95% HTL jest wydalane wraz z moczem, podczas gdy około 99% Hcy jest re-absorbowane w nerkach. Obserwacje te są zgodne z wynikami ostatnich badań, wskazujących że HTL jest toksycznym, w stosunku do organizmu, metabolitem [21].

Tabela 6. Średnie stężenie HTL i Hcy i ich względny klirens u 5 ochotników [**H7**].

	Mocz			Osocze			Względny klirens [b]	
	HTL nmol/L	Hcy µmol/L	Crn [a] mmol/L	HTL nmol/L	Hcy µmol/L	Crn [a] mmol/L	HTL	Hcy
1	82 ± 2	1,4 ± 0,03	7,1 ± 0,03	0,12 ± 0,03	3,5 ± 0,1	53 ± 1	4,74	0,003
2	389 ± 34	4,4 ± 1,2	27,4 ± 0,5	2,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1	34 ± 0	0,21	0,001
3	280 ± 44	1,3 ± 0,2	9,3 ± 0,3	0,17 ± 0,03	5,6 ± 0,3	39 ± 1	6,96	0,001
4	95 ± 27	2,3 ± 0,3	12,6 ± 0,6	1,2 ± 1,0	5,3 ± 0,3	64 ± 0	0,40	0,002
5	183 ±15	1,4 ± 0,2	9,0 ± 0,5	0,32 ± 0,45	5,5 ± 0,2	47 ± 0,1	2,8	0,001

[a] Crn - kreatynina

[b] Względny klirens = $(Analit_{mocz} / Analit_{osocze})/(Kreatynina_{mocz} / Kreatynina_{osocze})$

Międzypokoleniowy transport metimazolu

Metimazol (MMI) jest lekiem tyrostatycznym powszechnie używanym w leczeniu nadczynności tarczycy, często nielegalnie podawanym zwierzętom hodowlanym w celu podwyższenia ich masy. Pozostałości MMI obniżają jakość produktów mięsnych jak i, przedostając się do łańcucha pokarmowego, mogą wpływać na zdrowie ludzi. Wykorzystując opracowaną metodę oznaczania zredukowanego i całkowitego MMI w homogenatach tkanek [**H1]**, zbadałam jego transport międzypokoleniowy na przykładzie kury domowej [22]. Do badań użyłam tkanek pobranych od kur, którym podawano MMI wraz z wodą do picia oraz materiał pobrany z jaj uzyskanych od kur traktowanych MMI i rozwijających się embrionów. Oznaczone zawartości MMI w tkankach kur, jajach kur i embrionach zebrałam w Tabelach 7 i 8.

Tabela 7. Stężenie zredukowanego i całkowitego MMI w osoczu i tkankach niosek, n=3 [**H1**].

Mózg		Wątroba		Tarczyca		Osocze	
Średnia±SD µg/g tkanki	RSD %	Średnia±SD µg/g tkanki	RSD %	Średnia±SD µg/g tkanki	RSD %	Średnia±SD µg/mL	RSD %
Zredukowany MMI							
1,3 ± 0,1	6,3	2,2 ± 0,1	5,0	20,8 ± 0,8	3,7	12,5 ± 0,6	4,7
1,2 ± 0,1	6,0	5,2 ± 0,5	8,7	15,5 ± 1,0	6,1	4,8 ± 0,2	4,3
1,2 ± 0,1	5,1	4,5 ± 0,3	5,8	22,3 ± 0,6	2,5	7,2 ± 0,3	3,4
1,1 ± 0,1	7,5	1,9 ± 0,1	7,5	24,9 ± 0,7	2,7	4,0 ± 0,1	2,5
Całkowity MMI							
2,4 ± 0,1	3,7	2,6 ± 0,2	7,8	21,1 ± 1,1	5,3	13,5 ± 0,5	3,7
1,9 ± 0,1	5,2	5,9 ± 0,5	8,6	16,4 ± 0,8	4,6	5,1 ± 0,2	4,0
2,0 ± 0,1	6,5	4,9 ± 0,3	6,7	27,4 ± 2,1	7,7	7,8 ± 0,3	4,0
1,8 ± 0,1	7,7	2,4 ± 0,2	6,6	26,5 ± 1,9	7,1	4,3 ± 0,1	3,3

Tabela 8. Stężenie zredukowanego i całkowitego MMI w jajkach i tkankach 6-dniowych embrionów kurzych, n=3 [**H1**].

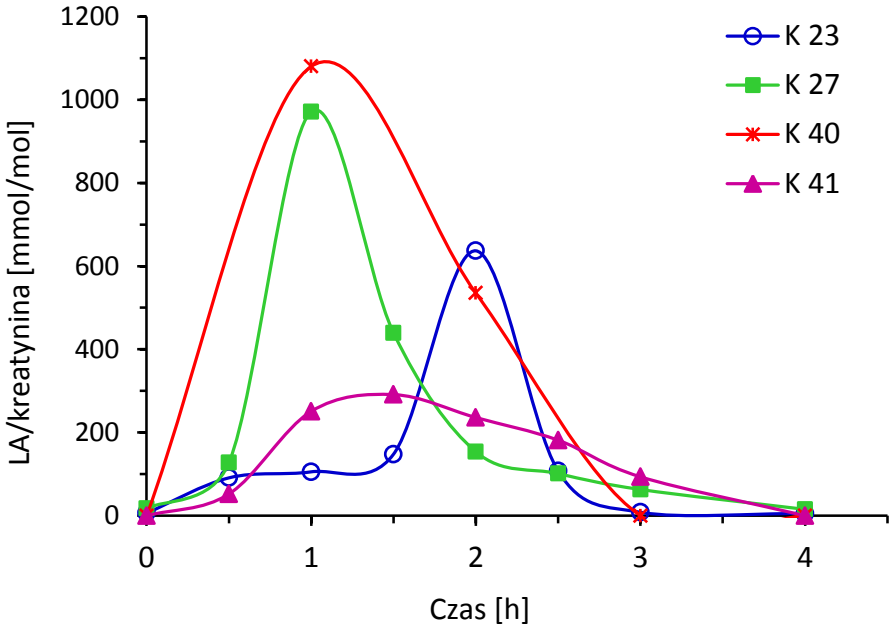
Białko		Żółtko		Głowa		Tułów	
Średnia±SD µg/g tkanki	RSD %	Średnia±SD µg/g tkanki	RSD %	Średnia±SD µg/g tkanki	RSD %	Średnia±SD µg/g tkanki	RSD %
Zredukowany MMI							
9,5 ± 0,1	1,0	6,9 ± 0,2	2,2	13,3 ± 1,3	9,5	16,9 ± 1,6	9,5
14,3 ± 0,2	1,2	10,8 ± 0,2	1,5	12,9 ± 1,1	8,5	15,4 ± 1,2	7,6
16,9 ± 0,1	0,5	9,9 ± 0,5	5,3	11,6 ± 0,7	6,2	14,7 ± 1,4	9,2
28,2 ± 0,2	0,8	19,3 ± 0,6	3,1	20,3 ± 1,1	5,4	22,2 ± 1,4	9,3
8,8 ± 0,7	7,5	7,3 ± 0,2	3,1	8,9 ± 0,6	6,3	8,4 ± 0,5	5,3
16,2 ± 0,2	1,0	14,4 ± 0,2	1,2	6,4 ± 0,6	9,4	4,6 ± 0,4	9,3
14,3 ± 0,1	0,6	10,9 ± 0,1	0,8	8,9 ± 0,8	9,3	8,6 ± 0,7	8,2
13,6 ± 0,2	1,5	12,4 ± 0,1	1,1	4,3 ± 0,4	9,2	6,3 ± 0,5	8,3
Całkowity MMI							
10,1 ± 0,1	0,5	8,8 ± 0,2	2,1	14,7 ± 0,9	5,9	19,3 ± 1,3	6,7
14,9 ± 0,3	2,3	14,1 ± 0,3	2,0	14,4 ± 0,9	6,4	17,0 ± 1,5	8,7
17,7 ± 0,3	1,5	10,9 ± 0,4	4,0	11,9 ± 1,2	9,7	15,7 ± 1,1	7,1
29,2 ± 0,2	0,5	20,1 ± 0,5	2,3	22,6 ± 0,7	3,0	23,5 ± 1,4	5,9
9,2 ± 0,1	1,0	7,4 ± 0,4	5,1	9,2 ± 0,9	9,6	8,8 ± 0,5	5,7
17,1 ± 0,2	1,3	18,7 ± 0,3	2,0	7,6 ± 0,6	7,9	4,3 ± 0,4	9,4
13,9 ± 0,1	0,8	14,4 ± 0,3	2,0	9,4 ± 0,8	8,5	8,6 ± 0,8	9,3
14,4 ± 0,1	0,7	15,7 ± 0,1	0,6	4,4 ± 0,2	4,1	6,3 ± 0,3	4,8

U kur stężenie MMI było najwyższe w tkankach tarczycy, podczas gdy w wątrobie i mózgu pozostawało na względnie niskim poziomie. Natomiast u embrionów kurzych było na podobnym poziome w całym organizmie (głowa i tułów). Relatywnie duże stężenie MMI znajdowało się w jajach kur, które przyjmowały MMI wraz z wodą do picia. Uzyskane wyniki wskazują, że rozwijające się embriony narażone są na stosunkowo

duże dawki MMI zredukowanego oraz jego formy utlenionej, uważanej za cytotoksyczną [22].

Badanie farmakokinetyki

Kwas liponowy (LA) jest związkiem naturalnie występującym w organizmach roślin i zwierząt, który posiada dwie formy – utlenioną i zredukowaną. Jego obie formy stanowią uniwersalny bufor antyutleniający działający w organizmach żywych [23, 24]. W związku z tym LA coraz częściej jest stosowany jako suplement diety [25]. Wykorzystując opracowaną przeze mnie i opisaną wcześniej chromatograficzną metodę oznaczania LA w moczu, zbadałam jego farmakokinetykę [**H5**]. W badaniach wzięły udział cztery, zdrowe ochotniczki w wieku 23 - 41 lat, które otrzymały pojedynczą porcję 600 mg LA, po 8-godzinnym okresie poszczenia. Wydalanie LA z moczem monitorowałam w próbkach gromadzonych przez 4 godziny, a uzyskane rezultaty po korelacji na kreatyninę znajdują się na rysunku 15.



Rys. 15. Profil zmian stężenia LA w moczu czterech zdrowych ochotniczek, po zażyciu suplementu zawierającego 600 mg LA. Rysunek 5 w pracy **H5**.

Stężenie LA w moczu, pochodzącym od ochotników, którzy jednorazowo zażyli suplement diety zawierający 600 mg LA, mieściło się w przedziale 0,1 - 28,6 μmol/L. W moczu porannym zebranym przed suplementacją LA, nie stwierdziłam obecności badanego kwasu. Maksymalne stężenie LA w moczu występowało po 1 godzinie od zażycia suplementu u kobiety w wieku 27 i 40 lat oraz po 1,5 i 2 godzinach odpowiednio u

kobiet w wieku 41 i 23 lat. We wszystkich przypadkach po 4 godzinach stężenie LA wraca do wartości początkowej wynoszącej 0 mmol/mol kreatyniny.

Główne osiągnięcia

1. Opracowanie nowych procedur przygotowania próbki biologicznej do analizy, ze szczególnym zwróceniem uwagi na homogenizację, derywatyzację, redukcję, ekstrakcję i deproteinizację. Opracowane procedury umożliwiły analizę:
   - tkanek stałych, takich jak gruczoł tarczycy, wątroba, mózg, kurze embriony, jaja kurze, na zawartość MMI [**H1**],
   - osocza w celu oznaczania MMI [**H1**] i HTL [**H6**],
   - moczu pod względem obecności HTL [**H7**], LA [**H5**], tiosiarczanów [**H2**], CSH i CGSH [**H2**, **H3**], jak i sumy tioli całkowitych [**H4**].
2. Opracowanie i walidacja prostych, czułych i szybkich metod oznaczania metabolicznie spokrewnionych związków siarki oraz zawierających siarkę preparatów farmaceutycznych w w/w matrycach. Otrzymane metody to:
   - metoda oznaczania MMI w tkankach zwierzęcych [**H1**],
   - metoda oznaczania tiosiarczanów i tioli w moczu [**H2**, **H3**],
   - metoda oznaczania HTL w moczu [**H7**],
   - metoda oznaczania HTL w osoczu [**H6**],
   - metoda oznaczania LA w moczu [**H5**],
   - metoda oznaczania sumy tioli całkowitych w moczu [**H4**].
3. Aplikację opracowanych metodyk do badań klinicznych i farmakokinetycznych,
   - wyznaczenie poziomów referencyjnych tiosiarczanów w moczu [**H2**]
   - śledzenie zmian wydalania związków zawierających grupy –SH [**H2**-**H4**]
   - wykrycie nieznanej do tej pory puli HTL moczu [**H7**],
   - oznaczenie zawartości HTL w moczu i osoczu, co umożliwiło dalsze badania nad jego rolą w organizmach ssaków [**H6**, **H7**],
   - zbadanie relacji między HTL i Hcy w organizmie człowieka [**H6**, **H7**],
   - wyznaczenie stosunku formy zredukowanej do utlenionej dla głównych aminokwasów siarkowych wydalanych z moczem [**H3**],
   - śledzenie transportu międzypokoleniowego MMI [**H1**],
   - zbadanie farmakokinetyki LA [**H5**].

Bibliografia (z wyłączeniem prac będących przedmiotem postępowania habilitacyjnego)

[1] Y. Ingenbleek, H. Kimura, *Nutritional essentiality of sulfur in health and disease*. Nutr Rev. 71 (2013) 413-432.

[2] H. Jakubowski, R. Głowacki, *Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites*. Adv. Clin. Chem. 55 (2011) 81-103.

[3] A. Hulanicki, *Współczesna chemia analityczna*. 2011, PWN, Warszawa

[4] H. Jakubowski, *The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples*. Anal. Biochem. 308 (2002) 112-119.

[5] K. Kuśmierek, G. Chwatko, R. Głowacki, P. Kubalczyk, E. Bald, *Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis*. J. Chromatogr. B, 879 (2011) 1290-1307.

[6] K. Kuśmierek, 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.

[7] E. Bald, R. Głowacki, *2-Chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate as an effective and thiol specific UV-tagging reagent for liquid chromatography*. J. Liq. Chrom. Rel. Technol. 24 (2001) 1323-1339.

[8] Y. Mukai, T. Togawa, T. Suzuki, K. Ohata, S. Tanabe, *Determination of homocysteine thiolactone and homocysteine in cell cultures using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. J. Chromatogr. B, 767 (2002) 263-268.

[9] R.F. Anderson, J.E. Packer, *The radiolysis of aqueous solutions of homocysteine thiolactone*. Int. J. Radiat. Phys. Chem. 6 (1974) 33-46.

[10] V. Ravichandran, S. Shalini, K.M. Sundram, H. Rajak, *Validation of analytical methods - Strategies & importance*. Int. J. Pharmacy and Pharm. Sci. 2 (2010) 18-22.

[11] T. Toyo'oka, *Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples*. J. Chromatogr. B, 877 (2009) 3318-3330.

[12] M.P. Murphy, *Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications*. Antioxid. Redox. Signal, 16 (2012) 476-495.

[13] K. Kuśmierek, R. Głowacki, E. Bald, *Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography*. Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 855-860.

[14] A. Pastore, R. Massoud, C. Motti, A. Lo Russo, G. Gucci, C. Cortese, G. Federici, *Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopropionylglycine in plasma and urine*. Clin. Chem. 44 (1998) 825-832.

[15] I. Fermo, C. Arcelloni, R. Paroni, *High-performance liquid chromatographic method to quantify total cysteine excretion in urine*. Anal. Biochem. 307 (2002) 181-183.

[16] P. Lochman, T. Adam, D. Friedecky, E. Hlidkova, Z. Skopkova, *High-throughput capillary electrophoretic method for determination of total aminothiols in plasma and urine*. Electrophoresis, 24 (2003) 1200-1207.

[17] G. Chwatko, E. Forma, J. Wilkosz, R. Głowacki, P. Jóźwiak, W. Różański, M. Bryś, A. Krześlak, *Thiosulfate in urine as a facilitator in the diagnosis of prostate cancer for patients with prostate-specific antigen less or equal 10 ng/mL*, Clin. Chem. Lab. Med. 51 (2013) 1825-1831.

[18] M.C. Belardinelli, A. Chabli, B. Chadefaux-Vekemans, P. Kamoun. *Urinary Sulfur Compounds in Down Syndrome*. Clin. Chem. 47 (2001) 1500-1501.

[19] H. Jakubowski, *Molecular basis of homocysteine toxicity in humans*. Cell. Mol. Life Sci. 61 (2004) 470-487.

[20] H. Jakubowski, *Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis*. J. Nutr. 131 (Suppl.), (2001) 2983-2987.

[21] H. Jakubowski, *Homocysteine in Protein Structure/Function and Human Disease*. Springer 2013.

[22] S.L. Van Herck, S. Geysens, E. Bald, G. Chwatko, E. Delezie, E. Dianati, A. Ahmed, V.M. Darras, *Maternal transfer of methimazole and effects on thyroid hormone availability in embryonic tissues*. J. Endocrinol. 218 (2013) 105-115.

[23] L. Packer, E. Cadenas, *Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling*. J. Clin. Biochem. Nutr. 48 (2011) 26-32.

[24] A. Bilska, L. Włodek, *Lipoic acid – the drug of the future?* Pharmacol. Rep. 57 (2005) 570-577.

[25] K.P. Shay, R.F. Moreau, E.J. Smith, A.R. Smith, T.M. Hagen, *Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential*. Biochim. Biophys. Acta, 1790 (2009) 1149-1160.

Grazyna Chwatko