

Uniwersytet Łódzki
Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska

ROZPRAWA DOKTORSKA

***Wykorzystanie chromatografii cieczowej do oznaczania
niskocząsteczkowych związków tiolowych oraz białek obecnych w osoczu
w wybranych stanach patofizjologicznych***

*Application of liquid chromatography for the determination of low-
molecular-weight thiols and proteins present in plasma under selected
pathophysiological conditions*

mgr Katarzyna Kurpet

Praca wykonana pod kierunkiem
dr hab. Grażyny Chwatko, prof. UŁ



Przedstawiona rozprawa doktorska została częściowo zrealizowana w ramach projektu:

„Badania wpływu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 oraz szczepienia przeciwko COVID-19 na układ sercowo-naczyniowy”

Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza

Uniwersytet Łódzki

Doktoranckie Granty Badawcze

Numer grantu: 6/DGB/IDUB/2022

Kierownik grantu: mgr Katarzyna Kurpet

Opiekun naukowy: dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ

Badania wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały zrealizowane we współpracy z następującymi ośrodkami:



**UNIWERSYTECKI
SZPITAL KLINICZNY NR 2**
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi



**Wojewódzki Specjalistyczny Szpital
im. dr Wł. Biegańskiego w Łodzi**

Eksperymenty medyczne przeprowadzone w ramach współpracy z Zakładem Medycyny Rodzinnej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, Kliniką Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Kliniką Reumatologii z Pododdziałem Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 2 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi:

„Homeostaza tiolowo-disiarczkowa jako wskaźnik potencjalnych zaburzeń układu sercowo-naczyniowego w przebiegu wybranych chorób reumatycznych”

Zespół badaczy:

1. lek. med. Michał Matyjaszczyk (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, Zakład Medycyny Rodzinnej),
2. dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ (Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, Katedra Chemii Środowiska),
3. mgr Katarzyna Kurpet (Uniwersytet Łódzki, Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Wydział Chemii, Katedra Chemii Środowiska),
4. lek. med. Ewelina Kulesza (Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 2 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Klinika Reumatologii z Pododdziałem Chorób Wewnętrznych);

„Badania wpływu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 oraz szczepienia przeciwko COVID-19 na układ sercowo-naczyniowy”

Zespół badaczy:

1. lek. med. Michał Matyjaszczyk (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, Zakład Medycyny Rodzinnej),
2. dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ (Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, Katedra Chemii Środowiska),

3. mgr Katarzyna Kurpet (Uniwersytet Łódzki, Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Wydział Chemii, Katedra Chemii Środowiska),
4. lek. med. Jakub Kulesza (Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. dr Wł. Biegańskiego w Łodzi, Oddział Chorób Wewnętrznych – Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi).

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania Pani Profesor Grażynie Chwatko za jej nieocenione wsparcie, cierpliwość, wyrozumiałość i życzliwość, okazywane mi na każdym etapie mojej drogi akademickiej.

Z całego serca pragnę również podziękować mojej rodzinie, przyjaciołom, kolegom i koleżankom z pracy, a także wszystkim bliskim mi osobom, którzy poprzez swoje zaangażowanie, nieustanną motywację, cierpliwość i wsparcie przyczynili się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pracę tę dedykuję swoim dzieciom.

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	10
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	13
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	16
1. WPROWADZENIE LITERATUROWE	19
1.1 Charakterystyka związków tiolowych – właściwości, biochemia i znaczenie kliniczne.....	19
1.2 Charakterystyka wybranych białek osocza – struktura, funkcje i rola w chorobach przewlekłych	31
1.3 Reumatoidalne zapalenie stawów	38
1.4 SARS-CoV-2 i COVID-19	40
2. CEL I ZAKRES PRACY.....	43
2.1 Uzasadnienie podjętego problemu badawczego	43
2.2 Cel pracy	47
3. OPRACOWANIE METODY JEDNOCZESNEGO OZNACZANIA NISKOCZĄSTECZKOWYCH TIOLI OSOCZA OBOK ALBUMINY SUROWICY LUDZKIEJ ZA POMOCĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKcją FLUORESCENCYJNĄ Z ZASTOSOWANIEM PRZEDKOLUMNOWEJ MODYFIKACJI CHEMICZNEJ ANALITÓW MONOBROMOBIMANEM	49
3.1 Materiały i metody	49
3.1.1 Odczynniki.....	49
3.1.2 Roztwory.....	50
3.1.3 Aparatura	51
3.1.4 Warunki chromatograficzne	52
3.1.5 Materiał badany	53
3.1.6 Charakterystyka badanych grup pacjentów	53
3.1.7 Walidacja opracowanej metody chromatograficznej.....	55

3.1.8	Zastosowanie opracowanej procedury analitycznej do analizy próbek rzeczywistych.....	57
3.1.9	Analiza statystyczna	58
3.2	Wyniki i dyskusja.....	58
3.2.1	Procedura przygotowania próbek rzeczywistych do analizy chromatograficznej	59
3.2.2	Optymalizacja warunków chromatograficznych	65
3.2.3	Walidacja opracowanej metody chromatograficznej.....	67
3.2.4	Zastosowanie opracowanej metody chromatograficznej do analizy próbek osocza pochodzących od uczestników badania	75
4.	OPRACOWANIE METODY OZNACZANIA WYBRANYCH BIAŁEK W PŁYNACH USTROJOWYCH CZŁOWIEKA TECHNIKĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ W ODWRÓCONYM UKŁADZIE FAZ Z DETEKcją ROZPROSZENIA ŚWIATŁA PRZEZ ODPAROWANIE	84
4.1	Materiały i metody	86
4.1.1	Odczynniki.....	86
4.1.2	Roztwory.....	87
4.1.3	Aparatura	87
4.1.4	Warunki chromatograficzne oraz parametry detekcji.....	88
4.1.5	Materiał badany oraz charakterystyka badanych grup pacjentów	89
4.1.6	Walidacja opracowanej metody chromatograficznej.....	89
4.1.7	Zielona chemia analityczna – oceny ekologiczności etapu przygotowania próbki w procedurze analitycznej oraz opracowanej metody chromatograficznej. 95	
4.1.8	Zastosowanie opracowanych procedur analitycznych do oznaczenia wybranych białek w próbkach biologicznych	96
4.1.9	Analiza statystyczna	96
4.2	Wyniki i dyskusja.....	97
4.2.1	Etap przygotowania próbek biologicznych do analizy	98
4.2.2	Optymalizacja warunków chromatograficznych i parametrów detekcji	100

4.2.3	Walidacja metod bioanalitycznych	108
4.2.4	Zieloność metody	127
4.2.5	Zastosowanie opracowanych procedur analitycznych do oznaczenia wybranych białek w próbkach rzeczywistych	132
5.	OPRACOWANIE METODY OZNACZANIA RÓŻNYCH FORM REDOKS TIOLI TECHNIKĄ HPLC-FLD W CELU OSZACOWANIA RYZYKA WYSTĄPIENIA ZDARZEŃ SERCOWO-NACZYNIOWYCH NA SKUTEK ZAKAŻENIA WIRUSEM SARS-COV-2 I SZCZEPIENIA PRZECIWKO COVID-19 139	
5.1	Materiały i metody	139
5.1.1	Odczynniki	139
5.1.2	Roztwory	140
5.1.3	Aparatura	142
5.1.4	Warunki chromatograficzne	143
5.1.5	Materiał badany	143
5.1.6	Charakterystyka badanych grup pacjentów	144
5.1.7	Walidacja metody	146
5.1.8	Zielona chemia analityczna – oceny ekologiczności etapu przygotowania próbki w procedurze analitycznej oraz opracowanej metody chromatograficznej 153	
5.1.9	Zastosowanie metody do analizy próbek osocza pochodzących od uczestników eksperymentu badawczego	153
5.1.10	Analiza statystyczna	155
5.2	Wyniki i dyskusja	156
5.2.1	Opracowanie procedury przygotowania próbek biologicznych do analizy 156	
5.2.2	Optymalizacja warunków chromatograficznych	175
5.2.3	Walidacja metody	176
5.2.4	Zieloność metody	191

5.2.5	Zastosowanie metody do analizy próbek rzeczywistych	194
6.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE	213
	DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA I ORGANIZACYJNA	219
	BIBLIOGRAFIA	230

WYKAZ SKRÓTÓW

2-ME	2-merkaptoetanol
ABD-F	4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol
ACN	acetonitryl
ACPA	przeciwciała przeciwko cytrulinowanemu białku
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BAL	dimerkaprol, British anti-Lewisite
BOF	białka ostrej fazy
CRP	białko C-reaktywne
Cys	cysteina
Cys-Cys	cystyna
Cys-Gly	L-cysteinylo-L-glicyna
DAD	detektor z matrycą diodową
DBD-F	4-(N,N-dimetyloaminosulfonylo)-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol
DMSO	dimetylosulfotlenek
DTE	ditioerytrytol
DTT	ditiotreitol
EDTA-Na₂	sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
ELSD	detektor rozpraszania światła przez odparowanie
FDA	Agencja ds. żywności i leków
Fg	fibrynogen
FLD	detektor fluorescencyjny
Glu	kwas glutaminowy
Gly	glicyna
GSH	glutation zredukowany
GSSG	glutation utleniony
Hcy	homocysteina
Hcy-Hcy	homocystyna
Hgb	hemoglobina
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSA	albumina surowicy ludzkiej
ICH	Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi

IEC	chromatografia jonowymienna
IL	interleukina
Ins	insulina
IQR	zakres kwartyłowy
k'	względny współczynnik retencji
LOD	granica wykrywalności
LOQ	granica oznaczalności
Mb	mioglobina
mBBr	monobromobiman
Me	mediana
MeOH	metanol
Met	metionina
N	liczba pól teoretycznych
NAC	N-acetylo-L-cysteina
NADPH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B
Nrf2	jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem
POChP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
PTM	modyfikacje potranslacyjne
Q	kwartyl
QCs	próbki kontroli jakości
R²	współczynnik determinacji
RNS	reaktywne formy azotu
ROS	reaktywne formy tlenu
RP	układ faz odwróconych
R_s	rozdzielczość
RSD	względne odchylenie standardowe
RZS	reumatoidalne zapalenie stawów
SARS-CoV-2	drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego
SBD-F	4-sulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol
SD	odchylenie standardowe
SEC	chromatografia wykluczania
Ser	seryna

SLM	standardowy litr na minutę
SST	test zgodności
TCEP	chlorowodorek tris(2-karboksyetylo)fosiny
Tf	transferryna
T_f	współczynnik ogonowania
TFA	kwask trifluorooctowy
TfR1	receptor transferryny
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu beta
THP	tris(hydroksypropylo)fosfina
TNF-α	czynnik martwicy nowotworu alfa
TPP	trifenylofosfina
t_r	całkowity czas retencji
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan
Trx	tiodoksyna
ULOQ	standard kalibracyjny o najwyższym stężeniu z zakresu krzywej kalibracyjnej
UV-Vis	detektor spektrofotometryczny
α-LA	kwask α-liponowy
γ-Glu-Cys	γ-L-glutamyl-L-cysteina

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Choroby sercowo-naczyniowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie, a ich rozwój jest silnie powiązany z procesami zapalnymi i stresem oksydacyjnym, które odgrywają kluczową rolę w patogenezie wielu innych schorzeń, w tym o podłożu autoimmunologicznym oraz zakaźnym. W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się poszukiwaniu nowych biomarkerów, które mogłyby służyć jako potencjalne wskaźniki ryzyka sercowo-naczyniowego w przebiegu wielu chorób. Szczególne znaczenie w tym kontekście ma homocysteina – związek tiolowy o udowodnionym działaniu aterogennym. Aminokwas ten wpływa na dysfunkcję śródbłonna, przyczyniając się do powstawania stanów zapalnych i zwiększonego stresu oksydacyjnego, co sprzyja rozwojowi miażdżycy oraz innych zaburzeń naczyniowych. W świetle powyższych rozważań, precyzyjne oznaczanie stężenia homocysteiny w osoczu, w połączeniu z kompleksowym monitorowaniem metabolicznie spokrewnionych związków siarki, stanowi fundament wczesnej diagnostyki oraz skutecznej profilaktyki chorób sercowo-naczyniowych. Innymi markerami mogącymi odzwierciedlać procesy patologiczne związane z uszkodzeniami naczyń i mięśnia sercowego są niektóre białka osocza, w tym białka ostrej fazy, które dostarczają ponadto istotnych informacji na temat odpowiedzi organizmu na stany zapalne oraz stres oksydacyjny. Ocena profilu biochemicznego płynów ustrojowych, obejmująca oznaczenie takich markerów jak fibrynogen, hemoglobina, mioglobina, albumina czy transferyna, umożliwia wykrycie subtelnych zmian wskazujących na nieprawidłowości w obrębie układu sercowo-naczyniowego. Nowoczesne metody analityczne, takie jak wysokosprawną chromatografię cieczową, umożliwiają dokładne i szybkie oznaczanie tych związków, co pozwala na ocenę ryzyka wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych oraz monitorowanie skuteczności interwencji terapeutycznych.

Niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na opracowaniu i walidacji trzech, niezależnych metod bioanalitycznych, opartych na chromatografii cieczowej, dedykowanych do ilościowego oznaczania niskocząsteczkowych związków tiolowych oraz wybranych białek w próbkach biologicznych. Szczególna uwaga została poświęcona zagadnieniom patofizjologicznym, w tym roli procesów zapalnych i stresu oksydacyjnego, które są kluczowe dla rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. W pracy szczegółowo omówiono właściwości związków tiolowych oraz białek osocza, co stanowiło punkt wyjścia do identyfikacji ich roli w patogenezie chorób przewlekłych,

takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, a także w kontekście zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i związanych z nimi zdarzeń sercowo-naczyniowych. Przeprowadzone badania polegały na monitorowaniu przemian biochemicznych związanych z homeostazą tiolowo-disiarczkową oraz reakcją immunologiczną organizmu, ze szczególnym uwzględnieniem istotnych zależności między poziomami analizowanych markerów a ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych.

Rozprawa rozpoczyna się od gruntownego przeglądu aktualnego stanu wiedzy, w którym szczegółowo omówiono właściwości związków tiolowych, ich biochemię oraz znaczenie kliniczne. Scharakteryzowano również wybrane białka osocza, koncentrując się na ich strukturze, funkcjach i roli w patogenezie chorób przewlekłych. Poruszono także zagadnienia związane z wybranymi stanami patofizjologicznymi, w tym reumatoidalnym zapaleniem stawów oraz kwestiach związanych z epidemiologią SARS-CoV-2. Przegląd literatury stanowi solidne teoretyczne uzasadnienie problematyki badawczej, podkreślając potrzebę opracowania szybkich i precyzyjnych metod oznaczania markerów biochemicznych, które mogą służyć do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego. W kolejnej części pracy określono cel badań, którym było stworzenie dokładnych i precyzyjnych metod chromatograficznych umożliwiających jednoczesne oznaczanie:

- sześciu niskocząsteczkowych tioli osocza, w tym cysteiny, homocysteiny, cysteinyloglicyny, glutationu, kwasu α -liponowego, N-acetylo-L-cysteiny oraz albuminy surowicy ludzkiej, z wykorzystaniem przedkolumnowej modyfikacji chemicznej analitów za pomocą monobromobimanu i detekcji fluorescencyjnej,
- wybranych analitów białkowych, w tym albuminy, insuliny, fibrynogenu, transferryny, mioglobiny oraz hemoglobiny, w płynach ustrojowych człowieka, przy użyciu detekcji rozpraszania światła przez odparowanie,
- różnych form redoks pięciu kluczowych związków tiolowych, w tym homocysteiny, cysteiny, glutationu, cysteinyloglicyny oraz γ -glutamyl-cysteiny, po derywatyzacji za pomocą 4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolu i z wykorzystaniem detekcji fluorescencyjnej.

W części metodologicznej szczegółowo opisano użyte odczynniki, roztwory, aparaturę, warunki chromatograficzne, a także charakterystykę badanych grup pacjentów, walidację metody oraz analizę statystyczną wyników. Podkreślono również znaczenie wdrożenia zasad zielonej chemii analitycznej, co przekłada się na zmniejszenie wpływu metod

badawczych na środowisko. W części podsumowującej wyszczególniono kluczowe wnioski badawcze. Wyniki badań potwierdzają użyteczność opracowanych metod chromatograficznych w analizie klinicznej, umożliwiając równocześnie ich zastosowanie w różnych dziedzinach nauki i medycyny, zwłaszcza w diagnostyce chorób przewlekłych, badaniach nad stresem oksydacyjnym oraz w ocenie nowych strategii terapeutycznych. Ich precyzja i zdolność do jednoczesnej analizy wielu biomarkerów czynią je obiecującym narzędziem zarówno w badaniach klinicznych, jak i w szeroko pojętej biologii medycznej.

Rozprawa wykazuje interdyscyplinarną wartość, łącząc zagadnienia z obszaru chemii analitycznej, biochemii oraz medycyny. Przeprowadzone badania nie tylko poszerzają wiedzę na temat roli związków tiolowych i białek osocza w kontekście chorób przewlekłych i infekcji wirusowych, ale dają także podstawy do wdrożenia nowych, ekologicznych procedur laboratoryjnych, które mogą znaleźć zastosowanie w rutynowych badaniach diagnostycznych oraz w monitorowaniu skuteczności leczenia i profilaktyki chorób sercowo-naczyniowych. Niniejsza praca doktorska wnosi istotny wkład w rozwój metod analitycznych, łącząc nowoczesne podejście technologiczne z aktualnymi potrzebami wynikającymi z globalnych wyzwań zdrowotnych.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Cardiovascular diseases represent one of the leading causes of mortality worldwide, with their progression being strongly associated with inflammatory processes and oxidative stress. These factors play a crucial role in the pathogenesis of various other disorders, including autoimmune and infectious diseases. In recent years, increasing attention has been devoted to identifying novel biomarkers that could serve as potential indicators of cardiovascular risk across multiple diseases. A particularly significant biomarker in this context is homocysteine, a thiol-containing compound with proven atherogenic effects. This amino acid contributes to endothelial dysfunction, promoting inflammation and elevating oxidative stress, which facilitates the development of atherosclerosis and other vascular disorders. Given these considerations, precise determination of plasma homocysteine concentration, combined with comprehensive monitoring of metabolically related sulfur compounds, serves as a foundation for early diagnosis and effective prevention of cardiovascular diseases. Additional markers reflecting pathological processes associated with vascular and myocardial damage include specific plasma proteins, particularly acute-phase proteins, which provide critical insights into the body's response to inflammation and oxidative stress. The biochemical profiling of bodily fluids, including the assessment of markers such as fibrinogen, hemoglobin, myoglobin, albumin, and transferrin, enables the detection of subtle changes indicating abnormalities within the cardiovascular system. Advanced analytical methods, such as high-performance liquid chromatography, facilitate accurate and rapid quantification of these compounds, thereby allowing for cardiovascular risk assessment and the monitoring of therapeutic interventions.

This doctoral dissertation focuses on the development and validation of three independent bioanalytical methods based on liquid chromatography, dedicated to the quantitative determination of low-molecular-weight thiol compounds and selected proteins in biological samples. Special attention is given to pathophysiological aspects, particularly the role of inflammatory processes and oxidative stress, which are key contributors to cardiovascular disease progression. The study provides a detailed discussion of the properties of thiol compounds and plasma proteins, serving as a basis for identifying their roles in the pathogenesis of chronic diseases, such as rheumatoid arthritis, as well as in the context of SARS-CoV-2 infection and related cardiovascular events. The conducted research involved monitoring biochemical transformations

associated with thiol-disulfide homeostasis and the immune response, with a particular focus on significant correlations between analyzed marker levels and cardiovascular complication risk.

The dissertation begins with a comprehensive review of the current state of knowledge, thoroughly discussing the properties, biochemistry, and clinical significance of thiol compounds. Selected plasma proteins are also characterized, with an emphasis on their structure, function, and role in the pathogenesis of chronic diseases. Additionally, pathophysiological conditions such as rheumatoid arthritis and the epidemiology of SARS-CoV-2 are addressed. The literature review provides a strong theoretical foundation for the research problem, highlighting the need for rapid and precise biochemical marker quantification methods that could aid cardiovascular risk assessment. In the subsequent section, the research objectives are defined, focusing on the development of accurate and precise chromatographic methods for the simultaneous quantification of:

- six low-molecular-weight plasma thiols, including cysteine, homocysteine, cysteinylglycine, glutathione, α -lipoic acid, N-acetyl-L-cysteine, and human serum albumin, using pre-column chemical modification of analytes with monobromobimane and fluorescence detection,
- selected protein analytes, including albumin, insulin, fibrinogen, transferrin, myoglobin, and hemoglobin in human bodily fluids, utilizing evaporative light scattering detection,
- different redox forms of five key thiol compounds, namely homocysteine, cysteine, glutathione, cysteinylglycine, and γ -glutamyl-L-cysteine, following derivatization with 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole and fluorescence detection.

The methodological section provides a detailed description of the reagents, solutions, apparatus, chromatographic conditions, characteristics of patient groups, method validation, and statistical analysis of results. The dissertation also emphasizes the importance of implementing green analytical chemistry principles to minimize the environmental impact of research methodologies. The concluding section outlines key research findings. The results confirm the utility of the developed chromatographic methods in clinical analysis, allowing their application across various scientific and medical fields, particularly in the diagnosis of chronic diseases, oxidative stress research, and the evaluation of new therapeutic strategies. Their precision and ability to

simultaneously analyze multiple biomarkers make them promising tools for both clinical studies and broader biomedical research.

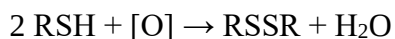
This dissertation demonstrates interdisciplinary value by integrating analytical chemistry, biochemistry, and medicine. The conducted research not only expands knowledge on the role of thiol compounds and plasma proteins in chronic diseases and viral infections but also provides a basis for implementing new, environmentally friendly laboratory procedures that could be utilized in routine diagnostic testing and in monitoring the effectiveness of cardiovascular disease treatment and prevention. This doctoral dissertation makes a significant contribution to the advancement of analytical methodologies, combining modern technological approaches with current global health challenges.

1. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1.1 Charakterystyka związków tiolowych – właściwości, biochemia i znaczenie kliniczne

Związki tiolowe, znane również jako merkaptany, to związki siarkoorganiczne zawierające w swojej strukturze silnie nukleofilową i łatwo ulegającą utlenieniu grupę sulfhydrylową ($-SH$), przyłączoną do atomu węgla ^[1]. Ogólny wzór tioli to $R-SH$, gdzie „R” oznacza grupę alkilową lub aryłową. Związki te strukturalnie przypominają alkohole, jednakże ze względu na unikalne właściwości siarki, wykazują odmienne właściwości fizyko-chemiczne. Ponieważ siarka jest cięższa od tlenu, tiole mają większą masę cząsteczkową niż analogiczne alkohole i jednocześnie charakteryzują się nieco wyższą gęstością, choć nadal wartości te pozostają zbliżone do gęstości wody ^[2]. Większy promień atomowy atomu siarki w porównaniu z tlenem skutkuje dłuższą długością wiązania węgiel-siarka ($C-S$) oraz zwiększoną kwasowością, a mniejsza różnica elektroujemności między siarką a wodorem sprawia, że grupa tiolowa wykazuje mniejszą polaryzację i tym samym tworzy słabsze wiązania wodorowe w porównaniu z alkoholami, co prowadzi do niższych temperatur wrzenia i rozpuszczalności w wodzie ^[3,4]. Ta ostatnia maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowodorowego na skutek dominacji oddziaływań hydrofobowych ^[5]. Ponadto tiole mają tendencję do posiadania wyższych współczynników załamania światła niż odpowiadające im alkohole, głównie ze względu na obecność większego atomu siarki, który zwiększa polaryzowalność cząsteczki i wpływa na sposób jej oddziaływania ze światłem ^[5]. Związki tiolowe, szczególnie te o niskiej masie cząsteczkowej charakteryzują się silnym, często nieprzyjemnym i odpychającym zapachem ^[6]. Z tego powodu tiole często pełnią rolę substancji zapachowych dodawanych do bezwonnego gazu ziemnego w celu wykrycia wycieku. Ze względu na wysoką lotność i silne powinowactwo do receptorów węchowych, związki te są wykrywalne przez ludzki nos nawet w niewielkich stężeniach. Kwasowość grupy sulfhydrylowej ($pK_a \approx 8,3$) sprawia, że w warunkach fizjologicznych występuje ona głównie w formie protonowanej, chociaż znaczna część może deprotonować, tworząc aniony tiolanowe ($R-S^-$), które są bardziej reaktywne ^[7]. Lepsza stabilizacja ładunku ujemnego na sprzężonej zasadzie $R-S^-$ w porównaniu z tlenem w alkoholach powoduje, że tiolany mogą być łatwo tworzone poprzez deprotonowanie tioli zasadami, takimi jak na przykład wodorotlenek sodu. Zarówno niższa elektroujemność siarki, jak i większy rozmiar atomu sprawiają, że w reakcjach substytucji

nukleofilowej tiole są silnymi nukleofilami, często bardziej reaktywnymi niż związki z grupy alkoholi. Właściwości te są powodem, dla którego tiole łatwo ulegają reakcji S-alkilacji, tworząc tioetery ($R-S-R'$). Z łatwością ulegają także utlenieniu, tworząc disulfidy ($R-S-S-R$) poprzez dwuelektronowy proces utleniania ^[8]. Reakcja ta jest kluczowa w chemii białek, gdzie reszty cysteinowe tworzą wiązania disiarczkowe, stabilizując ich struktury trzeciorzędowe i czwartorzędowe, co zapewnia prawidłową konformację wielu enzymów i receptorów. Ogólną reakcję można przedstawić jako:



Środki utleniające, takie jak nadtlenek wodoru (H_2O_2), jod (I_2) i jony żelaza (Fe^{3+}) sprzyjają utlenianiu tiolu ^[8]. Dalsze utlenianie może prowadzić do powstawania kwasu sulfenowego ($R-SOH$), kwasu sulfinowego ($R-SO_2H$) lub kwasu sulfonowego ($R-SO_3H$), w zależności od rodzaju zastosowanego środka utleniającego oraz warunków reakcji ^[9]. Disulfidy można zredukować z powrotem do tioli w warunkach redukujących, stosując odczynniki takie jak ditiotreitól (DTT), tris(2-karboksyetylo)fosfina (TCEP) lub wodór z katalizatorem:



Ten odwracalny proces odgrywa kluczową rolę w układach biologicznych, szczególnie w przypadku enzymów, takich jak tioredoksyna (Trx) i reduktaza glutationu, które regulują wewnątrzkomórkową równowagę redoks ^[10].

Ze względu na unikalne właściwości fizyko-chemiczne, tiole mogą uczestniczyć w wielu procesach biologicznych, w tym brać udział w reakcjach redoks, działać jako przeciwutleniacze i regulować różne funkcje komórkowe ^[7]. Zrozumienie biochemii tioli pozwala poznać ich podstawowe funkcje w zdrowiu i chorobie. Jak już wspomniano, tworzenie wiązań disiarczkowych między resztami cysteiny (Cys) stabilizuje struktury białek, zapewniając prawidłowe fałdowanie i funkcje. Wiązania te są szczególnie kluczowe w białkach pozakomórkowych, ponieważ zapewniają integralność strukturalną i odporność na degradację ^[11]. W procesach enzymatycznych tiole odgrywają istotną rolę katalityczną. Wiele enzymów, w tym proteazy cysteinowe i oksydoreduktazy, wykorzystuje grupy tiolowe w swoich miejscach aktywnych do mediacji reakcji biochemicznych. Na przykład Trx, małe białko zawierające wysoce konserwatywny motyw Cys, ułatwia redukcję wiązań disiarczkowych w białkach docelowych, wpływając

na różne procesy komórkowe, w tym syntezę i naprawę DNA ^[12]. Tiole odgrywają kluczową rolę w homeostazie redoks i obronie antyoksydacyjnej. Związki te działają jako czynniki redukujące, przekazując elektrony w celu neutralizacji reaktywnych form tlenu (ROS) i reaktywnych form azotu (RNS), które mogą powodować uszkodzenia komórkowe. Glutation (GSH), tripeptyd złożony z kwasu glutaminowego (Glu), Cys i glicyny (Gly), jest najobficiej występującym tiolem w komórkach ^[13]. Występuje zarówno w formie zredukowanej (GSH), jak i utlenionej (GSSG), a stosunek GSH/GSSG jest kluczowym wskaźnikiem stanu oksydacyjnego komórki mającym istotne znaczenie dla utrzymania jej funkcji życiowych. GSH neutralizuje ROS poprzez oddawanie elektronów, przekształcając się tym samym w disiarczek, który następnie jest redukowany z powrotem do GSH przez enzym reduktazę glutationu, co pozwala na utrzymanie w ten sposób zdolności antyoksydacyjnej komórki ^[13–15]. Szlak Trx/reduktazy tioredoksyny jest kolejnym krytycznym układem regulującym homeostazę redoks. Trx redukuje wiązania disiarczkowe w białkach, chroniąc w ten sposób przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i modulując niektóre szlaki sygnałowe ^[16]. Grupy tiolowe w wybranych czynnikach transkrypcyjnych, takich jak jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (Nrf2), są kluczowe dla regulacji ekspresji genów zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną. Aktywowany pod wpływem stresu oksydacyjnego Nrf2 zwiększa ekspresję enzymów antyoksydacyjnych i syntezę GSH. Ponadto tiole wpływają na aktywność białka p53, regulując przeżycie komórek i apoptozę w warunkach utleniania. Tiole mogą modulować także aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB), który moduluje stan zapalny i odpowiedź immunologiczną w reakcji na stres oksydacyjny. Związki tiolowe są niezbędne do neutralizacji stresu oksydacyjnego, który powstaje w wyniku braku równowagi między produkcją ROS a zdolnością antyoksydacyjną. ROS, takie jak anion nadadtlenkowy (O_2^-), nadtlenek wodoru (H_2O_2) i rodniki hydroksylowe ($OH^\bullet$), mogą uszkadzać lipidy, białka i DNA ^[17,18]. Istnieje również wiele enzymów zależnych od tiolu, które przyczyniają się do obrony antyoksydacyjnej. Dla przykładu peroksydaza glutationowa katalizuje redukcję H_2O_2 i nadttlenków lipidowych, wykorzystując GSH jako kofaktor. Z kolei peroksyredoksyny redukują nadttlenki i działają jako regulatory sygnalizacyjne w szlakach redoks, a sulfiredoksyna naprawia nadmiernie utlenione peroksyredoksyny, utrzymując ich funkcję antyoksydacyjną. Oprócz swoich strukturalnych i antyoksydacyjnych ról, tiole biorą udział w różnych szlakach metabolicznych ^[19–23]. Tioestry, takie jak acetylokoenzym A, są kluczowymi pośrednikami w biosyntezie

i degradacji kwasów tłuszczowych oraz innych niezbędnych biocząsteczek. W sygnalizacji komórkowej odwracalne utlenianie tioli białkowych może modulować szlaki przekazywania sygnału, wpływając na procesy, takie jak wzrost komórek i apoptoza. Grupy tiolowe podlegają różnym modyfikacjom potranslacyjnym (PTM), które wpływają na funkcję białka [24]. S-glutationylacja, S-nitrozylacja i S-palmitoylacja to niektóre PTM, które regulują aktywność, lokalizację i interakcje białek. Na przykład S-nitrozylacja moduluje ścieżki przekazywania sygnału poprzez odwracalną modyfikację reszt Cys w białkach docelowych, wpływając na funkcje układu sercowo-naczyniowego i odpornościowego. Ponadto tiole mają wysokie powinowactwo do jonów metali i odgrywają rolę w ich homeostazie w komórkach. Mogą koordynować jony metali w białkach i metaloenzymach, wpływając na ich aktywność katalityczną i właściwości strukturalne, co jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania różnych metaloprotein [25].

Ze względu na szerokie spektrum biologicznej aktywności, tiole są powszechnie stosowane w leczeniu różnych chorób, formulacjach leków i interwencjach terapeutycznych [26]. Są szczególnie istotne w warunkach, w których stres oksydacyjny, toksyczność metali ciężkich i zaburzenia równowagi redoks przyczyniają się do postępu choroby. Ich zdolność do neutralizowania wolnych rodników, modulowania aktywności enzymatycznej i regulowania szlaków sygnałowych sprawia, że są cenne w medycynie, pełniąc rolę przeciwutleniaczy, środków detoksykujących i cząsteczek terapeutycznych w przebiegu wielu schorzeń [27]. Wiele leków zawierających tiole, jak i naturalnie występujących związków tiolowych jest stosowanych w leczeniu i zapobieganiu, takim schorzeniom jak choroby układu krążenia, zaburzenia neurodegeneracyjne czy nowotwory. Jednym z najpowszechniej stosowanych związków tiolowych w terapii jest N-acetylocysteina (NAC), prekursor GSH. Badania kliniczne dowodzą, że stosowanie NAC jest uznanym sposobem leczenia przedawkowania acetaminofenu (paracetamolu), skutecznie zapobiegającym niewydolności wątroby. Oprócz roli w detoksykacji, NAC jest stosowana w chorobach układu oddechowego, takich jak przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) i mukowiscydoza. Jej właściwości mukolityczne pomagają rozkładać śluz w drogach oddechowych, poprawiając funkcję płuc i zmniejszając stan zapalny [28]. Ponadto przebadano NAC pod kątem jej neuroprotektoryjnego działania w takich zaburzeniach jak choroba Parkinsona i Alzheimer, w których stres oksydacyjny przyczynia się do uszkodzenia neuronów [29]. W leczeniu zatrucia metalami ciężkimi związki zawierające grupę tiolową działają jako środki chelatujące, które wiążą się

z toksycznymi metalami, ułatwiając ich wydalanie ^[30]. Dimerkaprol (British anti-Lewisite, BAL), pierwotnie wynaleziony jako antidotum na luizyt – bojowy środek trujący, używany jest obecnie w leczeniu zatruc rtęcią, arsenem czy ołowiem. Stosowany jest również w przypadku choroby Wilsona, schorzeniu spowodowanym nadmierną akumulacją miedzi. W leczeniu tej jednostki zastosowanie znalazła także D-penicylamina. Związek ten ma również zastosowanie w leczeniu cystynurii – stanu, który prowadzi do tworzenia się kamieni nerkowych z powodu gromadzenia się cystyny (Cys-Cys). Ze względu na wąski indeks terapeutyczny BAL, w przypadku zatrucia ołowiem, szczególnie u dzieci, zaleca się stosowanie innych chelatorów zawierających grupy tiolowe, takich jak kwas dimerkaptobursztynowy i kwas dimerkaptopropanosulfonowy, które oferują lepsze profile bezpieczeństwa. Tiole są niezwykle istotne w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych ^[27]. Przykładem może być kaptopril, lek z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny, hamujący wytwarzanie angiotensyny II, co prowadzi do skutecznego rozszerzenia naczyń krwionośnych i obniżenia ciśnienia krwi. Lek ten jest powszechnie przepisywany w przypadku nadciśnienia, niewydolności serca i nefropatii cukrzycowej. Badania sugerują ponadto, że NAC także może obniżyć ryzyko miażdżycy poprzez zapobieganie peroksydacji lipidów i zmniejszanie stanu zapalnego w naczyniach krwionośnych. Rola tioli w terapii nowotworowej zyskuje na znaczeniu ze względu na ich udział w homeostazie redoks i sygnalizacji komórkowej. Leki, takie jak 6-merkaptopuryna i azatiopryna, są stosowane w leczeniu białaczki i chorobach autoimmunologicznych. Związki te działają jako analogi puryn, zakłócając syntezę DNA i hamując proliferację szybko dzielących się komórek. Badano również NAC pod kątem jej potencjału zapobiegania progresji raka poprzez redukcję uszkodzeń oksydacyjnych DNA i zwiększenie skuteczności chemioterapii ^[31]. W chorobach zapalnych i autoimmunologicznych tiole przyczyniają się do modulacji odpowiedzi immunologicznej i zmniejszania uszkodzeń oksydacyjnych ^[28]. D-penicylamina jest stosowana jako lek modyfikujący przebieg choroby w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS), przyczyniając się do zmniejszenia stanu zapalnego i zapobiegając uszkodzeniom stawów. W chorobach płuc, takich jak przewlekłe zapalenie oskrzeli i POChP, terapie oparte na związkach tiolowych pomagają łagodzić stan zapalny i poprawiać funkcję układu oddechowego.

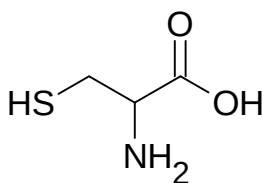
Oprócz zastosowań terapeutycznych, tiole stały się również istotnymi biomarkerami w chemii klinicznej ^[26]. Ich zdolność do odzwierciedlania poziomów stresu oksydacyjnego, uszkodzeń komórkowych i zaburzeń metabolicznych sprawia, że

są cenne w diagnozowaniu i monitorowaniu różnych chorób. Zmiany w równowadze tiolowo-disiarczkowej zostały powiązane z chorobami neurodegeneracyjnymi, rakiem, zaburzeniami układu sercowo-naczyniowego i innymi stanami patologicznymi. Ocena poziomu tioli w próbkach biologicznych dostarcza cennych informacji na temat postępu choroby, jej nasilenia i odpowiedzi na leczenie [27]. W chorobach neurodegeneracyjnych tiole są ściśle związane ze stresem oksydacyjnym i przeżyciem neuronów. GSH służy jako kluczowy przeciwutleniacz chroniący neurony przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Obniżone poziomy GSH obserwowano w chorobie Alzheimera, Parkinsona i stwardnieniu zanikowym bocznym [32]. W onkologii tiole mogą pełnić funkcję biomarkerów, umożliwiając ocenę metabolizmu komórek nowotworowych oraz mechanizmów lekooporności [27]. Podwyższone poziomy Trx i GSH wykryto w różnych nowotworach, takich jak rak piersi, płuc i jelita grubego, a wzrost ich poziomu był związany ze zwiększoną agresywnością guza i złym rokowaniem [33]. Pomiary poziomów tioli w materiale biologicznym pochodzącym od pacjentów mogą dostarczyć informacji na temat odpowiedzi na chemioterapię, ponieważ wysokie stężenia tych związków powodują zmniejszoną skuteczność niektórych leków przeciwnowotworowych [34]. W chorobach układu krążenia związki tiolowe, szczególnie homocysteina (Hcy), stanowią ważne biomarkery pozwalające na ocenę kondycji naczyń krwionośnych [35]. Podwyższony poziom Hcy, stan znany jako hiperhomocysteinemia, jest ściśle powiązany z dysfunkcją śródbłona, stresem oksydacyjnym, a także zwiększonym ryzykiem miażdżycy, udaru i choroby tętnic wieńcowych. Hcy sprzyja uszkodzeniom oksydacyjnym poprzez zmniejszenie biodostępności tlenu azotu, krytycznej cząsteczki dla zdrowia naczyń krwionośnych, co prowadzi do stanu zapalnego i zakrzepicy. Monitorowanie poziomu Hcy w osoczu jest szeroko stosowane w celu oceny ryzyka sercowo-naczyniowego i ukierunkowania interwencji terapeutycznych mających na celu zmniejszenie stresu oksydacyjnego i poprawę funkcji śródbłona. Zmiany w metabolizmie tioli są także powiązane z chorobami autoimmunologicznymi, cukrzycą i przewlekłymi chorobami zapalnymi [36]. W RZS i toczeniu rumieniowatym układowym zaburzenia homeostazy tiol/disiarczek korelują z ciężkością choroby i obecnością stanu zapalnego. Spadek stężenia tioli w osoczu z jednoczesnym wzrostem poziomu ich utlenionych form wskazują na zwiększony stres oksydacyjny w tych stanach. Pomiar poziomów różnych form redoks tioli dostarcza zatem ważnych informacji diagnostycznych i prognostycznych, pomagając lekarzom dostosowywać strategie terapeutyczne i monitorować postęp wielu chorób. Dalsze badania nad związkami

tiolowymi mogącymi pełnić funkcję markerów biologicznych dają nadzieję na poprawę wczesnego wykrywania chorób, dokładną ocenę skuteczności leczenia i opracowanie spersonalizowanych terapii celowanych.

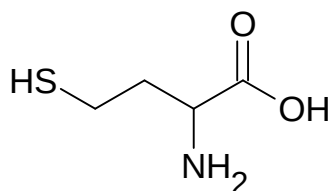
Niniejsza praca doktorska koncentruje się na analizie kilku kluczowych związków tiolowych w próbkach biologicznych, ze względu na ich centralną rolę w regulacji redoks, obronie antyoksydacyjnej i sygnalizacji komórkowej. Badane stany patologiczne charakteryzują się silnym stresem oksydacyjnym oraz występowaniem stanu zapalnego, w którym homeostaza tiolowo-disiarczkowa odgrywa kluczową rolę. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę wybranych analitów tiolowych.

Cys jest najprostszym aminokwasem siarkowym z grupy endogennych aminokwasów proteinogennych o wzorze sumarycznym $C_3H_7NO_2S$, charakteryzującym się obecnością grupy tiolowej [37–40]. Wzór strukturalny cząsteczki przedstawiono na Rysunku 1. Tiolowy łańcuch boczny w cząsteczce aminokwasu decyduje o jego właściwościach chemicznych i biologicznych. Cys może ulegać utlenieniu do Cys-Cys, dimeru, w którym dwa aminokwasy połączone są wiązaniem disulfidowym (–S–S–). Tworzenie mostków disiarczkowych jest kluczowym procesem w stabilizacji struktury trzecio- i czwartorzędowej białek, co jest szczególnie istotne w przypadku enzymów, przeciwciał czy białek strukturalnych. Przykładem białka bogatego w Cys jest keratyna, obecna w skórze, paznokciach i włosach. Organizm człowieka może syntetyzować Cys, o ile dostępna jest odpowiednia ilość innego aminokwasu siarkowego – metioniny (Met). Aminokwas ten powstaje wówczas w reakcji transsulfurylacji siarki z Met na serynę z udziałem cząsteczki adenozy-5'-trifosforanu (ATP). W przypadku stosowania diety bogatej w Met, Cys przestaje być aminokwasem niezbędnym. Cys jest prekursorem GSH, a ponadto uczestniczy w syntezie koenzymu A, tauryny oraz innych związków siarki, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek. Aminokwas ten można znaleźć przede wszystkim w produktach wysokobiałkowych, takich jak jaja, drób, wołowina, produkty pełnoziarniste, mleko i jego przetwory, a także w niektórych roślinach strączkowych.



Rysunek 1. Wzór chemiczny cysteiny

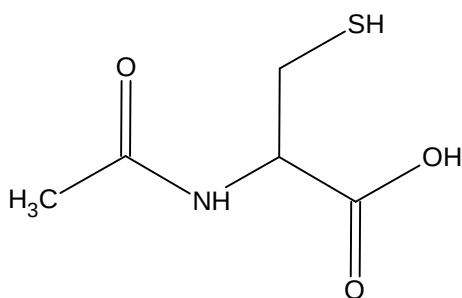
Hcy jest niebiałkotwórczym aminokwasem siarkowym odgrywającym kluczową rolę w cyklu metioninowym ^[41–44]. Pod względem budowy jest strukturalnie podobna do Cys, lecz różni się obecnością dodatkowej grupy metylenowej (–CH₂–) w łańcuchu bocznym (Rysunek 2). Jej wzór sumaryczny to C₄H₉NO₂S. Obecność grupy –SH sprawia, że Hcy bierze udział w tworzeniu wiązań disiarczkowych, jak również ulega utlenieniu prowadząc do powstania dimerycznej homocystyny (Hcy-Hcy). Może także cyklizować tworząc tiolakton homocysteiny. W organizmie człowieka może być przekształcana w Cys w szlaku transsulfurylacji lub remetylowana do Met w obecności kofaktorów enzymatycznych, tj. witamin B₆, B₉ (kwasu foliowego) oraz B₁₂. Podwyższony poziom Hcy w osoczu krwi pobranej na czczo powyżej 15 nmol/ml (hiperhomocysteinemia) jest uznawany za czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, takich jak miażdżycy, nadciśnienie czy zakrzepica ^[45–47]. Nadmierne nagromadzenie Hcy prowadzi do stresu oksydacyjnego, uszkodzenia śródbłonna naczyń oraz stymulacji procesów zapalnych, co zwiększa ryzyko powikłań ze strony układu krążenia. Do wzrostu stężenia Hcy w organizmie na skutek zaburzeń jej metabolizmu może dochodzić w przypadku niedoboru witamin z grupy B. Aminokwas ten nie występuje w żywności, ale jego prekursorem jest Met, obecna w produktach bogatych w białko jak jaja, mleko czy mięso.



Rysunek 2. Wzór chemiczny homocysteiny

NAC jest acetylowaną pochodną Cys, która wykazuje wysoką biodostępność i szerokie zastosowanie w medycynie ^[41–44]. Strukturalnie różni się od Cys obecnością dodatkowej grupy acetylowej (–COCH₃) przy atomie azotu grupy aminowej, co zwiększa jej stabilność i rozpuszczalność w wodzie (Rysunek 3). Wzór sumaryczny NAC to C₅H₉NO₄S. Po podaniu doustnym NAC łatwo ulega przekształceniu w Cys, która następnie uczestniczy w syntezie GSH. Dzięki temu NAC działa ochronnie na komórki, zwłaszcza w warunkach zwiększonego stresu oksydacyjnego, np. w chorobach neurodegeneracyjnych czy przewlekłych stanach zapalnych. NAC znajduje zastosowanie jako lek mukolityczny w leczeniu chorób układu oddechowego, takich jak POChP, mukowiscydoza czy zapalenie oskrzeli. Mechanizm działania leku oparty jest na rozrywaniu wiązań disiarczkowych w polipeptydach śluzu, co zmniejsza lepkość wydzieliny i ułatwia odkaszuszanie. NAC jest także stosowana jako antidotum

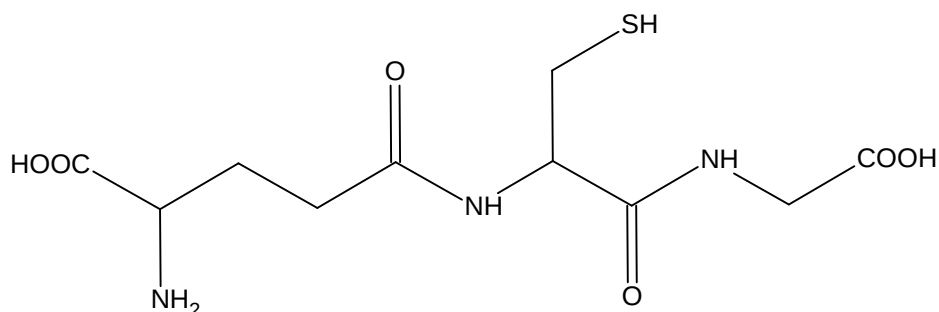
w zatruciach paracetamolem, a mechanizm działania polega na uzupełnianiu wyczerpanych rezerw GSH w wątrobie, co wspomaga neutralizację toksycznych metabolitów leku (głównie N-acetylo-p-benzochinoiminy) i zapobiega uszkodzeniu hepatocytów. Ze względu na swoje właściwości przeciwutleniające NAC jest badana pod kątem potencjalnych zastosowań w leczeniu chorób Alzheimera i Parkinsona, zaburzeń lękowych, łagodnego urazu mózgu oraz w ochronie komórek nerwowych przed uszkodzeniami wynikającymi z nagromadzenia ROS. Ponadto NAC wykazuje działanie ochronne na układ sercowo-naczyniowy i może wspierać funkcję śródbłonna naczyń. NAC występuje w postaci leków, jak i suplementów diety. Może być podawana doustnie, dożylnie lub w postaci inhalacji, w zależności od wskazań klinicznych. Źródłem tego aminokwasu w diecie są produkty bogate w Cys, takie jak jaja, mięso i nabiał, choć sama NAC nie występuje naturalnie w żywności.



Rysunek 3. Wzór chemiczny *N*-acetylo-*L*-cysteiny

GSH to tripeptyd składający się z trzech aminokwasów: Glu, Cys i Gly (Rysunek 4) [26,48–50]. Jego wzór sumaryczny to $C_{10}H_{17}N_3O_6S$. Charakterystyczną cechą budowy GSH jest nietypowe połączenie reszty Glu z Cys poprzez wiązanie γ -peptydowe, dzięki czemu cząsteczka wykazuje większą stabilność w porównaniu do klasycznych peptydów. Funkcje biologiczne GSH są niezwykle szerokie. Jest on jednym z najważniejszych antyoksydantów w organizmie neutralizującym wolne rodniki i ROS, które mogą prowadzić do uszkodzeń komórkowych i przyczyniać się do procesów starzenia oraz rozwoju wielu chorób. GSH pełni także funkcje kofaktora dla wielu enzymów, takich jak na przykład peroksydaza glutationowa. W wyniku połączeniu dwóch cząsteczek GSH powstaje GSSG, który może zostać ponownie zredukowany do aktywnej formy GSH dzięki działaniu enzymu reduktazy glutationowej i udziałowi dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH). GSH bierze udział w neutralizowaniu ksenobiotyków, metali ciężkich i toksyn, wspierając funkcję wątroby i nerek. Jest kluczowym elementem szlaku detoksykacji w cytochromie P450, gdzie reaguje

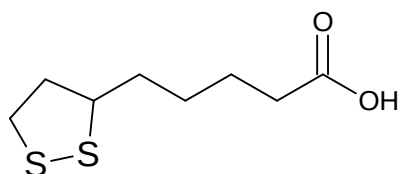
z toksycznymi metabolitami i ułatwia ich wydalanie. Biosynteza GSH zachodzi w organizmie w dwóch etapach, katalizowanych przez enzymy syntetazę γ -glutamylcysteinową i syntetazę glutationową. Do procesu niezbędna jest Cys, która często jest aminokwasem ograniczającym tempo syntezy. Z tego powodu prekursor GSH, takie jak NAC, stosowane są w celu zwiększenia jego poziomu w organizmie. GSH występuje naturalnie w wielu produktach spożywczych, zwłaszcza w warzywach krzyżowych (np. brokułach, brukselce, kapuście), czosnku, cebuli, szpinaku i awokado. Jego biodostępność z diety jest jednak ograniczona, a organizm w dużej mierze polega na biosyntezie. W ostatnich latach suplementacja oraz stosowanie prekursorów GSH stały się przedmiotem badań nad poprawą odporności i spowolnieniem procesów starzenia.



Rysunek 4. Wzór chemiczny glutationu

Kwas α -liponowy (α -LA) to organiczny związek siarkowy o wzorze sumarycznym $C_8H_{14}O_2S_2$. Składa się z pierścienia 1,2-ditiolanowego zawierającego 2 atomy siarki oraz bocznego łańcucha węglowego (Rysunek 5). Po redukcji pierścienia powstaje kwas dihydroliponowy ^[51]. α -LA jest rozpuszczalny zarówno w wodzie, jak i w tłuszczach. Właściwość ta jest niezwykle istotna, gdyż umożliwia mu działanie w różnych środowiskach biologicznych, od cytoplazmy po błony komórkowe, co wyróżnia go na tle innych przeciwutleniaczy o bardziej ograniczonym zasięgu działania ^[51–53]. α -LA pełni rolę koenzymu dehydrogenaz α -ketokwasów, takich jak dehydrogenaza pirogronianowa i α -ketoglutaranowa, co sprawia, że jest niezbędny w cyklu Krebsa ^[52]. Ponadto związek ten bierze udział w przemianach metabolicznych prowadzących do powstania ATP, co czyni go niezwykle ważnym elementem procesów energetycznych zachodzących w komórkach ^[53]. α -LA jest silnym antyoksydantem, który nie tylko neutralizuje wolne rodniki, ale również regeneruje inne przeciwutleniacze, takie jak GSH, witamina C i witamina E ^[48]. Wykazuje także właściwości chelatujące, dzięki czemu może wiązać metale ciężkie, takie jak ołów, rtęć czy kadm, ułatwiając ich

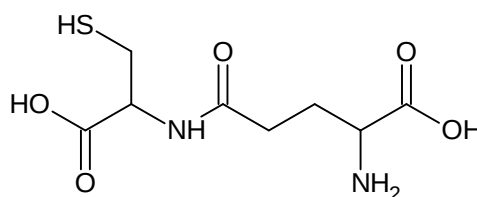
eliminację z organizmu ^[53]. α -LA poprawia insulinowrażliwość i zwiększa wychwyt glukozy przez komórki, dzięki czemu stanowi potencjalny środek wspomagający leczenie insulinooporności i cukrzycy typu 2 ^[52]. Ze względu na swoje właściwości neuroprotekcyjne, związek ten znajduje także zastosowanie w leczeniu neuropatii cukrzycowej, działając ochronnie na komórki nerwowe i zmniejszając objawy, takie jak ból, drętwienie czy mrowienie kończyn ^[54]. α -LA występuje naturalnie w produktach spożywczych, takich jak czerwone mięso, podroby, szpinak, brokuły i ziemniaki, jednakże jego zawartość w diecie jest stosunkowo niska, dlatego do celów terapeutycznych stosuje się jego suplementację ^[51,52]. Rozwiązanie to może prowadzić do obniżenia poziomu biotyny, dlatego przy dłuższym stosowaniu należy rozważyć jej uzupełnianie ^[53].



Rysunek 5. Wzór chemiczny kwasu α -liponowego

γ -L-Glutamyl-L-Cysteina (γ -Glu-Cys) to dipeptyd składający się z Glu i Cys (Rysunek 6) o wzorze sumarycznym $C_8H_{14}N_2O_5S$ ^[55]. Jego unikalna budowa, charakteryzująca się wiązaniem peptydowym między grupą γ -karboksylową glutaminianu a grupą aminową Cys, odróżnia go od typowych peptydów, w których połączenie następuje przez grupę α -karboksylową ^[56]. Reszta glutaminianowa wpływa na rozpuszczalność w wodzie, natomiast grupa $-SH$ pochodząca z Cys nadaje cząsteczce właściwości przeciwutleniające ^[56,57]. γ -Glu-Cys jest prekursorem GSH, zaangażowanym w utrzymanie homeostazy redoks ^[55]. Uczestniczy ponadto w regulacji szlaków sygnałowych związanych z proliferacją komórkową i apoptozą, a także wpływa na aktywność enzymów detoksykacyjnych, takich jak S-transferazy glutationu ^[58]. Synteza γ -Glu-Cys zachodzi w cytoplazmie i jest katalizowana przez enzym syntetazę γ -glutamylcysteinową, który wykorzystuje ATP jako źródło energii ^[55]. Proces ten jest kluczowy dla regulacji stężenia GSH, ponieważ enzym podlega inhibicji zwrotnej przez wspomniany tiol, co zapobiega jego nadmiernej produkcji ^[56]. Degradacja γ -Glu-Cys zachodzi natomiast przy udziale enzymu γ -glutamylotranspeptydazy, który uczestniczy w regulacji cyklu γ -glutamylowego ^[58]. Ze względu na kluczową rolę w syntezie GSH, γ -Glu-Cys jest badana jako potencjalny środek terapeutyczny w chorobach związanych

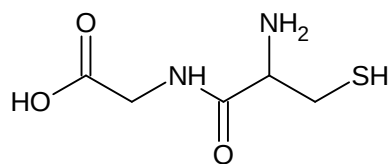
ze stresem oksydacyjnym, takich jak choroby neurodegeneracyjne, w tym choroba Parkinsona i Alzheimera, a także cukrzyca oraz nowotwory ^[55]. γ -Glu-Cys łatwo przenika przez błony komórkowe i nie podlega degradacji w przewodzie pokarmowym, co sprawia, że suplementacja tym peptydem może prowadzić do zwiększenia poziomu GSH, czyniąc ją potencjalnym kandydatem na suplement wspierający detoksykację organizmu i ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym ^[58].



Rysunek 6. Wzór chemiczny γ -L-glutamyl-L-cysteiny

L-cysteinylo-glicyna (Cys-Gly) to dipeptyd składający się z Cys i Gly (Rysunek 7) o wzorze sumarycznym $C_5H_{10}N_2O_3S$. Obecność grupy tiolowej w cząsteczce nadaje jej właściwości antyoksydacyjne, które umożliwiają neutralizację ROS oraz regenerację innych przeciwutleniaczy ^[56,59]. Cys-Gly występuje zarówno w postaci wolnej, jak i związanej z białkami. Jest rozpuszczalna w wodzie i odgrywa istotną rolę w równowadze redoks komórki ^[58]. Cys-Gly powstaje w wyniku degradacji GSH katalizowanej przez enzym γ -glutamylotranspeptydazę, który odcina resztę Glu od GSH ^[56]. Następnie, enzym dipeptydaza cysteinylo-glicyny hydrolizuje Cys-Gly do wolnej Cys i Gly, które mogą zostać wykorzystane do ponownej syntezy GSH lub innych procesów metabolicznych ^[59]. Cys-Gly wykazuje działanie antyoksydacyjne, pomagając neutralizować wolne rodniki i RNS. Odgrywa również rolę w transporcie i magazynowaniu Cys, co wspiera syntezę innych związków biologicznie aktywnych jak tauryna i siarczki ^[59]. Co więcej, Cys-Gly uczestniczy w regulacji enzymów detoksykacyjnych, takich jak S-transferazy glutationu, które odpowiadają za sprzęganie ksenobiotyków i ich eliminację z organizmu ^[58]. Dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym i detoksykacyjnym, Cys-Gly może odgrywać rolę w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym oraz w zapobieganiu chorobom neurodegeneracyjnym, takim jak choroba Parkinsona i Alzheimera ^[58]. Badania wskazują również, że zaburzenia metabolizmu Cys-Gly mogą prowadzić do zmniejszonej syntezy GSH, co jest obserwowane w przebiegu takich chorób jak cukrzyca, nowotwory i przewlekłe stany zapalne ^[55]. Ze względu na swoją rolę w metabolizmie siarki, poziomy

Cys-Gly są analizowane w osoczu w badaniach diagnostycznych związanych z przewlekłym stresem oksydacyjnym [59].



Rysunek 7. Wzór chemiczny L-cysteinylo-glicyny

1.2 Charakterystyka wybranych białek osocza – struktura, funkcje i rola w chorobach przewlekłych

Gdy krew jest wirowana w obecności antykoagulantu, dochodzi do oddzielenia elementów morfotycznych, które tworzą osad stanowiący od 40 do 50% całkowitej objętości [60–62]. Pozostała część to przejrzysty, żółtawy płyn nazywany osoczem. W przypadku, gdy przed wirowaniem dochodzi do indukcji krzepnięcia, powstały płyn nazywa się surowicą. Surowica ma skład zbliżony do osocza, jednak nie zawiera fibrynogenu (Fg) oraz niektórych innych czynników krzepnięcia, które ulegają zużyciu w tym procesie. Osocze krwi składa się w około 0,9% z jonów nieorganicznych, 0,8% z małych cząsteczek organicznych (z czego ponad połowę stanowią lipidy) oraz w 7% z białek. Różowawe zabarwienie osocza zwykle wskazuje na hemolizę, która może zachodzić zarówno w organizmie pacjenta, jak i w próbce krwi na skutek niewłaściwego postępowania podczas pobierania lub przechowywania. Mleczne zabarwienie osocza lub obecność warstwy tłuszczowej po wirowaniu świadczy o obecności chylomikronów – lipoprotein transportujących trójglicerydy, które pojawiają się we krwi po spożyciu tłustego posiłku. Z kolei mętność osocza u osoby na czczo sugeruje hiperlipoproteinemię, wynikającą z podwyższonego stężenia lipoprotein o bardzo niskiej gęstości. Osocze zawiera kilkanaście głównych oraz niezliczoną liczbę mniejszych białek, pełniących kluczowe funkcje w organizmie. Niniejszy podrozdział opisuje najważniejsze białka osocza, ich funkcje oraz nieprawidłowości występujące w stanach chorobowych.

Białka osocza stanowią zróżnicowaną grupę makrocząsteczek obecnych w krwi obwodowej [62]. W warunkach fizjologicznych ich rozmieszczenie w przestrzeniach płynowych organizmu pozostaje w stanie równowagi. Chemicznie są to makrocząsteczki polipeptydowe, które wykazują szerokie spektrum właściwości strukturalnych

i funkcjonalnych. Ze względu na pełnioną funkcję, białka osocza można podzielić na następujące grupy:

- białka transportowe – wiążą i transportują substancje trudno rozpuszczalne w wodzie, np. albumina (HSA) pełni kluczową rolę w transporcie różnych związków;
- białka ostrej fazy (BOF) – związane są z reakcją zapalną; przykładem jest białko C-reaktywne, będące ważnym markerem stanu zapalnego;
- białka układu odpornościowego – należą do nich, m.in. immunoglobuliny oraz białka układu dopełniacza;
- białka związane ze zmianami w błonie komórkowej – np. rozpuszczalny receptor transferynowy, który odgrywa rolę w metabolizmie żelaza;
- czynniki i inhibitory krzepnięcia – regulujące procesy hemostazy;
- antygeny onkofetalne – produkowane przez nowotwory lub fizjologicznie w okresie płodowym, np. alfa-fetoproteina.

Na syntezę białek wpływają takie czynniki jak mechanizm sprzężenia zwrotnego, hormony, stan odżywienia oraz uwarunkowania genetyczne. Immunoglobuliny są syntetyzowane przez komórki plazmatyczne układu siateczkowo-śródbłonkowego, natomiast większość pozostałych białek osocza jest produkowana w wątrobie, skąd są wydzielane do krwi. Każdego dnia wątroba syntetyzuje około 25 g białek osocza, co stanowi niemal 50% całkowitej syntezy białek w tym narządzie [60–63]. Niewielka część białek powstaje w innych narządach i tkankach, na przykład niektóre lipoproteiny w jelitach czy transferryna (Tf) w jelitach i szpiku kostnym. Okres półtrwania białek osocza, czyli czas potrzebny do zmniejszenia ich pierwotnego stężenia o połowę, jest zróżnicowany i niezależny od ich wyjściowego poziomu. Dla HSA wynosi około 19 dni, dla immunoglobulin 24 dni, natomiast czynnik VIII krzepnięcia ulega degradacji w ciągu zaledwie kilku godzin. W diagnostyce zakłada się, że im krótszy jest okres półtrwania białka, tym częstsze powinny być jego oznaczenia, co ma szczególne znaczenie przy monitorowaniu markerów nowotworowych. Proces degradacji białek zachodzi głównie w wątrobie, a niektóre z nich są usuwane przez nerki.

Z wyjątkiem HSA, większość białek osocza to glikoproteiny. Z molekularnego punktu widzenia białka osocza charakteryzują się zróżnicowaną strukturą – od prostych, jednołańcuchowych cząsteczek po skomplikowane oligomeryzowane kompleksy z domenami funkcjonalnymi, zdolnymi do wiązania ligandów, koenzymów oraz

uczestniczenia w kaskadach sygnałowych ^[64]. Zmiany, którym ulegają te cząsteczki, mogą dotyczyć, m.in. PTM, takich jak glikozylacja, fosforylacja, karboksylacja, jak również denaturacji czy proteolitycznego rozkładu, co wpływa zarówno na ich aktywność biologiczną, jak i potencjał diagnostyczny ^[65]. Białka osocza pełnią fundamentalne role w homeostazie organizmu, m.in. regulując ciśnienie onkotyczne, transportując lipidy, hormony oraz inne metabolity, a także uczestnicząc w procesach krzepnięcia, immunomodulacji i obronie przed patogenami ^[60].

Z uwagi na swoją powszechność oraz dynamiczną zmienność stężenia w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych, białka osocza zyskały znaczenie jako biomarkery w diagnostyce chorób przewlekłych, takich jak miażdżycy, cukrzyca, choroby wątroby czy stany zapalne ^[66]. Obecne trendy w badaniach klinicznych i biochemicznych skupiają się na wykorzystaniu zaawansowanych technik proteomicznych, które umożliwiają szczegółowy monitoring profilu białek osocza, co przyczynia się do rozwoju medycyny spersonalizowanej ^[67]. We współczesnej diagnostyce laboratoryjnej, tylko kilkanaście białek osocza jest rutynowo oznaczanych. Ich stężenie zmienia się w różnych okresach życia i zależy od ogólnego stanu fizjologicznego organizmu. Część białek obecnych w surowicy pochodzi z rozpadu komórek, co może stanowić istotny wskaźnik patologii narządowych. Całkowite stężenie białek w osoczu wynosi od 60 do 80 mg/ml. W klinicznej ocenie zmian ilościowych i jakościowych białek osocza stosuje się kilka istotnych pojęć ^[68–79]:

1. Hipoproteinemia – oznacza obniżone stężenie białek osocza poniżej 60 mg/ml.

Może przybierać dwie formy:

- hipoproteinemia rzeczywista – wynika z nadmiernej utraty albumin z moczem lub niewystarczającej syntezy białek, np. w przebiegu marskości wątroby;
- hipoproteinemia względna – jest efektem nadmiernego podawania płynów drogą dożylną lub ograniczonego wydalania moczu (oliguria, anuria).

W skrajnych przypadkach (gdy poziom białka spada poniżej 45 mg/ml, a albumin poniżej 20 mg/ml) może dojść do obrzęków, przesięków do jam ciała oraz hipowolemii na skutek spadku ciśnienia osmotycznego.

2. Hiperproteinemia – odnosi się do podwyższonego stężenia białek w surowicy krwi powyżej 80 mg/ml. Wyróżnia się:

- hiperproteinemię rzeczywistą – wynikającą głównie ze wzrostu syntezy immunoglobulin (hipergammaglobulinemia). Może być efektem:

- gammapatii poliklonalnej – występującej w przewlekłych stanach zapalnych i chorobach autoimmunologicznych (np. RZS, toczeń rumieniowaty układowy, twardzina układowa);
 - gammapatii monoklonalnej – związanej z chorobami nowotworowymi, takimi jak szpiczak mnogi czy makroglobulinemia Waldenströma;
 - hiperproteinemię względną – spowodowaną odwodnieniem lub błędami przy pobraniu krwi (np. zbyt długie utrzymanie stazy).
3. Dysproteinemia – obejmuje zarówno ilościowe, jak i jakościowe zaburzenia w stężeniu białek osocza. Może polegać na zmianach w proporcji albumin do globulin, wzroście lub spadku określonych białek albo pojawieniu się nowych, wcześniej niewykrywalnych białek (np. paraprotein – immunoglobulin lub ich fragmentów wytwarzanych przez patologiczne komórki plazmatyczne). Diagnostyka opiera się głównie na elektroforezie białek.

BOF to grupa białek osocza syntetyzowanych głównie w wątrobie w odpowiedzi na bodźce zapalne, choroby zakaźne, martwicę tkanek (np. zawał mięśnia sercowego, uszkodzenie nerek lub płuc) i nowotwory złośliwe [80–82]. Ich produkcja jest wyzwalana przez cytokiny prozapalne, w szczególności interleukinę (IL)-1, IL-6 i czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α), które są uwalniane przez aktywowane monocyty, makrofagi, fibroblasty i komórki śródbłónka w miejscu zapalenia. Jednocześnie poziomy ujemnych BOF, takich jak HSA, prealbumina i Tf, zmniejszają się pod wpływem TNF- α , a transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β) dodatkowo hamuje ich syntezę. Podstawową funkcją BOF jest udział w niespecyficznej odpowiedzi immunologicznej organizmu poprzez modulację stanu zapalnego i ułatwianie eliminacji szkodliwych antygenów. Białka te odgrywają również kluczową rolę w aktywacji układu odpornościowego poprzez stymulowanie limfocytów B do produkcji przeciwciał oraz limfocytów T do angażowania się w odpowiedzi specyficznej dla antygeny. Ponadto niektóre BOF działają jako inhibitory proteaz zapalnych, takich jak α 1-antytrypsyna, zapobiegając nadmiernej proteolizie białek osocza. Inne, takie jak Fg i czynnik von Willebranda, biorą udział w gojeniu się ran i naprawie tkanek. BOF dzielimy na dodatnie i ujemne. Ujemne BOF, takie jak HSA, prealbumina i Tf, wykazują spadek stężenia w odpowiedzi na proces ostrej fazy. Z kolei dodatnie BOF to grupa białek, których stężenie znacząco wzrasta w wyniku stymulacji zapalnej. Można je dalej podzielić na kilka grup ze względu na wielkość ich odpowiedzi. Wyróżniamy silnie reagujące BOF,

takie jak białko C-reaktywne (CRP), surowiczy amyloid A i prokalcytonina, których stężenie w osoczu w odpowiedzi na odczyn zapalny może wzrosnąć kilkukrotnie, czasami nawet stukrotnie w stosunku do poziomu wyjściowego. Kolejną grupą są umiarkowanie reagujące BOF, w tym α 1-antytrypsyna, kwaśna α 1-glikoproteina, haptoglobina i Fg, charakteryzujące się co najmniej dwukrotnym wzrostem stężenia w osoczu podczas reakcji ostrej fazy. Słabo reagujące BOF, takie jak ceruloplazmina oraz składniki dopełniacza C₃ i C₄, wykazują jedynie niewielki wzrost stężenia w osoczu. Pod względem klinicznym, BOF są niezbędnymi biomarkerami, służącymi do diagnozowania i monitorowania stanów zapalnych, przy czym najczęściej mierzone są CRP, α 1-antytrypsyna, kwaśna α 1-glikoproteina, haptoglobina i prokalcytonina. Jednocześnie spadek ujemnych BOF dostarcza wglądu w nasilenie stanu zapalnego i stan odżywienia pacjenta. Reakcja odpowiedzi ostrej fazy to istotny mechanizm fizjologiczny mający na celu przywrócenie homeostazy, ochronę tkanek przed nadmiernymi uszkodzeniami i wspieranie obrony organizmu przed infekcją oraz urazem.

HSA jest kluczowym białkiem utrzymującym homeostazę organizmu, stanowiącym około 60% wszystkich białek osocza [83–87]. Jest syntezowana w wątrobie, a zanim zostanie wydzielona do krwioobiegu, przechodzi proces dojrzewania w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego. Masa cząsteczkowa HSA wynosi około 66 kDa, a prawidłowe stężenie w osoczu mieści się w zakresie 35 – 50 mg/ml. Czas półtrwania albuminy to około 19 dni, a jej dystrybucja obejmuje zarówno przestrzeń wewnątrznaczyniową (40%), jak i pozanaczyniową (60%). Kluczową rolą HSA jest regulacja ciśnienia onkotycznego krwi, za które odpowiada aż w około 80%. Ze względu na zdolność do wiązania i transportu różnorodnych ligandów, takich jak wolne kwasy tłuszczowe, wapń, miedź, hormony steroidowe, bilirubina czy leki, HSA pełni istotną funkcję w dystrybucji substancji bioaktywnych w organizmie. Ponadto działa jako bufor, stabilizując pH krwi, a także przeciwutleniacz, chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym. Nieprawidłowe stężenie HSA w osoczu może sygnalizować różne patologie. Hipoalbuminemia, czyli obniżony poziom HSA, często występuje w chorobach wątroby (np. marskości), nerek (np. zespół nerczycowy), stanach przewlekłego zapalenia (np. sepsa, RZS), nowotworach, ciężkich infekcjach, krwotokach, rozległych oparzeniach oraz w zespołach złego wchłaniania (np. celiakia, choroba Crohna). Stan ten może również wynikać z zaburzonej dystrybucji HSA, np. w niewydolności serca czy zespole przesiąkania kapilarnego. Jest również wskaźnikiem zaawansowanego niedożywienia białkowego oraz kacheksji u pacjentów

onkologicznych. Z kolei hiperalbuminemia, czyli podwyższony poziom HSA, jest rzadko obserwowana i zazwyczaj związana z odwodnieniem. W praktyce klinicznej HSA znajduje zastosowanie w leczeniu stanów krytycznych, takich jak wstrząs krwotoczny czy rozległe oparzenia.

Tf jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 80 kDa, odpowiedzialną za wiązanie i transport jonów żelaza (Fe^{3+}) w krwiobiegu [88,89]. Strukturalnie składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego z 679 aminokwasów, tworzących dwa płaty – N-końcowy i C-końcowy – każdy zdolny do wiązania jednego jonu Fe^{3+} . Miejsca wiązania żelaza w obu płatach są koordynowane przez dwie reszty tyrozyny, jedną histydynę, jeden kwas asparaginowy i anion węglanowy. Tf wiąże dwie cząsteczki Fe^{3+} i dostarcza je do komórek poprzez interakcję z receptorem transferynowym 1 (TfR1), co umożliwia endocytozę kompleksu Tf-TfR1 i uwolnienie żelaza w endosomach o niskim pH. Ponadto Tf odgrywa kluczową rolę w regulacji poziomu wolnego żelaza, zapobiegając jego toksycznemu działaniu poprzez ograniczanie dostępności dla reakcji Fentona i produkcji ROS. Uczestniczy również w odpowiedzi immunologicznej, wykazując właściwości antybakteryjne poprzez sekwestrację żelaza, co ogranicza jego dostępność dla patogenów. Zaburzenia stężenia Tf są istotnym wskaźnikiem diagnostycznym w wielu stanach klinicznych. Obniżone stężenie tego białka obserwuje się w stanach zapalnych, chorobach wątroby, niedożywieniu i zespołach nefrotycznych, co wynika z jego zmniejszonej syntezy lub zwiększonej utraty. Z kolei podwyższone stężenie Tf jest charakterystyczne dla niedoboru żelaza, anemii z niedoboru żelaza oraz stanów związanych z kompensacyjnym zwiększeniem syntezy BOF w odpowiedzi na niedobór żelaza. Wartość diagnostyczną ma również wysycenie Tf żelazem – obniżone wartości wskazują na niedobór żelaza, podczas gdy podwyższone mogą sugerować hemochromatozę lub nadmierne obciążenie żelazem, np. w wyniku przewlekłych przetoczeń krwi. Badania Tf i jej wysycenia są kluczowe w różnicowaniu przyczyn anemii, monitorowaniu terapii z użyciem preparatów żelaza oraz ocenie stanów zapalnych i metabolicznych związanych z gospodarką żelaza.

Fg jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 340 kDa, syntetyzowaną w wątrobie, która odgrywa kluczową rolę w hemostazie, zapaleniu i gojeniu się ran [90–97]. Strukturalnie składa się z trzech par łańcuchów polipeptydowych – α , β i γ – połączonych wiązaniami disiarczkowymi, tworząc symetryczną strukturę dimeryczną. Cząsteczka ma liniową, wydłużoną konformację z centralną domeną E flankowaną przez dwie domeny D. Po aktywacji przez trombinę fibrynopeptydy A i B są odcinane od Fg, co prowadzi do

polimeryzacji monomeru fibryny i tworzenia skrzepu. Proces ten jest niezbędny do utrzymania integralności naczyń. Fg odgrywa również kluczową rolę w agregacji płytek krwi, pełniąc funkcję ligandu dla integryny $\alpha\text{IIb}\beta_3$, która ułatwia adhezję trombocytów w miejscach uszkodzenia naczyń. Ponadto Fg moduluje odpowiedzi immunologiczne poprzez interakcję z leukocytami i komórkami śródbłónka, przyczyniając się do gojenia się ran i naprawy tkanek. Klinicznie zmienione poziomy Fg związane są z różnymi stanami patologicznymi. Hipofibrynogenemia i afibrynogenemia, wrodzone lub nabyte, powodują upośledzone tworzenie się skrzepów i przedłużone krwawienie, podczas gdy hiperfibrynogenemia jest powiązana z zakrzepicą, chorobami sercowo-naczyniowymi i zaburzeniami zapalnymi. Dysregulacja degradacji Fg może prowadzić do zaburzeń fibrynolitycznych, przyczyniając się do nadmiernego tworzenia się skrzepów lub tendencji do krwawień w zależności od równowagi fibrynolitycznej. Biorąc pod uwagę jego centralną rolę w krzepnięciu i zapaleniu, Fg jest kluczowym biomarkerem w ocenie zaburzeń hemostatycznych i zakrzepicy, a jego poziomy są rutynowo mierzone w praktyce klinicznej w celu oceny stanu układu krzepnięcia i ryzyka sercowo-naczyniowego.

Hemoglobina (Hgb) to globularne białko występujące w krwinkach czerwonych (erytrocytach), odpowiedzialne za transport tlenu z płuc do tkanek [98,99]. Strukturalnie jest to tetramer złożony z dwóch łańcuchów polipeptydowych α i dwóch β , z których każdy jest powiązany z grupą hemową zawierającą jon żelaza (Fe^{2+}), który odwracalnie wiąże tlen. Hgb odgrywa również kluczową rolę w równowadze kwasowo-zasadowej, działając jako bufor i przyczyniając się do transportu dwutlenku węgla poprzez tworzenie karbaminohemoglobiny. Klinicznie, nieprawidłowości w stężeniu Hgb są związane z różnymi zaburzeniami, w tym anemią, która wynika z niedostatecznego poziomu tego białka, oraz hemoglobinopatiami, takimi jak niedokrwistość sierpowatokrwinkowa i talasemia (niedokrwistość tarczowatokrwinkowa), które powstają w wyniku mutacji genetycznych wpływających na strukturę i funkcję Hgb. Hemoglobina glikowana (HbA1c) jest z kolei ważnym biomarkerem długoterminowej kontroli glikemii w przebiegu cukrzycy.

Mioglobina (Mb) to małe, wiążące tlen białko, występujące głównie w mięśniach szkieletowych i sercowym, gdzie odgrywa kluczową rolę w magazynowaniu i transporcie tlenu [100,101]. Strukturalnie Mb składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego z około 153 aminokwasów, tworząc zwartą, kulistą strukturę zdominowaną przez osiem α -helis. Zawiera grupę prostetyczną hemu, złożoną z zawierającego żelazo

pierścienia porfiryнового, który umożliwia odwracalne wiązanie tlenu, co jest właściwością kluczową dla jej funkcji w tkance mięśniowej. Wysokie powinowactwo Mb do tlenu umożliwia jej działanie jako rezerwuaru tej cząsteczki, zapewniając stałe dostawy w okresach zwiększonego zapotrzebowania metabolicznego takich jak intensywna aktywność fizyczna. Ponadto ułatwia wewnątrzkomórkową dyfuzję tlenu, zwiększając jego dostępność dla mitochondriów w celu oddychania tlenowego. Mb jest szybko uwalniana do krwioobiegu po uszkodzeniu mięśni, takim jak zawał mięśnia sercowego lub rhabdomyoliza. Niemniej jednak jej użyteczność diagnostyczna jest ograniczona ze względu na jej niską swoistość, ponieważ podwyższone poziomy Mb mogą być wynikiem różnych stanów wpływających na integralność mięśni. Mioglobinuria, charakteryzująca się obecnością Mb w moczu, jest poważną konsekwencją rozległego rozpadu mięśni i może prowadzić do ostrego uszkodzenia nerek z powodu nefrotoksycznych skutków wolnej mioglobiny.

Insulina (Ins) jest hormonem peptydowym produkowanym przez komórki β wysp trzustkowych, odgrywającym centralną rolę w homeostazie glukozy. Strukturalnie składa się z dwóch łańcuchów polipeptydowych, A i B, połączonych wiązaniami disiarczkowymi, z wysoce konserwatywną sekwencją aminokwasów wśród kręgowców [102]. Podstawową funkcją Ins jest ułatwianie komórkowego wychwytu glukozy, szczególnie w tkance mięśniowej i tłuszczowej, poprzez promowanie translokacji transportera glukozy typu 4 (GLUT-4) do błony plazmatycznej. Ins hamuje również wątrobową produkcję glukozy i zwiększa syntezę glikogenu, jednocześnie hamując lipolizę i proteolizę [103]. Pod względem klinicznym Ins odgrywa kluczową rolę w leczeniu cukrzycy, zaburzenia metabolicznego charakteryzującego się przewlekłą hiperglikemią z powodu upośledzonego wydzielania lub działania tego hormonu. Cukrzyca typu 1 jest wynikiem autoimmunologicznego zniszczenia komórek β trzustki, co wymaga egzogennej terapii insuliną, podczas gdy cukrzyca typu 2 jest związana z insulinoopornością i względnym niedoborem tego białka [104]. Ponadto dysregulacja Ins jest powiązana z różnymi stanami patologicznymi, w tym zespołem metabolicznym, chorobami układu sercowo-naczyniowego i niektórymi nowotworami, co podkreśla jej szersze znaczenie fizjologiczne wykraczające poza metabolizm glukozy [105].

1.3 Reumatoidalne zapalenie stawów

RZS to przewlekła choroba autoimmunologiczna charakteryzująca się uporczywym zapaleniem stawów, prowadzącym do postępującego uszkodzenia chrząstki

i kości^[106]. Dotyczy ona przede wszystkim błony maziowej, tkanki wyściełającej stawy, powodując obrzęk, ból, a ostatecznie deformację i upośledzenie czynnościowe. Choroba wykracza poza stawy, a jej potencjalne powikłania obejmują układ sercowo-naczyniowy, płucny i kostny. Jej patogenezą obejmuje złożoną interakcję predyspozycji genetycznych, czynników środowiskowych i dysregulacji układu odpornościowego. Obecność autoprzeciwciał, takich jak czynnik reumatoidalny i przeciwciała przeciwko cytrulinowanemu białku (ACPA), jest cechą charakterystyczną tej choroby, przy czym ACPA są wysoce specyficzne dla RZS i wykrywalne na wiele lat przed wystąpieniem objawów klinicznych. Autoprzeciwciała te przyczyniają się do tworzenia kompleksów immunologicznych, które promują stan zapalny i niszczenie stawów. Czynniki genetyczne odgrywają istotną rolę w podatności na RZS, przy czym gen HLA-DRB1 jest najbardziej znaczącym genetycznym czynnikiem ryzyka^[107]. Hipoteza „wspólnego epitopu” sugeruje, że niektóre allele HLA-DRB1 kodują wspólną sekwencję aminokwasów związaną ze zwiększonym ryzykiem ACPA-pozytywnego RZS. Inne *loci* genetyczne, w tym PTPN22 i STAT4, również są uwikłane w rozwój choroby, przyczyniając się do dysregulacji immunologicznej i dodatkowo zwiększając ryzyko RZS. Czynniki środowiskowe także wpływają na rozwój RZS, przy czym palenie jest najbardziej znanym bodźcem mogącym wywołać chorobę u osób predysponowanych genetycznie^[108]. Wykazano, że dym papierosowy wywołuje modyfikacje białek, takie jak cytrulinacja, co zwiększa prawdopodobieństwo rozpoznania ich jako obcych przez układ odpornościowy i wywołania reakcji autoimmunologicznej. Inne czynniki, takie jak infekcje i zmiany mikrobiomu jelitowego, również są powiązane z inicjacją choroby, chociaż ich dokładna rola pozostaje aktywnym obszarem badań. Immunopatogeneza RZS obejmuje zarówno wrodzone, jak i adaptacyjne odpowiedzi immunologiczne. Aktywowane komórki T, szczególnie Th₁₇, a także limfocyty B, przyczyniają się do przewlekłego stanu zapalnego poprzez produkcję cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-1 i IL-6. Te z kolei indukują synowioocyty o fenotypie fibroblastów i makrofagów – komórki, które nadmiernie proliferują w błonie maziowej i atakują otaczającą chrząstkę oraz kość. Z czasem błona maziowa ulega wzmożonej waskularyzacji, obserwuje się naciekanie jej przez leukocyty, a także hiperplazję warstwy wyściółkowej, która tworzy agresywną tkankę zwaną łuszczką, powodującą erozję kości i chrząstki oraz prowadzącą do nieodwracalnego uszkodzenia stawów^[108]. Głębsze zrozumienie tych patogennych mechanizmów ułatwiło opracowanie ukierunkowanych terapii celowanych. Wprowadzenie leków biologicznych, takich jak inhibitory TNF- α i antagoniści receptora

IL-6, zrewolucjonizowało leczenie RZS poprzez skuteczne zmniejszenie stanu zapalnego i spowolnienie postępu choroby. Pomimo tych postępów, RZS pozostaje złożoną i heterogeniczną chorobą, a trwające badania koncentrują się na identyfikacji nowych celów terapeutycznych i spersonalizowanych podejść do leczenia w celu poprawy długoterminowych wyników pacjentów.

Niestety, oprócz powikłań mięśniowo-szkieletowych, RZS znacznie zwiększa ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, które są główną przyczyną śmiertelności w tej populacji pacjentów. Badania wykazały, że osoby z RZS mają prawie dwukrotnie większe ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych w porównaniu z populacją ogólną, co jest wielkością porównywalną do tej obserwowanej w cukrzycy [109]. Tradycyjne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego, takie jak nadciśnienie, hiperlipidemia, palenie, cukrzyca i brak aktywności fizycznej, są powszechne wśród osób z RZS. Również niektóre medykamenty, takie jak niesteroidowe leki przeciwzapalne czy glikokortykosteroidy, mogą wpływać na wzrost ciśnienia krwi u tych pacjentów [109,110]. Uważa się, że przewlekły stan zapalny charakterystyczny dla RZS odgrywa kluczową rolę w przyspieszaniu rozwoju miażdżycy, zwiększając tym samym ryzyko chorób sercowo-naczyniowych. Ponadto podwyższone poziomy cytokin prozapalnych mogą przyczyniać się do dysfunkcji śródbłonna i tworzenia się blaszek w ścianach tętnic. Wzajemne oddziaływanie między RZS a ryzykiem sercowo-naczyniowym podkreśla znaczenie zintegrowanego paradygmatu leczenia, który obejmuje zarówno patologię stawów, jak i zdrowie układu krążenia. Trwające badania nad mechanizmami łączącymi RZS i choroby sercowo-naczyniowe, a także rozwój narzędzi do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego specyficznych dla RZS, pozostają kluczowe dla poprawy wyników leczenia pacjentów.

1.4 SARS-CoV-2 i COVID-19

Drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2), zidentyfikowany w grudniu 2019 r. w Wuhan, w Chinach, szybko rozprzestrzenił się na całym świecie, prowadząc do znacznej zachorowalności i śmiertelności [111–114]. Pochodzenie wirusa nie zostało w pełni wyjaśnione, chociaż najbardziej prawdopodobna hipoteza sugeruje pochodzenie odzwierzęce z udziałem nietoperzy i łuskowców. Wirus ten atakuje przede wszystkim układ oddechowy, powodując chorobę zwaną COVID-19, która może mieć różne nasilenie, od łagodnych objawów po ciężką niewydolność oddechową i wielonarządową, często prowadzącą do śmierci. Najczęściej zgłaszane

objawy obejmują zmęczenie, kaszel, katar, gorączkę, bóle głowy oraz zaburzenia smaku i węchu. Ponadto obserwuje się również nudności, wymioty, biegunkę i upośledzenie funkcji poznawczych. Wirus przenoszony jest głównie z osoby na osobę drogą kropelkową, a w mniejszym stopniu poprzez kontakt z zanieczyszczonymi przedmiotami i powierzchniami. W rezultacie nowy koronawirus szybko się rozprzestrzenił, powodując zapalenie płuc o nieznannej etiologii, co doprowadziło do wybuchu pandemii. W ciągu zaledwie kilku miesięcy choroba stała się poważnym wyzwaniem dla globalnych systemów opieki zdrowotnej i gospodarek. Szybka ekspansja oraz pojawienie się różnych wariantów wirusa stanowiły poważne wyzwanie dla personelu medycznego na całym świecie. W odpowiedzi na pandemię podjęto bezprecedensowe wysiłki w celu opracowania szczepionek mających na celu powstrzymanie rozprzestrzeniania się wirusa SARS-CoV-2 i złagodzenie nasilenia COVID-19 ^[111]. Do sierpnia 2022 r. ponad 40 szczepionek zostało zatwierdzonych lub dopuszczonych do użytku w nagłych wypadkach na całym świecie, a liczba podanych dawek przekraczała 11 miliardów. Preparaty te opierają się na różnych technologiach, takich jak szczepionki mRNA, wektorowe, czy inaktywowane oraz oparte na białkach. Każdy typ szczepionki wykorzystuje odrębne mechanizmy w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej, mające na celu zapewnienie skutecznej ochrony przed wirusem. Pojawienie się wariantów SARS-CoV-2, zwłaszcza Alpha, Beta, Gamma, Delta i Omicron, wzbudziło obawy dotyczące zwiększonej transmisyjności i potencjalnego unikania odpowiedzi immunologicznej. Warianty te zawierają mutacje, które mogą zwiększać zakaźność wirusa i wpływać na skuteczność istniejących szczepionek. W celu rozwiązania problemu słabnącej odporności i zwiększenia ochrony przed nowymi wariantami, wprowadzono szczepienia przypominające. Badania wskazują, że podawanie dawek przypominających może znacznie podnieść poziom przeciwciał neutralizujących, poprawiając tym samym obronę przed wariantami takimi jak Omicron ^[111,115]. Czas podania dawki przypominającej ma kluczowe znaczenie, bowiem badania sugerują, że otrzymanie dawki przypominającej około 2,7 miesiąca przed przewidywanym szczytem fali zachorowań, może znacznie zwiększyć ochronę, podkreślając znaczenie strategicznego harmonogramu szczepień. Chociaż szczepionki odegrały zasadniczą rolę w kontrolowaniu pandemii, zgłaszano działania niepożądane, takie jak gorączka, ból głowy, ból mięśni, dreszcze oraz ból w miejscu wstrzyknięcia. Ponadto obserwowano nieliczne przypadki nietypowych zdarzeń zakrzepowych związanych z niską liczbą płytek krwi i rozwojem rzadkich powikłań kardiologicznych u młodych osób ^[116]. Niestety, dostępne dowody były

niewystarczające, aby ustalić związek przyczynowo-skutkowy, co wymagało dalszych badań w celu zidentyfikowania potencjalnych mechanizmów przyczyniających się do tych zdarzeń.

Pojawienie się SARS-CoV-2, wirusa odpowiedzialnego za COVID-19, skłoniło także do szeroko zakrojonych badań nad jego ogólnoustrojowymi skutkami. Oprócz typowych objawów charakterystycznych, COVID-19 wiąże się również z powikłaniami sercowo-naczyniowymi, które są silnie powiązane z ciężkością choroby oraz śmiertelnością^[117]. Jednakże mechanizmy powodujące uszkodzenie serca i niewydolność w przypadku COVID-19 pozostają w dużej mierze nieznane. Kompleksowe analizy proteomu osocza pacjentów z COVID-19 pozwoliły na identyfikację kilku kluczowych zmian związanych z układem wieńcowym. Zmniejszenie metaloproteazy ADAMTS13 i zwiększenie sygnalizacji TGF- β zostało powiązane z uszkodzeniem mięśnia sercowego i włóknieniem. Co więcej, badania wskazują, że pacjenci z COVID-19 często wykazują zmienione poziomy związków tiolowych, korelujące z ciężkością choroby^[118]. Na przykład obniżone stężenia tioli w osoczu były związane ze zwiększonym stresem oksydacyjnym i pilną potrzebą przyjęcia na oddział intensywnej terapii. Uzyskane wyniki podkreślają rolę tioli jako predykcyjnych biomarkerów postępu choroby i prawdopodobieństwa wystąpienia ciężkich zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z COVID-19. Ponadto podawanie leków, takich jak NAC, zostało zbadane pod kątem ich potencjału do uzupełniania poziomów GSH, łagodząc w ten sposób stres oksydacyjny i jego szkodliwy wpływ na układ sercowo-naczyniowy^[119]. Stosowane strategie terapeutyczne mają na celu przywrócenie równowagi redoks, potencjalnie zmniejszając częstość występowania powikłań sercowo-naczyniowych związanych z COVID-19. Monitorowanie oraz ukierunkowana modulacja stężeniem tioli mogą stanowić kluczowe narzędzie w ograniczaniu ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów z COVID-19, otwierając tym samym nowe perspektywy terapeutyczne i profilaktyczne.

2. CEL I ZAKRES PRACY

2.1 Uzasadnienie podjętego problemu badawczego

Choroby reumatyczne o podłożu zapalnym, takie jak RZS, stanowią istotne wyzwanie diagnostyczne i terapeutyczne dla współczesnej służby zdrowia. Schorzenia te często mają charakter przewlekły, prowadząc do upośledzenia funkcji i jakości życia pacjentów ^[106,110,120,121]. Ogólnoustrojowy stan zapalny obserwowany w wielu chorobach reumatycznych może predysponować pacjentów do rozwoju miażdżycy (stwardnienia i zwężenia tętnic), zwiększając ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, takich jak zawały serca i udary mózgu, które pozostają jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Ponadto stan zapalny może wpływać na funkcję naczyń krwionośnych, prowadząc do dysfunkcji śródbłonna i w konsekwencji pogorszenia zdrowia układu sercowo-naczyniowego. Warto zaznaczyć, że zarówno choroby układu krążenia, jak i choroby reumatyczne mają wspólne czynniki ryzyka. Należą do nich palenie, otyłość, wysokie ciśnienie krwi, wysoki poziom cholesterolu, siedzący tryb życia i pewne predyspozycje genetyczne. Stres oksydacyjny, który jest wynikiem zaburzonej równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników a przeciwutleniaczami, także odgrywa istotną rolę w rozwoju tych schorzeń. Tiole niskocząsteczkowe stanowią ważną pulę antyoksydantów w organizmie i odpowiadają za utrzymanie prawidłowej homeostazy redoks. Dysfunkcje w obrębie metabolizmu tioli mogą przyczyniać się do rozwoju chorób układu krążenia, a także do zaburzeń funkcji nerek w przebiegu RZS, co czyni je potencjalnymi biomarkerami diagnostycznymi i prognostycznymi. Badania wskazują ponadto na związek między zmianami w homeostazie tiolowo-disiarczkowej a aktywnością układu immunologicznego u pacjentów z chorobami reumatycznymi, co może przyczyniać się do przewlekłego stanu zapalnego w tych schorzeniach ^[109,110,120–134]. Istnieją także doniesienia sugerujące korelację pomiędzy stężeniem Hcy, niezależnego czynnika ryzyka przedwczesnego rozwoju miażdżycy w naczyniach wieńcowych, obwodowych i mózgowych, a chorobami reumatycznymi. Niektóre badania wykazały, że pacjenci z RZS mają wyższy poziom Hcy w osoczu w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto istnieją dowody sugerujące, że podwyższone stężenie tego aminotiolu może być związane ze zwiększoną aktywnością i ciężkością choroby. Pomimo rosnącej liczby badań poświęconych Hcy, dotychczasowe doniesienia naukowe nie dostarczają kompleksowej wiedzy na temat mechanizmów łączących ten aminokwas z RZS. Zaproponowano, że Hcy może przyczyniać się do stanu zapalnego i uszkodzenia tkanek

poprzez stres oksydacyjny, dysfunkcję śródbłónka i dysregulację immunologiczną. Dodatkowo tiol ten może promować produkcję cytokin prozapalnych oraz przyczyniać się do powstawania autoprzeciwciał, które są cechą charakterystyczną chorób reumatycznych. Obserwacje kliniczne dowodzą ponadto, iż jednym z częściej zajmowanych narządów w RZS są nerki ^[135,136]. W związku z tym konieczne jest bardzo wnikliwe monitorowanie ich funkcji i wczesne wykrywanie uszkodzenia. Zapalenie towarzyszące chorobom reumatycznym może prowadzić do uszkodzenia błony filtracyjnej w nerkach i pojawienia się białkomoczu. Badania sugerują, że białkomocz może być wskaźnikiem ogólnego uszkodzenia naczyń krwionośnych i zwiększonego ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Wzrost poziomu Hcy w przebiegu RZS może dodatkowo pogorszyć funkcję nerek i powodować problemy nefrologiczne. Pacjenci z chorobami nerek, szczególnie z ich niewydolnością, mają znacznie podwyższone stężenie Hcy we krwi, a przypadki zawału serca i udaru mózgu u tej grupy są do 10 razy częstsze niż w ogólnej populacji. Niestety, los resorbowanej przez cewki nerkowe Hcy nie został w pełni poznany, a przyczyn upośledzonego metabolizmu sugeruje się szukać poza nerkami. Kontrola poziomu metabolicznie spokrewnionych związków siarki w płynach biologicznych może zatem dostarczyć cennych informacji na temat postępu choroby i odpowiedzi na leczenie, w tym ocenie skuteczności interwencji terapeutycznych i ukierunkowaniu decyzji dotyczących leczenia, jak również pomóc w identyfikacji pacjentów wymagających intensywniejszej opieki kardiologicznej i nefrologicznej. W niniejszej pracy doktorskiej zaproponowano szerszą ocenę funkcji układu sercowo-naczyniowego u pacjentów z RZS poprzez zastosowanie nowatorskiego i zintegrowanego podejścia opartego na kompleksowej analizie profilu biochemicznego, obejmującego zarówno markery tiolowe, jak i wybrane białka osocza, w tym BOF, które są ściśle powiązane z nasilającym się stanem zapalnym. BOF pełnią fundamentalną rolę w odpowiedzi odpornościowej organizmu, modulując przebieg procesów zapalnych, hemostatycznych i immunologicznych. Ich stężenie w surowicy krwi dynamicznie się zmienia w odpowiedzi na rozwijające się patologie, co czyni je niezastąpionymi markerami w diagnostyce i monitorowaniu wielu schorzeń. Niemniej jednak, współczesna diagnostyka laboratoryjna nadal bazuje głównie na analizie pojedynczych biomarkerów białkowych, co ogranicza pełną ocenę dynamiki reakcji organizmu na bodźce zapalne. Dotychczasowe metody analityczne, w tym immunochemiczne czy spektrofotometryczne, pozwalały na ocenę tylko wybranych BOF w jednej analizie, często wymagając osobnych oznaczeń dla różnych markerów. Oznaczało to zwiększony

czas analizy, wyższe koszty oraz konieczność pobrania większej ilości materiału biologicznego. Brakowało uniwersalnej, precyzyjnej techniki pozwalającej na jednoczesną, ilościową ocenę szerokiego panelu białek, w tym BOF, w jednej analizie, co ograniczało możliwości diagnostyczne. Podjęcie w ramach niniejszej pracy prób nad rozwinięciem pierwszej metody pozwalającej na jednoczesną ocenę wielu analitów białkowych o znaczeniu klinicznym w próbkach biologicznych, było zatem w pełni zasadne i mogło stanowić przełom w analizie wybranych BOF, wyznaczając nowy standard w diagnostyce klinicznej. Do tego celu postanowiono zastosować technikę HPLC-ELSD, licząc, że pozwoli ona na oznaczenie zarówno dodatnich, jak i ujemnych BOF stanowiących przedmiot zainteresowania w jednym przebiegu analitycznym, co nie tylko da nadzieję na zwiększenie efektywności diagnostycznej, ale także dostarczenie nowych informacji na temat patomechanizmów przewlekłych chorób zapalnych. Ponadto zastosowanie podejścia opartego na próbie zrozumienia interakcji pomiędzy stresem oksydacyjnym a procesami zapalnymi mogło otworzyć nowe kierunki dalszych badań naukowych i umożliwić precyzyjne uchwycenie potencjalnych mechanizmów patofizjologicznych leżących u podstaw powikłań sercowo-naczyniowych w przebiegu RZS oraz innych chorób autoimmunologicznych o podłożu zapalnym. Badania zaplanowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wynikały z potrzeby dostarczenia nowych narzędzi analitycznych mających wysoki potencjał aplikacyjny w analizie klinicznej wybranych markerów osocza krwi, a tym samym pozwalających na uzyskanie pełniejszego obrazu procesów biochemicznych zachodzących w organizmie.

Pandemia COVID-19, wywołana przez wirus SARS-CoV-2, miała globalne konsekwencje zdrowotne, społeczne i gospodarcze, a jej wpływ na zdrowie publiczne jest nadal odczuwalny. Choroba ta przyczyniła się do znacznej śmiertelności i poważnych powikłań zarówno w obrębie układu oddechowego, jak i innych narządów, stanowiąc tym samym jedno z największych wyzwań zdrowotnych XXI wieku. Wraz z rozprzestrzenianiem się wirusa pojawiła się konieczność opracowania i wdrożenia remedium, które stanie się kluczowym narzędziem w walce z pandemią^[111]. Cel ten udało się osiągnąć dzięki wprowadzeniu do obrotu szczepionek, co zainicjowało tym samym największą kampanię szczepień w historii. Mimo ich wysokiej skuteczności w zapobieganiu ciężkiemu przebiegowi choroby i redukcji śmiertelności, pojawiły się doniesienia o możliwych działaniach niepożądanych, w tym powikłaniach zakrzepowozatorowych, które stały się przedmiotem licznych kontrowersji oraz wskazywały na konieczność dalszych badań w kierunku monitorowania długotrwałych skutków

szczepień oraz samego zakażenia koronawirusem na układ sercowo-naczyniowy. Współczesne badania podkreślają rolę Hcy jako czynnika ryzyka rozwoju chorób układu krążenia, a jej podwyższone stężenie związane jest z uszkodzeniami naczyń krwionośnych, nasilonym procesem miażdżycowym oraz zwiększoną podatnością na zakrzepy [46,137–139]. Wstępne doniesienia sugerowały również korelację pomiędzy reaktywnością trombocytów a poziomem Hcy w osoczu, co mogło tłumaczyć mechanizmy obserwowanych powikłań poszczepiennych [140]. Ponadto hipoteza dotycząca roli polimorfizmu C677T genu MTHFR jako czynnika predysponującego do ciężkiego przebiegu COVID-19 i zwiększonego ryzyka powikłań zakrzepowych potwierdzała konieczność ustalenia mechanizmów patofizjologicznych i przyczynowych leżących u podstaw zanotowanych zdarzeń [141,142]. Dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na analizie poziomów Hcy u pacjentów z aktywną chorobą COVID-19 [118,140,143–145]. Brakowało jednak szczegółowych danych dotyczących długofalowego wpływu zakażenia oraz szczepienia przeciwko COVID-19 zarówno na metabolizm Hcy i powiązanych z nią niskocząsteczkowych tioli osocza, jak i sam układ sercowo-naczyniowy. Nie przeprowadzono również badań dotyczących zmian poziomu Hcy i jej siarkowych metabolitów w próbkach biologicznych pochodzących od osób zaszczepionych i ozdowieńców w ciągu kilku miesięcy od zainicjowania reakcji odpornościowej organizmu. W związku z powyższym, konieczne stało się pogłębienie wiedzy na temat roli tego aminotiolu i jego metabolitów jako potencjalnych markerów ryzyka zakrzepicy, zarówno w kontekście infekcji, jak i szczepienia przeciwko COVID-19 w perspektywie długoterminowej. Niniejsza praca stanowiła pierwszą próbę wypełnienia luki w aktualnym stanie wiedzy poprzez kompleksową analizę dynamiki zmian stężenia i statusu redoks wybranych tioli niskocząsteczkowych oraz ocenę ich korelacji z ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych. Wykorzystanie nowoczesnych technik separacyjnych, w tym HPLC-FLD, umożliwiło precyzyjne oznaczenie stężenia biotiolu i ich metabolitów będących przedmiotem zainteresowania w osoczu krwi ludzkiej, co pozwoliło na uzyskanie wysokiej czułości i dokładności pomiarów niezbędnych do weryfikacji nowych markerów predykcyjnych. Podjęcie niniejszego projektu badawczego było nie tylko konieczne z punktu widzenia aktualnych potrzeb zdrowia publicznego, ale stanowiło także szansę na rozwój nowych metod diagnostycznych, które pozwolą na monitorowanie ryzyka zakrzepicy i innych powikłań sercowo-naczyniowych w przebiegu chorób zakaźnych, co niewątpliwie ma istotne znaczenie dla dalszego rozwoju strategii prewencyjnych.

2.2 Cel pracy

Celem głównym niniejszej rozprawy doktorskiej było stworzenie zaawansowanych narzędzi analitycznych opartych na technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej, służących do ilościowego oznaczenia metabolicznie spokrewnionych związków siarki oraz wybranych białek osocza w próbkach biologicznych. Badania opierały się na monitorowaniu krótko- lub długoterminowych przemian biochemicznych związanych zarówno z homeostazą tiolowo-disiarczkową, jak i reakcją immunologiczną organizmu oraz ocenie ich znaczenia w przebiegu wybranych stanów patofizjologicznych, takich jak RZS oraz odpowiedź organizmu na zakażenie SARS-CoV-2 lub szczepienie przeciwko COVID-19. Szczególny nacisk położono na ocenę wpływu zmian w profilu biochemicznym osocza pacjentów na rozwój powikłań sercowo-naczyniowych, celem dostarczenia nowych danych naukowych mających istotne znaczenie dla dalszego rozwoju strategii diagnostycznych i prewencyjnych w zakresie ochrony zdrowia publicznego.

W ramach realizacji celu głównego niniejszej rozprawy doktorskiej sformułowano następujące cele szczegółowe:

1. Opracowanie i walidacja trzech niezależnych metod HPLC dedykowanych do jednoczesnego oznaczania:
 - sześciu niskocząsteczkowych tioli osocza (Cys, Hcy, Cys-Gly, α -LA, GSH, NAC) obok HSA z zastosowaniem przedkolumnowej modyfikacji chemicznej analitów za pomocą monobromobimanu (mBBBr) i detekcji fluorescencyjnej (FLD),
 - wybranych analitów białkowych, w tym BOF, takich jak HSA, Ins, Fg, Mb, Hgb oraz Tf, z zastosowaniem detekcji rozpraszania światła przez odparowanie (ELSD),
 - różnych form redoks pięciu kluczowych biotiole osocza, w tym Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly oraz γ -Glu-Cys, po chemicznej modyfikacji analitów z użyciem 4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolu (ABD-F), i z wykorzystaniem detekcji FLD.
2. Optymalizacja procedur przygotowania próbek biologicznych w celu zapewnienia wysokiej czułości i selektywności oznaczeń, minimalizacji błędów analitycznych oraz zwiększenia powtarzalności i precyzji metod.

3. Porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi oraz przeprowadzenie analizy statystycznej mającej na celu identyfikację istotnych różnic między badanymi grupami a zdrową kontrolą, a także ustalenie potencjalnych korelacji między poziomami biomarkerów a stanem klinicznym pacjentów.
4. Ocena potencjalnych zastosowań klinicznych opracowanych metod w kontekście diagnostyki i monitorowania wybranych stanów patofizjologicznych oraz ich roli w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości ich wdrożenia do praktyki laboratoryjnej.
5. Uwzględnienie zasad zielonej chemii analitycznej w opracowanych procedurach, poprzez minimalizację zużycia odczynników chemicznych, ograniczenie generowania odpadów laboratoryjnych oraz zastosowanie metod przyjaznych dla środowiska.

3. OPRACOWANIE METODY JEDNOCZESNEGO OZNACZANIA NISKOCZĄSTECZKOWYCH TIOLI OSOCZA OBOK ALBUMINY SUROWICY LUDZKIEJ ZA POMOCĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKcją FLUORESCENCYJNĄ Z ZASTOSOWANIEM PRZEDKOLUMNOWEJ MODYFIKACJI CHEMICZNEJ ANALITÓW MONOBROMOBIMANEM

W niniejszym rozdziale szczegółowo opisano procedurę rozwijania nowej metody wykorzystującej technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z detekcją fluorescencyjną (RP-HPLC-FLD), dedykowanej do jednoczesnego oznaczania sześciu niskocząsteczkowych tioli (Cys, Hcy, Cys-Gly, α -LA, GSH, NAC) obok białka albuminy, która częściowo została opublikowana w pracy *Simultaneous determination of human serum albumin and low-molecular-weight thiols after derivatization with monobromobimane* (Molecules **2021**, 26, 332) ^[146]. Opracowaną metodologię wykorzystano ponadto w ramach eksperymentu medycznego pt. „Homeostaza tiolowo-disiarczkowa jako wskaźnik potencjalnych zaburzeń układu sercowo-naczyniowego w przebiegu wybranych chorób reumatycznych”, prowadzonego we współpracy z Zakładem Medycyny Rodzinnej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi oraz Kliniką Reumatologii z Pododdziałem Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 2 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

3.1 Materiały i metody

3.1.1 Odczynniki

- dimetylosulfotlenek (DMSO), czysty do analizy, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- n-oktanol, czysty do analizy, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- kwas trifluorooctowy (TFA), czystość HPLC, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- utleniony glutation (GSSG), $\geq 98\%$ (HPLC), Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- L-cysteinylo-glicyna (Cys-Gly), $\geq 85\%$ (TLC), nadająca się do HPLC, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- L-homocystyna (Hcy-Hcy), $\geq 98\%$ (HPLC), Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;

- N-acetylo-L-cysteina (NAC), $\geq 99\%$ (TLC), Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- kwas α -liponowy (α -LA), $\geq 98\%$, czysty do analizy, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- albumina surowicy ludzkiej (HSA), proszek liofilizowany, $\geq 96\%$, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- monobromobiman (mBBr), nadający się do fluorescencji, BioReagent, $\geq 95\%$ (HPCE), Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- L-cystyna (Cys-Cys), $\geq 99,7\%$ (TLC), Reanal, Budapeszt, Węgry;
- sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA- Na_2), 99-101%, J.T. Beaker, Deventer, Holandia;
- wodorotlenek sodu (NaOH), czysty do analizy, J.T. Beaker, Deventer, Holandia;
- acetonitryl (ACN), czystość HPLC, J.T. Beaker, Deventer, Holandia;
- kwas solny (HCl), 35 – 38%, czysty do analizy, POCH, Gliwice, Polska;
- borowodorek sodu (NaBH_4), czysty do analizy, Merck, Darmstadt, Niemcy;
- 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol (Tris), czysty do analizy, BioShop, Kanada;
- woda dejonizowana przygotowana w laboratorium przy użyciu systemu Mili-QRG (Millipore, Wiedeń, Austria);

3.1.2 Roztwory

- Roztwór podstawowy GSSG o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano odważając do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml 6,1263 mg GSSG i rozpuszczając go w 100 μl 1 mol/l HCl, a następnie uzupełniając wodą destylowaną do 1 ml.
- Roztwór podstawowy Hcy-Hcy o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano odważając do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml 2,683 mg Hcy-Hcy i rozpuszczając ją w 100 μl 1 mol/l HCl, a następnie uzupełniając wodą destylowaną do 1 ml.
- Roztwór podstawowy Cys-Gly o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano odważając do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml 1,7821 mg Cys-Gly i rozpuszczając ją w 100 μl 1 mol/l HCl, a następnie uzupełniając wodą destylowaną do 1 ml.

- Roztwór podstawowy Cys-Cys o stężeniu 0,1 mol/l przygotowano odważając do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml 24,03 mg Cys-Cys i rozpuszczając ją w 100 μ l 1 mol/l HCl, a następnie uzupełniając wodą destylowaną do 1 ml.
- Roztwór podstawowy NAC o stężeniu 0,1 mol/l przygotowano odważając do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml 16,319 mg NAC i rozpuszczając ją w 100 μ l 1 mol/l HCl, a następnie uzupełniając wodą destylowaną do 1 ml.
- Roztwór podstawowy α -LA o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano odważając do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml 2,0633 mg α -LA i rozpuszczając go w 1000 μ l 1 mol/l NaOH.
- Roztwór podstawowy HSA o stężeniu 50 mg/ml sporządzono w probówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml poprzez rozpuszczenie 50 mg HSA w 1 ml wody dejonizowanej.
- Roztwór odczynnika redukującego przygotowywano każdorazowo w dniu analiz poprzez rozpuszczenie 0,11352 g NaBH₄ w 500 μ l 0,1 mol/l NaOH, a następnie sporządzenie mieszaniny 6 mol/l NaBH₄ i DMSO w stosunku objętościowym 2:1.
- Roztwór mBBR o stężeniu 0,1 mol/l sporządzono poprzez rozpuszczenie 2,7111 mg mBBR w 100 μ l ACN, a następnie przechowywano w temperaturze 4 °C bez dostępu światła przez okres maksymalnie jednego miesiąca, bez zauważalnych zmian w zawartości.
- Bufor Tris-HCl o stężeniu 0,2 mol/l i pH 9,5 przygotowano poprzez rozpuszczenie 2,4228 g zasady Tris w 100 ml wody dejonizowanej, a następnie miareczkując otrzymany roztwór 3 mol/l HCl i sprawdzając pH z wykorzystaniem metody potencjometrycznej.
- Roztwór NaOH o stężeniu 1 mol/l sporządzono odważając 40 g NaOH do kolby o pojemności 1 litr i uzupełniając wodą destylowaną do kreski.
- Roztwory HCl o stężeniach 1 oraz 3 mol/l przygotowano odmierzając odpowiednio 4,139 i 12,42 ml 37% HCl do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniając wodą destylowaną do kreski.
- Roztwory robocze przygotowywano codziennie przez odpowiednie rozcieńczenia wodą dejonizowaną i bezzwłocznie wykorzystywano.

3.1.3 Aparatura

Wszystkie analizy przeprowadzono za pomocą zintegrowanego systemu LC-4000 Series JASCO RHPLC (JASCO, Tokio, Japonia) wyposażonego w pompę poczwórną

z odgazowaniem (model nr PU-4180, Tokio, Japonia), automatyczny podajnik próbek (model nr AS-4150, Tokio, Japonia), termostat kolumnowy (model nr CO-4062, Tokio, Japonia) oraz detektor fluorescencyjny (model nr FP-4020, Tokio, Japonia), działający przy długościach fal wzbudzenia i emisji wynoszących odpowiednio 378 nm i 492 nm. Sygnał detektora został wzmocniony dziesięciokrotnie. Kontrola systemu oraz procesy pozyskiwania danych były realizowane przy użyciu oprogramowania ChromNAV2. Analizę widm przeprowadzono za pomocą oprogramowania Spectra Manager ver. 2.

Podczas etapu przygotowania próbek do analizy chromatograficznej wykorzystano ponadto następujące przyrządy i sprzęt laboratoryjny:

- waga laboratoryjna Scaltec SBC 21,
- waga laboratoryjna OHAUS, model Pioneer Pa214CM,
- pehametr firmy Mettler Toledo FiveEasy PLUS FP20 z elektrodą szklaną kombinowaną wyposażoną w czujnik temperatury,
- dejonizator wody firmy MILLIPORE, model MILI-Q-PLUS,
- wirówka firmy Hettich, model Mikro 220 R z funkcją chłodzenia,
- zamrażarka niskotemperaturowa Panasonic Healthcare Co. Ltd., model MDF-U55V-PE,
- pipety automatyczne firmy HTL,
- termostaty firmy Grant, modele QBH 2 i QBD 2,
- kolby miarowe, zlewki, szpatułki ze stali nierdzewnej, naczynka wagowe, lejki, probówki typu Eppendorf, probówki polipropylenowe, bursztynowe fiołki do HPLC.

3.1.4 Warunki chromatograficzne

Do badań wykorzystano samodzielnie opracowaną i zwalidowaną metodę opartą na technice RP-HPLC-FLD. W metodzie tej zastosowano przedkolumnową modyfikację chemiczną analitów z użyciem mBBr. Rozdzielenie chromatograficzne pochodnych analitów przeprowadzono w poniższych warunkach:

- faza stacjonarna: kolumna Aeris™ WIDEPORE XB-C18 (150 × 4,6 mm, 3,6 μm), Phenomenex, CA, USA;
- faza ruchoma: 0,1% TFA (składnik A) i 0,1% TFA w ACN (składnik B);
- objętość wprowadzanej próbki: 5 μl;
- temperatura rozdzielania chromatograficznego: 25 °C;

- prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min;
- czas analizy: 35 minut;
- program elucji: 0–5 min, 5% B; 5–11 min, 5–8% B; 11–18 min, 8–15% B; 18–20 min, 15–30% B; 20–25 min, 30–40% B; 25–26 min, 40–50% B; 26–30 min, 50–70% B; 30–33 min, 70–5% B; 33–35 min, 5% B.

Piki identyfikowano poprzez porównanie czasów retencji i widm fluorescencyjnych z odpowiednimi danymi pochodzącymi z analizy standardów.

3.1.5 Materiał badany

Próbki krwi (2×2 ml) pozyskane od potencjalnie zdrowych ochotników i pacjentów niehospitalizowanych pobierane były przez wykwalifikowany personel medyczny w ramach umowy współpracy pomiędzy Uniwersytetem Łódzkim a firmą Diagnostyka Laboratoria Medyczne sp. z o.o. W przypadku pacjentów hospitalizowanych z powodu objętej badaniem choroby reumatycznej, ośrodkiem odpowiedzialnym za pobranie oraz dostarczenie próbek do badań była Klinika Reumatologii z Pododdziałem Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi (obecnie: Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 2 w Łodzi). Krew pobierano na czczo poprzez wkłucie dożylnie do próbówki zawierającej EDTA, następnie umieszczano na lodzie i wirowano przy 3500 obr./min w temperaturze 4 °C przez 10 minut. Roztwór nad osadu komórkowego (osocze) przenoszony był następnie do odpowiednio oznakowanej uprzednio nadanym identyfikatorem oraz datą pobrania próbówki. Materiał do badań przygotowywano do transportu w sposób uniemożliwiający jego zanieczyszczenie, z zabezpieczeniem szczelności pojemników i w warunkach chłodniczych. Próbkę biologiczną wysyłało w dniu pobrania i transportowano bezpośrednio do Katedry Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, gdzie były poddane dalszym procedurom analitycznym lub przechowywane w temperaturze -80 °C do czasu analizy.

3.1.6 Charakterystyka badanych grup pacjentów

Ze względu na wykorzystanie w niniejszej pracy materiału biologicznego pochodzącego od ludzi, przed rozpoczęciem eksperymentu medycznego, uzyskano zgody na jego przeprowadzenie od odpowiednich komisji bioetycznych (Uchwała nr 10/KBBN-UŁ/I/2020-21 z dnia 15 grudnia 2020 r. Komisji ds. bioetyki badań naukowych Uniwersytetu Łódzkiego, Uchwała nr 64/2023 z dnia 20 czerwca 2023 r. Komisji

Bioetycznej przy Instytucie „Centrum Zdrowia Matki Polki”). Przed przystąpieniem do badania każdy z ochotników został poinformowany zarówno o jego celu, jak i warunkach ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej na rzecz uczestnika badania i osób, których skutki eksperymentu mogły bezpośrednio dotknąć, oraz wyraził zgodę na dobrowolne oddanie próbek krwi poprzez podpisanie formularza uświadomionej zgody na udział w badaniu.

3.1.6.1 Kategoria badanych osób oraz warunki włączenia uczestnika do badania

Próbki krwi pozyskane zostały od 25 potencjalnie zdrowych osób oraz 25 pacjentów ze zdiagnozowanym RZS płci męskiej i żeńskiej w zróżnicowanym wieku 18 – 80 lat zamieszkujących na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, którzy spełniali poniższe warunki wynikające z podziału na następujące grupy eksperymentalne i grupę kontrolną:

- Grupa badana I – hospitalizowani pacjenci ze zdiagnozowanym RZS, którzy zostali poddani leczeniu w specjalistycznym ośrodku medycznym przed przystąpieniem do badania;
- Grupa badana II – niehospitalizowani pacjenci ze zdiagnozowanym RZS, którzy poddani zostali leczeniu ambulatoryjnemu przed przystąpieniem do badania;
- Grupa kontrolna – ochotnicy potencjalnie zdrowi, u których nigdy nie zdiagnozowano żadnej choroby reumatycznej ani zaburzeń układu sercowo-naczyniowego.

Ochotnicy byli osobami nienadużywającymi alkoholu, niepalącymi i deklarującymi niestosowanie żadnych witamin, kortykosteroidów ani suplementów antyoksydacyjnych.

3.1.6.2 Warunki wykluczenia uczestnika z badania

Ze względu na towarzyszącą hiperhomocysteinemię, z badania wykluczone zostały kobiety, które urodziły dzieci z defektem cewy nerwowej, a także osoby ze zdiagnozowanymi chorobami sercowo-naczyniowymi i mózgowo-naczyniowymi oraz takimi schorzeniami jak: cukrzyca, nowotwory, niewydolność nerek, niedoczynność tarczycy, AIDS oraz upośledzenie poznawcze.

3.1.6.3 Rekrutacja uczestników badania

Pacjenci z grup badanych I i II rekrutowani byli na zasadach doboru ochotniczego przy udziale lekarzy współpracujących poprzez rozmowę i przeprowadzenie wywiadu

medycznego z potencjalnymi uczestnikami (zapoznanie się pacjenta z informacjami o badaniu, określenie stanu zdrowia pacjenta, zapoznanie z historią medyczną, określenie, czy pacjent spełnia kryteria włączenia i wyłączenia, omówienie z pacjentem celu, charakteru, ryzyka i korzyści płynących z udziału w badaniu, wyrażenie świadomej zgody pacjenta na udział w badaniu). Ochotnicy z grupy kontrolnej rekrutowani byli na zasadach doboru ochotniczego. O zakwalifikowaniu do badania uczestników z grupy kontrolnej decydował wywiad medyczny przeprowadzony przez lekarza medycyny rodzinnej.

3.1.7 Walidacja opracowanej metody chromatograficznej

Opracowana metoda została poddana walidacji zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ICH) oraz Agencji ds. Żywności i Leków (FDA) [147,148]. W ramach pracy sprawdzono takie parametry metody jak granica wykrywalności (LOD), granica oznaczalności (LOQ), zakres liniowości, precyzja wyrażona względnym odchyleniem standardowym (RSD), dokładność wyrażona odzyskiem, a także efekt matrycy.

3.1.7.1 Przygotowanie wzorców kalibracyjnych

W celu przygotowania standardów kalibracyjnych, do probówki typu Eppendorf wprowadzono 70 µl osocza, a następnie wzbogacono je 10 µl mieszaniny disiarczaków, uzyskując następujące stężenia: 1,76, 3,0, 5,0, 20,0, 25,0, 30,0 mg/ml osocza dla HSA; 0,29, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 nmol/ml osocza dla α-LA; 1,16, 3,0, 5,0, 10,0, 20,0, 35,0 nmol/ml osocza dla GSH; 9,83, 20,0, 35,0, 50,0, 250,0, 450,0 nmol/ml osocza dla Cys; 0,55, 1,0, 3,0, 5,0, 20,0, 40,0 nmol/ml osocza dla Hcy; 0,34, 1,0, 5,0, 10,0, 30,0, 50,0 nmol/ml osocza dla NAC oraz 1,45, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 45,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly. W kolejnym etapie dodano 20 µl 1-oktanolu. Następnie przeprowadzono redukcję wiązań disiarczkowych przez pięć minut w temperaturze pokojowej, stosując 30 µl mieszaniny zawierającej 6 mol/l NaBH₄ i DMSO (2:1, v:v), po czym dodano 6 µl 3 mol/l HCl. Po zakończeniu reakcji redukcji do mieszaniny dodano 657 µl buforu Tris-HCl o stężeniu 0,2 mol/l i pH 9,5. W końcowym etapie przeprowadzono chemiczną modyfikację analitów z użyciem 7 µl 0,1 mol/l mBBR przez 10 minut w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie 200 µl 1 mol/l HCl. Ostatecznie pobrano 5 µl próbki do dalszej analizy.

3.1.7.2 Wyznaczenie zakresu liniowości

Liniowość opracowanej metody została wyznaczona w oparciu o metodę krzywej wzorcowej. Dla każdego związku przeprowadzono trzy niezależne pomiary w każdym z sześciu punktów kalibracyjnych, odpowiadających zawartości analitów w próbkach rzeczywistych. Krzywe wzorcowe skonstruowano wykreślając średnie pole powierzchni piku odpowiedniej pochodnej bimanowej tiolu w funkcji stężenia analitu. Równanie krzywej kalibracyjnej wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów (regresji liniowej). Zakres liniowości wynosił odpowiednio: 1,76 – 30,0 mg/ml osocza dla HSA, 0,29 – 5,0 nmol/ml osocza dla α -LA, 1,16 – 35,0 nmol/ml osocza dla GSH, 9,83 – 450,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,55 – 40,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,34 – 50,0 nmol/ml osocza dla NAC oraz 1,45 – 45,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly.

3.1.7.3 Wyznaczenie granic wykrywalności i oznaczalności

W celu wyznaczenia LOD i LOQ sporządzono krzywą kalibracyjną dla każdego z analitów, przeprowadzając uprzednio pomiary dla sześciu poziomów stężeń, tj.: 1,0, 3,0, 5,0, 20,0, 25,0, 30,0 mg/ml osocza dla HSA; 0,1, 0,3, 0,5, 2,0, 4,0, 5,0 nmol/ml osocza dla α -LA; 0,3, 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 35,0 nmol/ml osocza dla GSH; 5,0, 7,0, 10,0, 50,0, 250,0, 450,0 nmol/ml osocza dla Cys; 0,3, 0,5, 1,0, 5,0, 20,0, 40,0 nmol/ml osocza dla Hcy; 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0, 50,0 nmol/ml osocza dla NAC oraz 0,7, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 45,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly. Wszystkie próbki przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.1.7.1 i przeanalizowano w trzech powtórzeniach. LOD określono na podstawie odchylenia standardowego wyrazu wolnego oraz nachylenia krzywej kalibracyjnej zgodnie ze wzorem:

$$\text{LOD} = \frac{3,3\sigma}{s}$$

gdzie:

σ – odchylenie standardowe wyrazu wolnego,

S – współczynnik kierunkowy prostej (nachylenie krzywej kalibracyjnej).

Wartości LOQ dla badanych analitów zostały obliczone na podstawie LOD zgodnie z poniższym równaniem:

$$\text{LOQ} = 3\text{LOD}$$

3.1.7.4 Wyznaczenie precyzji i dokładności metody

W celu określenia precyzji i dokładności metody przygotowano próbki kontrolne (QCs) na czterech poziomach stężeń w zakresie krzywej kalibracyjnej. Precyzję

i dokładność wewnątrz serii analitycznej określono poprzez analizę trzech powtórzeń QCs na każdym z następujących poziomów stężeń w pojedynczym cyklu analitycznym: 1,76, 5,0, 15,0, 30,0 mg/ml osocza dla HSA; 0,29, 0,9, 1,75, 4,0 nmol/ml osocza dla α -LA; 1,16, 4,0, 15,0, 30,0 nmol/ml osocza dla GSH; 9,83, 30,0, 100,0, 350,0 nmol/ml osocza dla Cys; 0,55, 1,7, 15,0, 30,0 nmol/ml osocza dla Hcy; 0,34, 1,0, 20,0, 40,0 nmol/ml osocza dla NAC oraz 1,45, 4,5, 20,0, 35,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly. Próbkę przygotowano zgodnie z opracowaną procedurą (opis w podrozdziale 3.1.7.1) i poddano analizie chromatograficznej. Precyzję i dokładność pomiędzy cyklami analitycznymi wyznaczono poprzez analizę QCs na każdym z wyżej wymienionych poziomów stężeń w trzech cyklach analitycznych przeprowadzonych w ciągu trzech kolejnych dni. Dokładność wyrażano jako stopień % odzysku analitu dodanego do znanej ilości próbki, natomiast precyzję określono jako względne odchylenie standardowe (RSD, %).

3.1.7.5 Ocena wpływu matrycy

Ocena efektu matrycowego została przeprowadzona poprzez analizę trzech powtórzeń QCs o niskim, średnim oraz wysokim stężeniu analitów, wynoszącym odpowiednio: 7,0, 50,0, 250,0 nmol/ml osocza dla Cys; 2,0, 10,0, 30,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly; 0,5, 5,0, 20,0 nmol/ml osocza dla GSH i Hcy; 0,5, 2,0, 4,0 nmol/ml osocza dla α -LA; 5,0, 10,0, 150,0 nmol/ml osocza dla NAC oraz 5,0, 10,0, 25,0 mg/ml osocza dla HSA. Próbkę przygotowano z wykorzystaniem osocza pochodzącego od pięciu różnych osób, zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.1.7.1.

3.1.8 Zastosowanie opracowanej procedury analitycznej do analizy próbek rzeczywistych

Opracowaną metodę wykorzystano do oznaczenia tioli całkowitych w próbkach osocza pochodzących od 25 potencjalnie zdrowych ochotników oraz 25 pacjentów ze zdiagnozowanym RZS. Aby uniknąć wpływu matrycy zastosowano metodę jednokrotnego dodatku wzorca. W tym celu wykonano pomiary sygnału analitycznego dla próbek osocza zawierających jedynie analit oraz dla próbek osocza z dodatkiem znanej ilości standardu w następujących stężeniach: 50,0 nmol/ml osocza dla Cys i NAC, 20,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, GSH i Hcy, 4,0 nmol/ml osocza dla α -LA oraz 10,0 mg/ml osocza dla HSA. Procedura przygotowania próbki do analizy była identyczna jak przedstawiona w podrozdziale 3.1.7.1. Pomiary wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej z próbek.

3.1.9 Analiza statystyczna

Wszystkie obliczenia, wykresy i analizy statystyczne zostały przeprowadzone za pomocą programu Microsoft Excel 16.0 (Microsoft Corporation) oraz platformy Statistics Kingdom. Każda wartość na krzywych kalibracyjnych przedstawia średnią z co najmniej trzech niezależnych pomiarów, z uwzględnionymi odchyleniami standardowymi (SD). O ile nie zaznaczono inaczej, wykresy przedstawiają reprezentatywny zestaw wyników uzyskanych z próbki osocza pochodzącej od jednej osoby. Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SD z co najmniej trzech, niezależnych analiz chromatograficznych. Wartość $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotną. Normalność rozkładu danych oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka, a następnie – w zależności od jego wyników – zastosowano odpowiedni test parametryczny lub nieparametryczny. Homogeniczność wariancji została sprawdzona za pomocą testu Levene'a, który ocenia, czy wariancje w obu grupach są równe. Różnice między dwiema grupami oceniono za pomocą testu t-Studenta, t-Welcha lub testu U Manna-Whitneya. Dla każdej zmiennej obliczono wartości średnie i SD lub mediany (Me) i kwartyle (Q1, Q3) w zależności od rozkładu danych. Do wyznaczenia równania krzywej kalibracyjnej zastosowano model regresji liniowej oparty o metodę najmniejszych kwadratów.

3.2 Wyniki i dyskusja

W niniejszym podrozdziale przedstawiono wyniki badań dotyczących oznaczania wybranych tioli osocza, w tym HSA, u pacjentów z RZS. Uzyskane dane poddano szczegółowej analizie, koncentrując się na ocenie różnic między grupą badaną a grupą kontrolną oraz możliwych zależnościach pomiędzy zaburzeniami metabolicznymi a ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych. Zaprezentowane wyniki zestawiono z dostępnymi danymi literaturowymi, co umożliwiło identyfikację ewentualnych zgodności i rozbieżności w odniesieniu do wcześniejszych badań. Omówiono także znaczenie zaobserwowanych zmian w kontekście patogenezy chorób reumatycznych oraz ich potencjalnych konsekwencji klinicznych. W ramach dyskusji przeanalizowano możliwe mechanizmy leżące u podstaw uzyskanych wyników, uwzględniając zarówno czynniki biologiczne, jak i środowiskowe. Zwrócono również uwagę na kierunki dalszych badań, które mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia roli badanych biomarkerów w monitorowaniu i leczeniu pacjentów z RZS.

3.2.1 Procedura przygotowania próbek rzeczywistych do analizy chromatograficznej

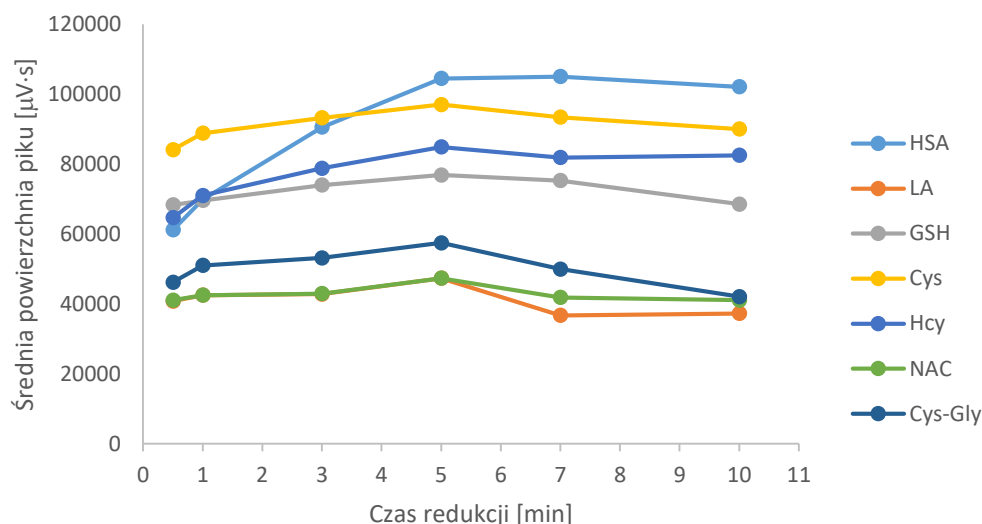
Oznaczanie związków tiolowych w próbkach biologicznych stanowi niezwykle trudne zadanie ze względu na ich wysoką aktywność oksydoredukcyjną. Ponadto większość endogennych tioli nie wykazuje odpowiednich właściwości strukturalnych umożliwiających generowanie sygnału kompatybilnego ze standardowymi detektorami, takimi jak spektrofotometryczny (UV-Vis) czy FLD. W przypadku stosowania tych metod detekcji konieczne jest przeprowadzenie dodatkowego etapu przygotowania próbki do analizy, a mianowicie reakcji chemicznej modyfikacji analitów, zwanej także derywatyzacją. Niemniej jednak proces ten wydłuża całkowity czas analizy i zwiększa ryzyko błędu analitycznego. W układach biologicznych związki tiolowe występują głównie w postaci utlenionej lub związanej z białkami, dlatego przed etapem przeprowadzenia analitów w odpowiednie pochodne, należy przeprowadzić redukcję wiązań disiarczkowych do grup tiolowych. Do najczęściej stosowanych reduktorów należą NaBH_4 [146,149–151], DTT [146,152–154], TCEP [146,155–158] oraz 2-merkaptoetanol (2-ME) [146,154,159]. Wybór odpowiedniego reduktora zależy od zastosowanej procedury analitycznej, w szczególności od rodzaju odczynnika derywatyzującego oraz metody detekcji. Zastosowanie odczynników zawierających grupę sulfhydrylową, takich jak 2-ME lub DTT, jest niemal niemożliwe w przypadku odczynników derywatyzujących o wysokiej selektywności względem grupy $-\text{SH}$. Powstające pochodne prowadzą do nadmiernego zużycia odczynnika derywatyzującego, co może skutkować zaniżeniem wyników oznaczeń. Dodatkowo produkty te interferują z pikami analitów, generując na chromatogramie dodatkowe, intensywne sygnały, które utrudniają interpretację wyników. Ograniczenia w stosowaniu trialkilofosfin wynikają głównie z ich toksyczności, a także z intensywnego, drażniącego zapachu. Ponadto najczęściej wykorzystywana fosfina, TCEP, może reagować z niektórymi odczynnikami derywatyzującymi, takimi jak mBBR [146,160,161] czy 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesan [146,162]. Najbardziej optymalnym odczynnikiem redukującym wydaje się NaBH_4 . Jest nietoksyczny, łatwo dostępny, a jego nadmiar można szybko usunąć poprzez dodatek kwasu solnego lub acetonu. Główną zaletą tego reduktora jest krótki czas reakcji przy stosowaniu wysokich stężeń odczynnika. Niestety, ze względu na niestabilność NaBH_4 w roztworach wodnych, musi on być przygotowywany bezpośrednio przed użyciem. Jego trwałość można jednak zwiększyć poprzez dodatek rozpuszczalnika organicznego,

takiego jak DMSO. Główną wadą stosowania NaBH_4 jest jego tendencja do tworzenia aerozoli w wyniku intensywnego wydzielania wodoru w trakcie reakcji. Jednakże zjawisko to można zminimalizować poprzez dodatek surfaktantów, takich jak n-oktanol. Tiole powstałe w wyniku redukcji mogą ulegać ponownemu utlenieniu, dlatego produkt reakcji powinien natychmiast zostać poddany reakcji chemicznej modyfikacji w celu zabezpieczenia labilnej grupy $-\text{SH}$. Ponadto proces utleniania tioli do disiarczków katalizowany przez kationy metali może zostać spowolniony poprzez dodatek związku kompleksującego, np. EDTA- Na_2 . W przypadku oznaczania tioli w próbkach biologicznych za pomocą HPLC-FLD, szerokie zastosowanie znalazły odczynniki derywatyzujące, takie jak mBBR^[146,149,150,153,163–165], 4-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolo-7-sulfonian amonu (SBD-F)^[146,166,167], ABD-F^[146,168,169], o-ftalaldehyd^[146,170,171] oraz 4-(bromometylo)-7-(dietyloamino)kumaryna^[146,172,173]. Większość z tych odczynników zawiera w swojej strukturze aktywny halogen, który w reakcji substytucji nukleofilowej zostaje wymieniony na atom siarki grupy tiolowej analitu, prowadząc do powstania stabilnego tioeteru.

3.2.1.1 Redukcja wiązań disiarczkowych

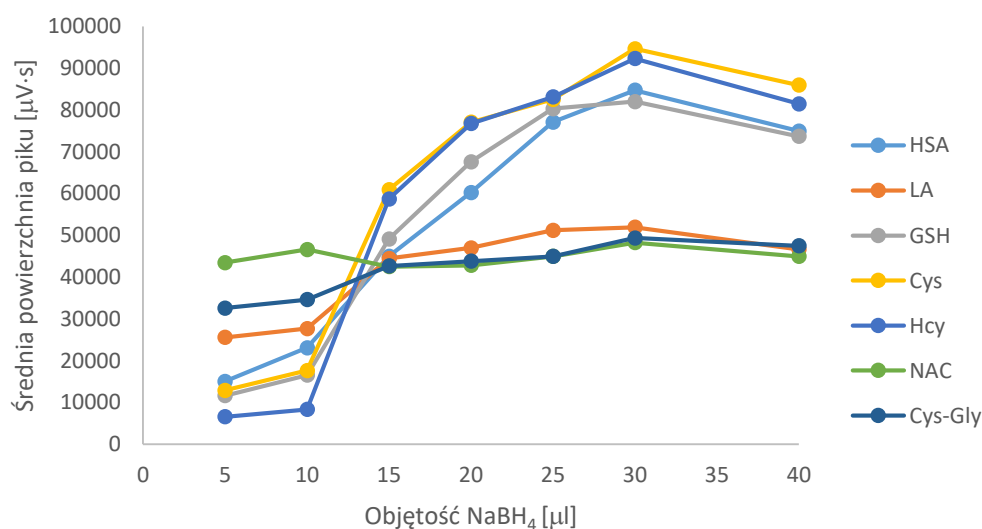
Oznaczenie tioli całkowitych wiąże się z koniecznością przeprowadzenia redukcji wiązań disiarczkowych, gdyż, jak już wspomniano, związki te występują w osoczu w formie utlenionej, tworząc symetryczne lub mieszane disiarczki oraz wiążąc się z białkami, głównie albuminą. Fakt ten sprawia, że grupy $-\text{SH}$ są niedostępne dla odczynnika derywatyzującego, w związku z czym niezbędne jest rozerwanie mostków disiarczkowych w celu uwolnienia grup tiolowych. W ramach niniejszej pracy do tego celu wykorzystano NaBH_4 .

Podczas opracowywania protokołu przygotowania próbki do analizy, sprawdzono wpływ czasu reakcji oraz molowego nadmiaru borowodorku sodu na przebieg redukcji. Maksymalną efektywność reakcji uzyskano po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej (Rysunek 8).



Rysunek 8. Kinetyka reakcji redukcji wiązań disiarczkowych za pomocą 6 mol/l NaBH_4 , $n = 3$

Największe pola powierzchni pików dla wszystkich analitów zaobserwowano natomiast przy zastosowaniu 30 μl roztworu NaBH_4 o stężeniu 6 mol/l (Rysunek 9). Fiskerstrand i wsp. ^[164] wykorzystywali niższe stężenie NaBH_4 (4 mol/l), a także stosowali krótszy czas redukcji (3 minuty), jednak w celu uzyskania maksymalnej wydajności oznaczeń wszystkich składników tiolowych, tj. Hcy, Cys-Gly i Cys, konieczne było dodatkowe zastosowanie ditioerytrytolu (DTE). Alternatywne podejście podczas oznaczania całkowitej zawartości tioli w osoczu zastosował Mansoor i wsp. ^[150], inkubując próbki jednocześnie z NaBH_4 (2 mol/l) oraz mBBR przez 10 minut w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła. W obu metodach do próbki także dodawano 30 μl roztworu NaBH_4 .

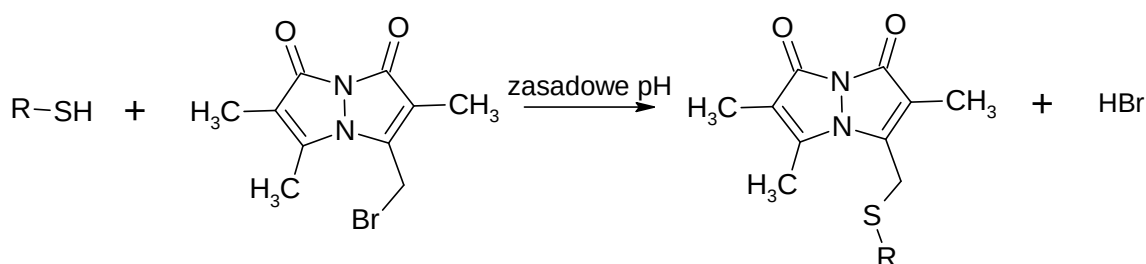


Rysunek 9. Wpływ nadmiaru reduktora na pola powierzchni pików badanych związków tiolowych, $n = 3$

W opracowanym protokole do próbki zawierającej zredukowane tiole dodano 6 μl roztworu HCl o stężeniu 3 mol/l w celu usunięcia nadmiaru reduktora. Aby zapobiec pienieniu mieszaniny reakcyjnej spowodowanemu intensywnym wydzielaniem wodoru, zgodnie z wcześniej opisanymi metodami ^[150,164], do próbek osocza dodano 20 μl n-oktanolu. Tak zoptymalizowane warunki redukcji zostały zaadaptowane do rutynowej analizy osocza pod kątem całkowitej zawartości tioli, w tym HSA.

3.2.1.2 Chemiczna modyfikacja analitów (derywatyzacja) poprzez grupę –SH

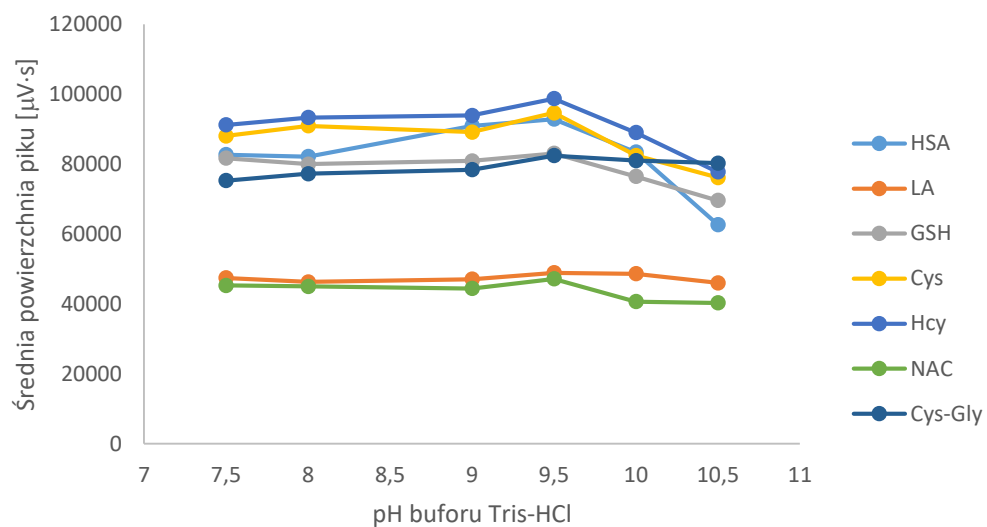
Ponieważ tiole nie zawierają w swojej strukturze fluoroforu umożliwiającego ich bezpośrednią detekcję fluorymetryczną, konieczne jest przeprowadzenie reakcji chemicznej modyfikacji analitów podczas etapu przygotowania próbki do analizy. Do tego celu zastosowano mBBR, który gwałtownie reaguje z tiolami w warunkach zasadowych oraz w temperaturze pokojowej. Powstające w wyniku tej reakcji (Rysunek 10) wysoce fluorescencyjne i stabilne tioetery mogą być łatwo wykrywane, nawet przy niskich stężeniach analitu.



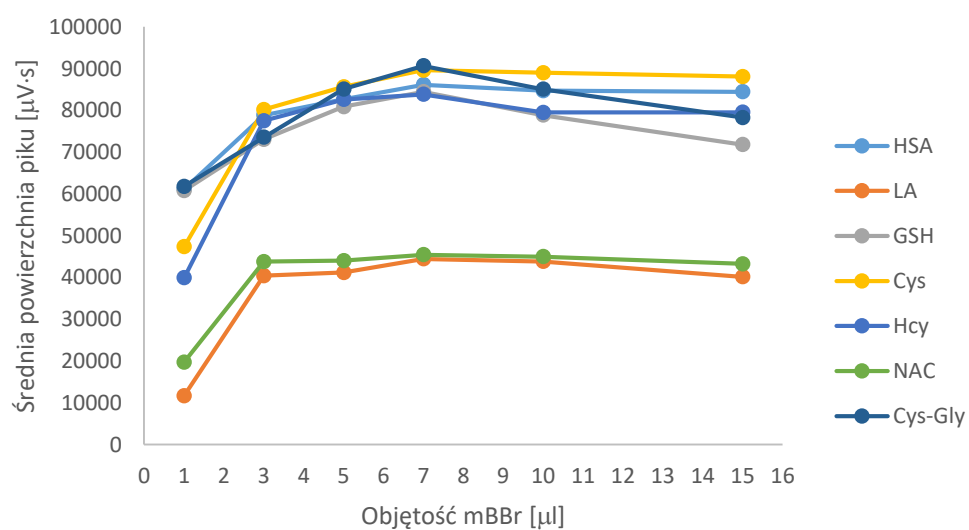
Rysunek 10. Ogólne równanie reakcji chemicznej modyfikacji tioli za pomocą mBBR

Sam mBBR wykazuje fluorescencję, a jego pik jest widoczny na chromatogramie wraz z produktami hydrolizy. Monobromobimane ulega łatwej fotodegradacji, dlatego konieczne jest jego zabezpieczenie przed światłem oraz prowadzenie reakcji w ciemności.

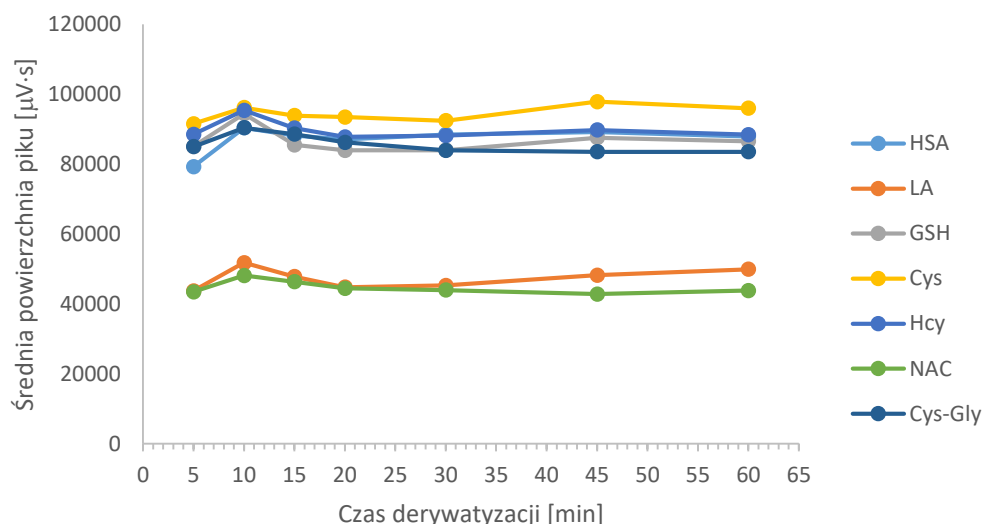
Wydajność reakcji derywatyzacji została zoptymalizowana pod kątem pH (Rysunek 11), nadmiaru odczynnika (Rysunek 12) oraz czasu reakcji (Rysunek 13).



Rysunek 11. Zależność przedstawiająca wpływ pH 0,2 mol/l buforu Tris-HCl na powierzchnie pików badanych analitów, $n = 3$

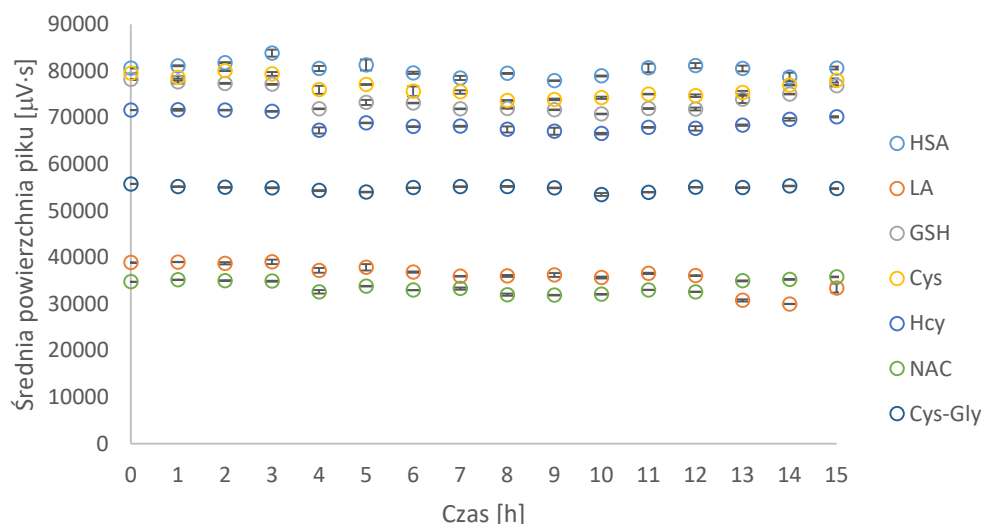


Rysunek 12. Zależność przedstawiająca wpływ nadmiaru odczynnika derywatyzującego na pola powierzchni pików badanych analitów, $n = 3$



Rysunek 13. Kinetyka reakcji derywatyzacji tioli za pomocą 0,1 mol/l mBBR, $n = 3$

Otrzymane wyniki wskazują, że optymalne pH dla upochodnienia endogennych tioli osocza z użyciem mBBR wynosiło 9,5, a reakcja została zakończona po 10 minutach w warunkach 70-krotnego nadmiaru odczynnika, bez dostępu światła i w temperaturze pokojowej. Opracowane warunki były zbliżone do wcześniej opisanych metod, w których reakcję prowadzono w buforze N-etyloformorfinowym o pH 9 przez 10^[150] lub 20 minut^[149]. Reakcję derywatyzacji zatrzymano poprzez dodanie 200 μ l roztworu HCl o stężeniu 1 mol/l w celu uzyskania pH 3. Do zakończenia reakcji chemicznej modyfikacji tioli za pomocą mBBR stosuje się również inne kwasy, takie jak kwas chlorowy(VII)^[150] lub lodowaty kwas octowy^[164], jednak ich użycie w tej procedurze mogłoby doprowadzić do wytrącenia HSA. Krótkoterminowa stabilność adduktów tiol-biman nie została wówczas opisana w literaturze, dlatego została poddana ocenie w trakcie badań. Uzyskane wyniki wskazują, że dla wszystkich analitów pochodne tiol-biman pozostają stabilne w środowisku kwaśnym w badanym przedziale czasowym (Rysunek 14). Oznacza to, że końcowy roztwór przechowywany w automatycznym podajniku próbek w temperaturze pokojowej może być bezpiecznie analizowany przez okres do 15 godzin, co umożliwia długotrwałe, bezobsługowe serie pomiarowe.



Rysunek 14. Stabilność adduktów tiol-bimane w automatycznym podajniku próbek, badana w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła, $n = 3$

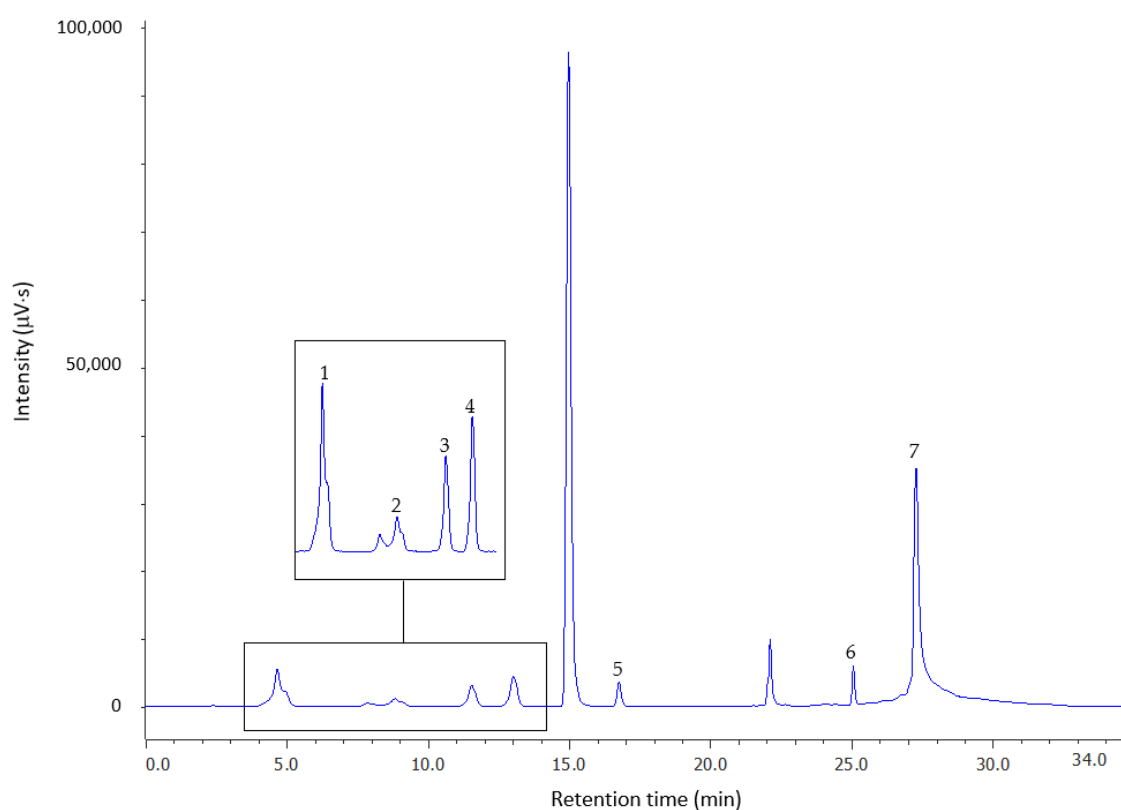
3.2.2 Optymalizacja warunków chromatograficznych

Wybór odpowiednich warunków chromatograficznych jest kluczowym etapem przy rozwijaniu metod jednoczesnego oznaczania wielu analitów w złożonych matrycach biologicznych, w tym osoczu. Optymalizacja, takich parametrów jak rodzaj fazy stacjonarnej, skład fazy ruchomej czy profil elucji gradientowej, determinuje zdolność metody do odróżniania analitów od siebie oraz od innych endogennych składników próbki, minimalizując tym samym koelucję i interferencje na chromatogramie. Przykładowo, wybór odpowiedniego pH eluentu może wpływać na stan jonizacji analitów, a w efekcie na ich czasy retencji i wydajność separacji. Ponadto właściwie dobrane warunki rozdzielania chromatograficznego zwiększają czułość metody poprzez poprawę rozdzielczości pików i intensywności sygnałów, zapewniając niższe granice wykrywalności. Odporne metody analityczne dają wiarygodne wyniki w różnych warunkach. Staranny dobór warunków chromatograficznych zapewnia, że nawet niewielkie wahania parametrów eksperymentalnych nie wpłyną negatywnie na wydajność metody. Próbkę biologiczną są złożonymi matrycami zawierającymi ogromną ilość substancji endogennych, takich jak białka czy lipidy, które mogą zakłócać poprawne wykrycie i oznaczenie analitów. Wybór odpowiednich warunków chromatograficznych w połączeniu z efektywnymi technikami przygotowania próbek do analizy zmniejsza wpływ matrycy, zwiększając przy tym odzysk analitów. Optymalizacja parametrów chromatograficznych równoważy potrzebę wydajnej separacji z relatywnie krótkimi czasami analizy. Czynniki, takie jak długość kolumny, rozmiar cząstek fazy stacjonarnej

czy prędkość przepływu fazy ruchomej są dostosowywane przez analityka w celu uzyskania optymalnej rozdzielczości w rozsądnych ramach czasowych. Przykładowo, użycie krótszych kolumn o mniejszych rozmiarach cząstek może skrócić czas analizy przy jednoczesnym zachowaniu odpowiedniego rozdzielania wielu składników próbki. Podsumowując, skrupulatny wybór odpowiednich warunków chromatograficznych jest niezbędny do opracowania nowej metody analitycznej umożliwiającej ilościowe oznaczenie wielu analitów w płynach biologicznych, zapewniając wysoką selektywność, czułość i rozdzielczość, które są krytyczne dla sukcesu metody w zastosowaniach klinicznych.

Wstępne eksperymenty mające na celu opracowanie metody jednoczesnego oznaczania tioli niskocząsteczkowych oraz HSA w osoczu przeprowadzono z użyciem wodnych roztworów standardowych analizowanych związków. W celu optymalizacji warunków rozdzielania chromatograficznego zbadano różne parametry, takie jak rodzaj kolumny, skład fazy ruchomej, prędkość przepływu eluentu, tryb elucji oraz temperaturę w jakiej termostатовano kolumny. Przetestowano trzy kolumny, w tym Accucore 150-C4 ($150 \times 4,6$ mm, $2,6 \mu\text{m}$), Aeris™ WIDEPORÉ XB-C18 ($150 \times 4,6$ mm, $3,6 \mu\text{m}$) oraz Jupiter C18 ($150 \times 4,6$ mm, $5 \mu\text{m}$). Kolumna WIDEPORÉ XB-C18 wykazała najlepsze właściwości w zakresie rozdzielania pików, ich kształtu oraz czasu retencji, dlatego wybrano ją do dalszych badań. W celu wyboru optymalnej fazy ruchomej przetestowano różne układy rozpuszczalników, w tym kwas octowy i ACN, kwas octowy i metanol (MeOH), kwas trichlorooctowy (TCA) i ACN, TCA i MeOH, bufor cytrynianowy o pH 2,5 i ACN, TFA i ACN. Ostatecznie, jako fazę ruchomą do oznaczania niskocząsteczkowych tioli obok HSA wybrano układ 0,1% wodny roztwór TFA (A) i 0,1% roztwór TFA w ACN (B). Aby uzyskać dobrą rozdzielczość oraz skrócić czas analizy, zastosowano program elucji gradientowej ze stałą prędkością przepływu fazy ruchomej wynoszącą 1 ml/min oraz temperaturą kolumny równą 25 °C. Wszystkie przeprowadzone eksperymenty doprowadziły do ustalenia optymalnych warunków chromatograficznych dla każdego z analitów, które opisano w podrozdziale 3.1.4. W zoptymalizowanych warunkach chromatograficznych czasy retencji wynosiły: 5,14 min (RSD = 0,86%, n = 3) dla Cys, 9,63 min (RSD = 0,77%, n = 3) dla Cys-Gly, 12,30 min (RSD = 0,61%, n = 3) dla Hcy, 13,76 min (RSD = 0,42%, n = 3) dla GSH, 17,07 min (RSD = 0,74%, n = 3) dla NAC, 25,08 min (RSD = 0,07%, n = 3) dla α -LA oraz 27,82 min (RSD = 0,05%, n = 3) dla HSA. Jak można zauważyć na chromatogramie przedstawionym na Rysunku 15, cztery pochodne tioli niskocząsteczkowych eluują

parami: GSH w bliskim sąsiedztwie Hcy oraz Cys w pobliżu Cys-Gly, jednak w tym przypadku sygnały te są oddzielone pikami reagenta. Wyniki te są zgodne z uzyskanymi dla pochodnych CMQT [146,151,157]. Dłuższy łańcuch hydrofobowy NAC oraz zredukowanego α -LA powoduje, że związki te eluują później niż pozostałe tiole. Pochodna HSA wykazuje najwyższą hydrofobowość i eluowała jako ostatnia. Współczynniki retencji dla wszystkich analitów zmieniały się w zależności od stężenia i pH TFA stosowanego w fazie wodnej, co było konsekwencją zmiany hydrofobowości eluentu oraz stopnia jonizacji analitu. Pomimo dużych różnic w wielkości cząsteczek analizowanych biotiole, optymalizacja warunków chromatograficznych umożliwiła skuteczne rozdzielenie wszystkich analitów.



Rysunek 15. Chromatogram uzyskany dla wodnych roztworów związków standardowych tioli niskocząsteczkowych oraz HSA po redukcji NaBH_4 i reakcji chemicznej modyfikacji za pomocą mBBR ; warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 3.1.4; kolejność elucji: 1 – Cys, 2 – Cys-Gly, 3 – Hcy, 4 – GSH, 5 – NAC, 6 – LA, 7 – HSA; niepodpisane piki pochodzą od mBBR i produktów jego hydrolizy

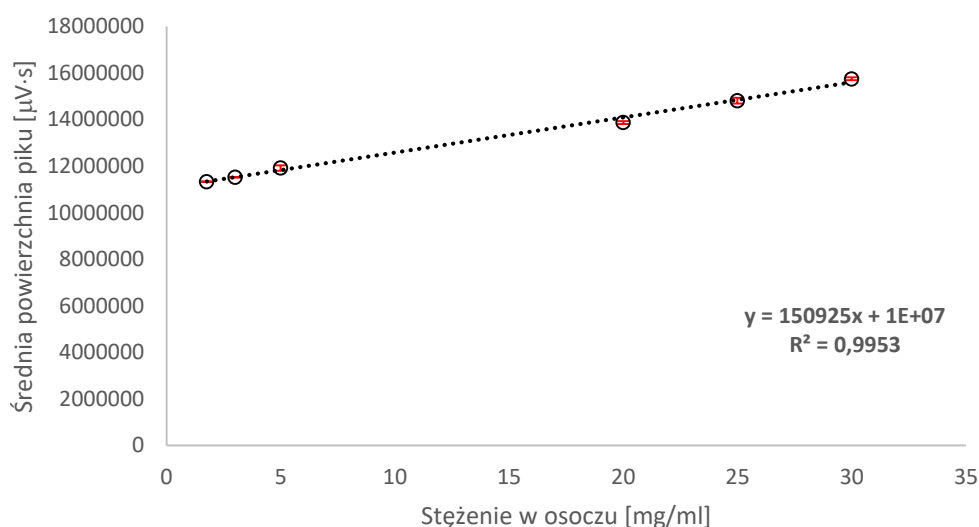
3.2.3 Walidacja opracowanej metody chromatograficznej

Walidacja metody analitycznej jest kluczowym etapem procesu opracowywania i wdrażania procedury oznaczania analitów w próbkach biologicznych. Zapewnia ona dokładność oraz powtarzalność wyników, co ma fundamentalne znaczenie w analizie

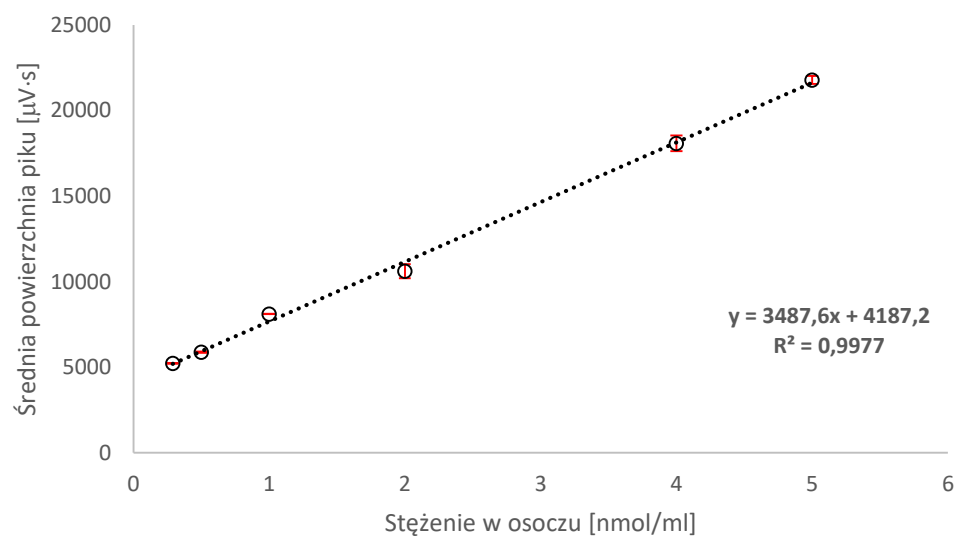
klinicznej. Proces walidacji przeprowadzono zgodnie z wytycznymi FDA oraz ICH [147,148], które określają wymagania dotyczące parametrów walidacyjnych, takich jak selektywność, liniowość, LOD, LOQ, precyzja oraz dokładność. W przeprowadzonych badaniach zweryfikowano również stabilność analitów oraz wpływ matrycy biologicznej na wyniki oznaczeń. Przeprowadzenie kompleksowej walidacji pozwala na zapewnienie zgodności metody z wymaganiami regulatorowymi oraz jej zastosowanie w rutynowych analizach. Wyniki uzyskane w trakcie procesu walidacyjnego omówiono w dalszej części podrozdziału.

3.2.3.1 Zakres liniowości, granice wykrywalności i oznaczalności

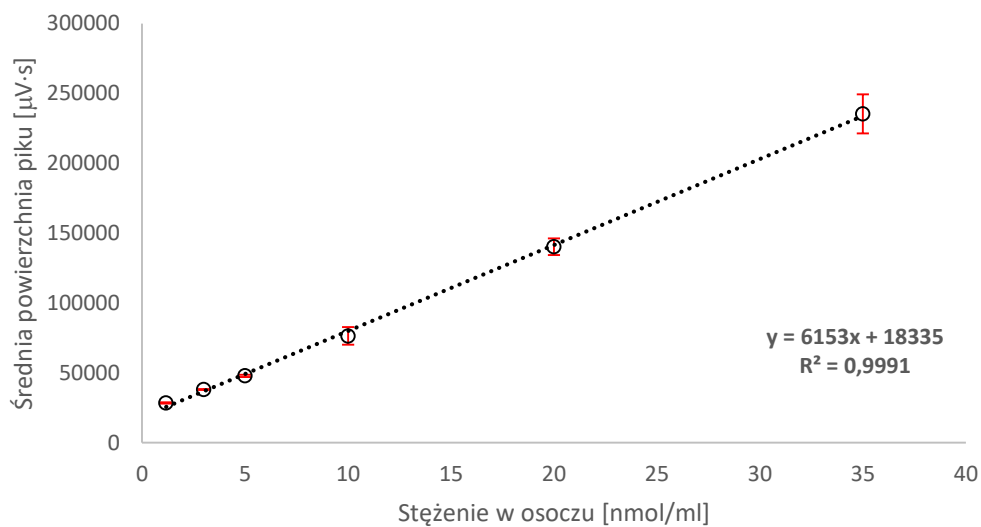
Liniowość metody została określona poprzez analizę próbek osocza wzbogaconych mieszaniną tioli, przygotowanych zgodnie z opisem w podrozdziale 3.1.7.2. Sześciopunktowe krzywe kalibracyjne ($n = 3$) sporządzone dla sześciu niskocząsteczkowych tioli oraz HSA przedstawiono na Rysunkach 16 – 22.



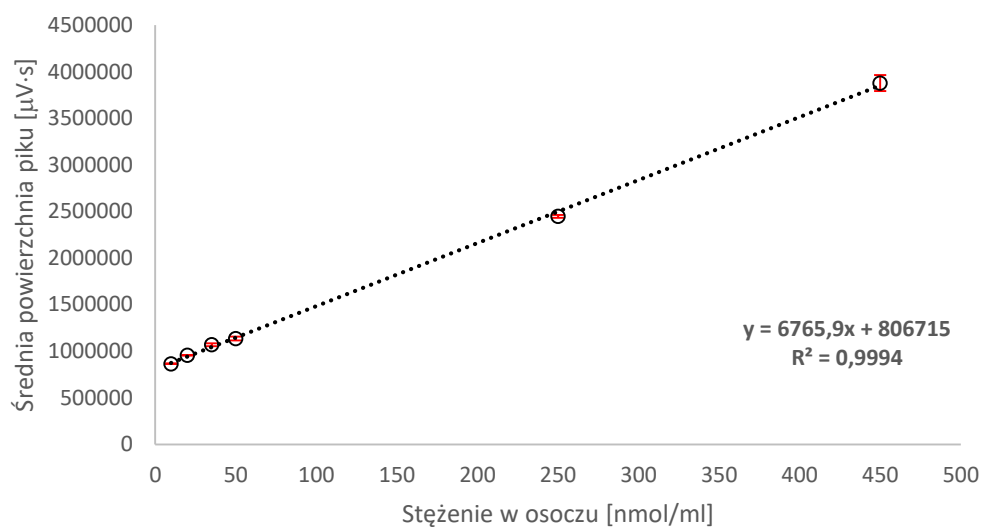
Rysunek 16. Krzywa kalibracyjna dla HSA sporządzona na podstawie zależności średniego pola powierzchni pików od stężenia analitu w osoczu, $n = 3$



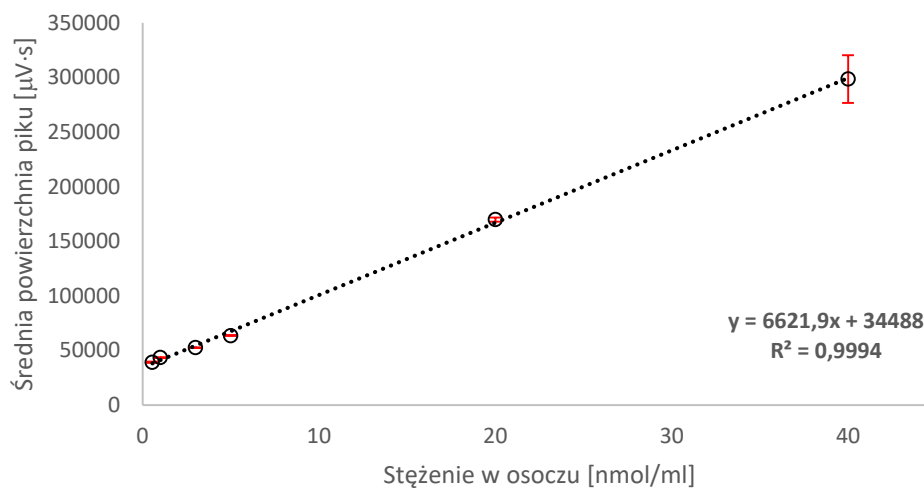
Rysunek 17. Krzywa kalibracyjna dla α -LA sporządzona na podstawie zależności średniego pola powierzchni pików od stężenia analitu w osoczu, $n = 3$



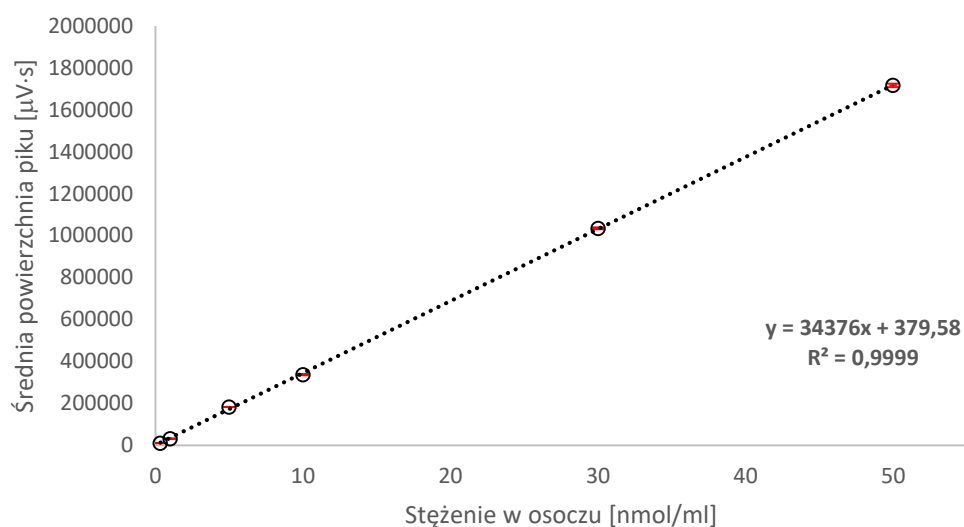
Rysunek 18. Krzywa kalibracyjna dla GSH sporządzona na podstawie zależności średniego pola powierzchni pików od stężenia analitu w osoczu, $n = 3$



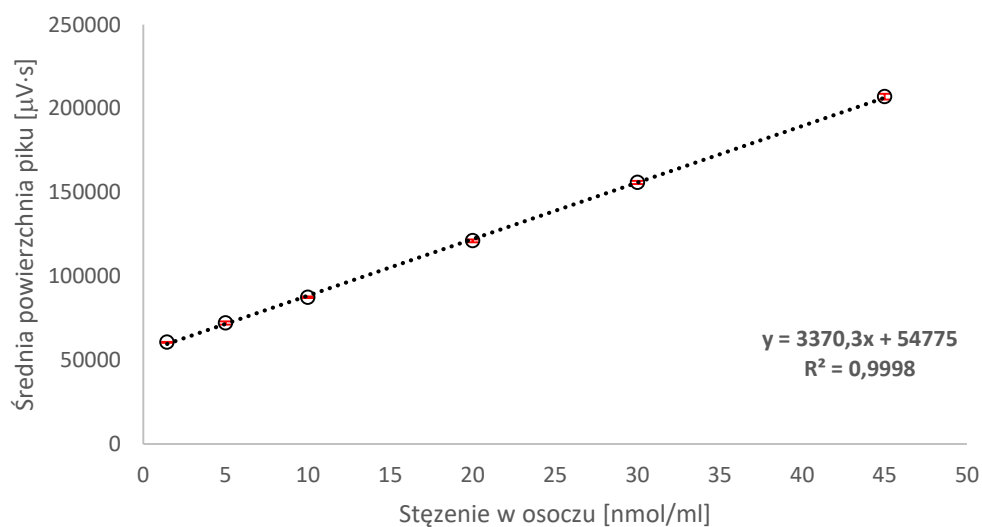
Rysunek 19. Krzywa kalibracyjna dla Cys sporządzona na podstawie zależności średniego pola powierzchni pików od stężenia analitu w osoczu, $n = 3$



Rysunek 20. Krzywa kalibracyjna dla Hcy sporządzona na podstawie zależności średniego pola powierzchni pików od stężenia analitu w osoczu, $n = 3$



Rysunek 21. Krzywa kalibracyjna dla NAC sporządzona na podstawie zależności średniego pola powierzchni pików od stężenia analitu w osoczu, $n = 3$



Rysunek 22. Krzywa kalibracyjna dla Cys-Gly sporządzona na podstawie zależności średniego pola powierzchni pików od stężenia analitu w osoczu, $n = 3$

Zakres liniowości, równanie regresji, współczynnik determinacji (R^2), LOD oraz LOQ zostały przedstawione w Tabeli 1. Wartości LOD wskazujące najniższe wykrywalne stężenia analitów wahały się od 0,10 do 3,28 nmol/ml osocza, przy czym dla HSA wynosiła ona 0,59 mg/ml osocza. Wartości LOQ wahały się od 0,29 do 9,83 nmol/ml osocza dla wszystkich analitów, z wyjątkiem HSA, dla której LOQ ustalono na 1,76 mg/ml osocza. Dokładność, wyrażona jako odzysk (%), dla obliczonych wstecznie stężeń każdego powtórzenia QCs mieściła się w zakresie $\pm 20\%$ nominalnego stężenia dla LOQ oraz $\pm 15\%$ dla pozostałych poziomów. Maksymalne wartości odzysku wahały się od 99,15% (GSH) do 115,77% (Hcy), podczas gdy minimalne wartości odzysku mieściły się w przedziale od 81,87% (NAC) do 96,34% (Cys-Gly), co dowodzi niezawodnej dokładności pomiaru. Precyzję, wyrażoną jako RSD, oceniano przy różnych poziomach stężeń. Maksymalne wartości RSD wahały się od 1,26% (NAC) do 11,93% (Hcy), podczas gdy minimalne wartości RSD mieściły się w przedziale od 0,17% (NAC) do 0,90% (Hcy, Cys-Gly), co wskazuje na wysoką powtarzalność metody. Metoda analityczna wykazała doskonałą liniowość w szerokim zakresie stężeń dla wszystkich analitów, przy R^2 przekraczających 0,9953. Największą wartość nachylenia krzywej kalibracyjnej, wskazującą na najczulszą odpowiedź, zaobserwowano dla HSA, podczas gdy najniższą odnotowano dla α -LA. Ustalone parametry walidacyjne potwierdzają niezawodność, czułość i przydatność metody do ilościowego oznaczania analitów docelowych w zastosowaniach bioanalitycznych.

3.2.3.2 Precyzja i dokładność metody

W celu oceny jakości opracowanej metody jednoczesnego oznaczania tioli osocza, w tym HSA, podczas etapu walidacji, określono precyzję i dokładność. Wartości precyzji i dokładności wewnątrz serii analitycznej oraz pomiędzy cyklami oznaczano w trzech powtórzeniach z zastosowaniem próbek kontrolnych na czterech poziomach stężeń, reprezentujących pełny zakres krzywych kalibracyjnych. Precyzję metody wyrażono jako RSD, natomiast dokładność wyrażono jako procentowy odzysk analitu, stosując następujący wzór:

$$\text{Odzysk (\%)} = \frac{(C_2 - C_0)}{C_1} \times 100\%$$

gdzie:

C_0 – stężenie oznaczanej substancji w próbce niewzbogaconej (zawartość endogenna),

C_1 – stężenie oznaczanej substancji dodane do próbki (zawartość oczekiwana),

Tabela 1. Dane walidacyjne dla metody jednoczesnego oznaczania HSA i niskocząsteczkowych tioli osocza z zastosowaniem przedkolumnowej modyfikacji chemicznej analitów mBBR^[146]

Analit	Równanie regresji	R ²	Zakres liniowości (nmol/ml)	RSD (%)		Odzysk (%)		LOD (nmol/ml)	LOQ (nmol/ml)
				Min.	Max.	Min.	Max.		
HSA	$y = 150925x + 10000000$	0,9953	1,76 – 30,0 ^a	0,40	5,80	92,94	113,67	0,59 ^a	1,76 ^a
α-LA	$y = 3487,6x + 4187,2$	0,9977	0,29 – 5,0	0,26	6,48	83,38	106,88	0,10	0,29
GSH	$y = 6153x + 18335$	0,9991	1,16 – 35,0	0,24	10,92	84,71	99,15	0,39	1,16
Cys	$y = 6765,9x + 806715$	0,9994	9,83 – 450,0	0,89	6,24	87,27	110,74	3,28	9,83
Hcy	$y = 6621,9x + 34488$	0,9994	0,55 – 40,0	0,90	11,93	83,89	115,77	0,18	0,55
NAC	$y = 34376x + 379,58$	0,9999	0,34 – 50,0	0,17	1,26	81,87	106,07	0,11	0,34
Cys-Gly	$y = 3370,3x + 54775$	0,9998	1,45 – 45,0	0,90	5,33	96,34	114,56	0,48	1,45

^a Jednostką miary zakresu liniowości, LOD i LOQ dla HSA jest mg/ml

C₂ – stężenie oznaczanej substancji w próbce wzbogaconej.

Precyzja i dokładność międzydniowa zostały ocenione w ciągu trzech kolejnych dni w tygodniu. Szczegółowe dane dotyczące precyzji i dokładności metody przedstawiono w Tabeli 2. Oszacowane parametry walidacyjne spełniały wymagania obowiązujące w przypadku analiz próbek biologicznych.

Tabela 2. Ocena precyzji i dokładności wewnątrz serii oraz pomiędzy cyklami analitycznymi na podstawie proponowanej metody jednoczesnego oznaczania HSA i niskocząsteczkowych tioli osocza z zastosowaniem mBBr, n = 3 ^[146]

Analit	Stężenie (nmol/ml) ^a	Precyzja (%)		Dokładność (%)	
		Wewnątrz serii	Pomiędzy seriami	Wewnątrz serii	Pomiędzy seriami
HSA	1,76	0,35	1,49	119,48	99,31
	5,0	0,10	4,83	96,77	109,77
	15,0	0,35	1,99	97,77	94,78
	30,0	0,37	2,47	100,65	101,05
α-LA	0,29	0,55	0,18	97,16	84,30
	0,9	0,34	0,03	104,90	95,83
	1,75	0,60	7,34	97,31	107,24
	4,0	0,20	9,18	100,28	98,91
GSH	1,16	1,50	2,87	89,10	116,57
	4,0	0,71	1,25	100,67	100,87
	15,0	0,05	0,28	101,31	97,14
	30,0	0,13	0,22	99,68	100,68
Cys	9,83	2,23	4,25	85,56	97,18
	30,0	2,66	2,22	93,51	115,62
	100,0	0,57	6,94	104,43	94,38
	350,0	0,10	10,71	99,70	100,35
Hcy	0,55	3,85	14,57	97,45	82,17
	1,7	5,34	2,55	88,30	90,84
	15,0	0,43	0,27	102,69	103,24
	30,0	0,01	3,69	99,37	99,22
NAC	0,34	0,25	0,11	85,24	98,98
	1,0	0,48	2,05	100,83	115,95
	20,0	0,29	0,73	100,42	98,48
	40,0	0,04	0,10	99,90	100,37
Cys-Gly	1,45	1,43	5,09	108,52	93,58
	4,5	0,19	1,58	85,16	82,99
	20,0	0,19	0,36	105,41	108,83
	35,0	0,70	0,19	98,46	97,41

^a Jednostką miary dla HSA jest mg/ml

3.2.3.3 Efekt matrycy

Ocena wpływu matrycy przeprowadzona w oparciu o analizę trzech powtórzeń QCs o niskim, średnim i wysokim stężeniu dla Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, NAC, HSA oraz α -LA, przygotowanych z osocza uzyskanego od pięciu różnych dawców, wykazała istnienie istotnego efektu matrycowego. Uzyskane wyniki ujawniły różnice w odpowiedzi analitycznej między próbkami pochodzącymi od różnych osób, co sugeruje znaczny wpływ indywidualnych cech matrycy na wyniki oznaczeń. Zgodnie z kryteriami ustalonymi dla efektu matrycy ^[174], precyzja oznaczeń nie powinna przekraczać 15%, a dokładność powinna mieścić się w granicach $\pm 15\%$ nominalnego stężenia. W niniejszym badaniu wartości te zostały przekroczone, co wskazuje na potencjalne interferencje wynikające z indywidualnych różnic w składzie osocza. Nadmierny wpływ matrycy może wynikać z faktu, że w badaniu wykorzystano próbki osocza od losowo wybranych osób w różnych grupach wiekowych, bez selekcji pod kątem stosowania leków, obecności chorób przewlekłych czy innych czynników wpływających na skład biochemiczny osocza.

3.2.4 Zastosowanie opracowanej metody chromatograficznej do analizy próbek osocza pochodzących od uczestników badania

Opracowana i zwalidowana metoda została zastosowana do jednoczesnego oznaczania sześciu niskocząsteczkowych tioli oraz białka albuminy w próbkach osocza pobranych od 25 potencjalnie zdrowych ochotników oraz 25 pacjentów ze zdiagnozowanym RZS (Tabela 3). Ze względu na występowanie efektu matrycowego, do oznaczenia analitów zastosowano metodę jednokrotnego dodatku wzorca. Stężenie analitu w każdej próbce obliczono według następującego wzoru:

$$C_x = \frac{Y_x \times C_s}{Y_s - Y_x}$$

gdzie:

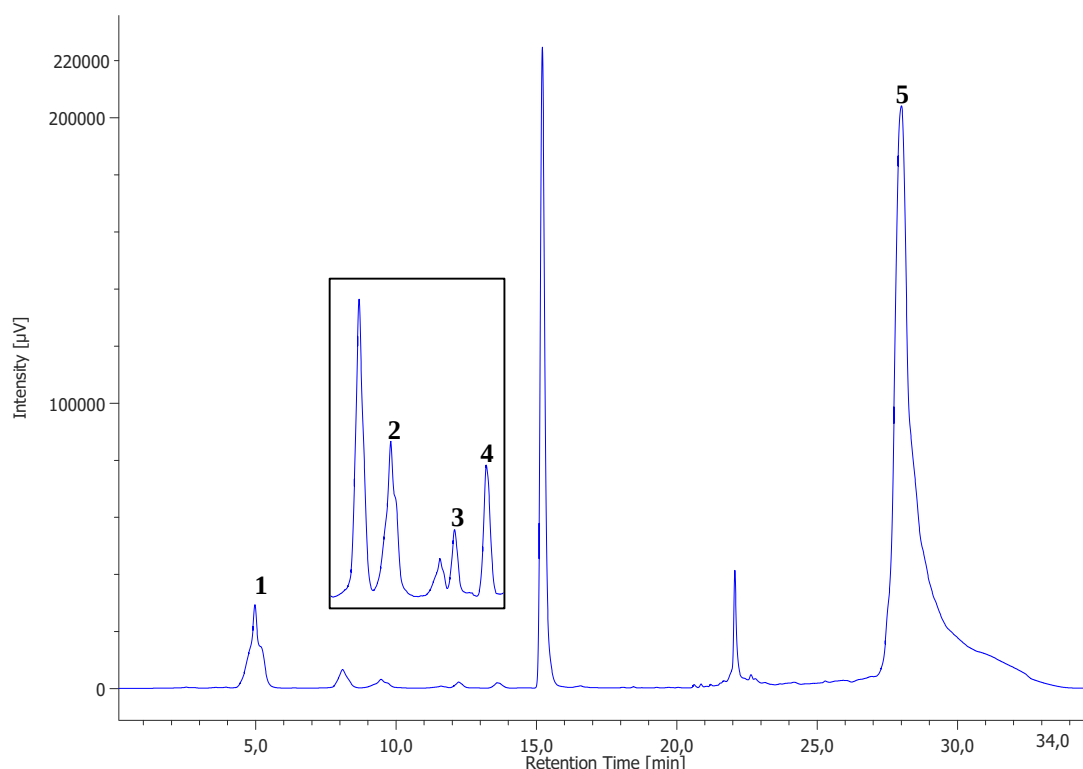
C_x – stężenie analitu w próbce osocza,

Y_x – sygnał analityczny dla próbki zawierającej jedynie analit,

C_s – stężenie analitu w próbce z dodatkiem znanej ilości wzorca,

Y_s – sygnał analityczny dla próbki z dodatkiem znanej ilości wzorca.

Przykładowy chromatogram uzyskany dla próbki osocza pochodzącej od potencjalnie zdrowego ochotnika przedstawiono na Rysunku 23.



Rysunek 23. Przykładowy chromatogram próbki osocza pobranej od potencjalnie zdrowego ochotnika po redukcji NaBH_4 i derywatywacji mBBR; piki oznaczone numerami 1-5 odpowiadają sygnałom powstałym adduktom tiol-biman w następującej kolejności: Cys, Cys-Gly, Hcy, GSH, HSA; warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 3.1.4; niepodpisane piki pochodzą od mBBR i produktów jego hydrolizy

Oczekiwane zakresy stężeń tioli całkowitych w próbkach osocza pobranych od potencjalnie zdrowych ochotników były następujące: 3,27 – 13,37 nmol/ml dla Hcy^[163], 135,80 – 266,50 nmol/ml dla Cys^[163], 19,24 – 39,74 nmol/ml dla Cys-Gly^[163], 4,90 – 7,30 nmol/ml dla GSH^[175], 35,9 – 48,3 mg/ml dla HSA^[157] oraz 0,16 – 5,8 nmol/ml dla α -LA w przypadku suplementacji^[169,176]. Spodziewano się także, że bez podania NAC lub jej dobrowolnego zażywania przez uczestnika przed przystąpieniem do badania, nie będzie ona możliwa do wykrycia w osoczu ochotników w stężeniu przekraczającym LOD, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami^[177]. W przypadku Hcy oraz Cys-Gly średnia zawartość tiolu całkowitego $\pm$ SD w osoczu osób zdrowych wynosiła odpowiednio: $6,39 \pm 2,06$ nmol/ml i $32,78 \pm 10,51$ nmol/ml. Z uwagi na fakt, iż test Shapiro-Wilka wykazał istotne odchylenia od normalności dla pozostałych analitów, ich zawartość w osoczu określono podając wartości Me oraz Q1 i Q3, które wynosiły: 39,26 mg/ml (Q1 = 35,575 mg/ml, Q3 = 40,665 mg/ml) dla HSA, 5,65 nmol/ml (Q1 = 4,84 nmol/ml, Q3 = 6,055 nmol/ml) dla GSH, 145,83 nmol/ml (Q1 = 93,72 nmol/ml, Q3 = 178,365 nmol/ml) dla Cys oraz 0,00 nmol/ml (Q1 = 0,00 nmol/ml, Q3 = 0,00 nmol/ml) dla NAC i α -LA. Dwa ostatnie anality zostały wykryte jedynie w kilku analizowanych

próbkach osocza, co może wynikać z faktu, że ochotnicy mogli jednak przyjmować preparaty zawierające te związki. Uzyskane wyniki są w większości zgodne z wcześniejszymi doniesieniami ^[127,151,155,157,163,175,176,178–181]. W przypadku pacjentów ze zdiagnozowanym RZS, średnie poziomy tioli całkowitych $\pm$ SD w osoczu wynosiły: 33,19 $\pm$ 6,53 mg/ml dla HSA, 5,47 $\pm$ 0,38 nmol/ml dla GSH, 224,29 $\pm$ 29,59 nmol/ml dla Cys oraz 14,84 $\pm$ 5,61 nmol/ml dla Cys-Gly. W osoczu pacjentów z RZS NAC wykryto jedynie u jednej osoby, natomiast obecności α -LA nie stwierdzono u żadnego z badanych. Wyniki wykazały, że 24% osób zdrowych miało obniżony poziom albuminy (HSA < 35 mg/ml), podczas gdy w grupie pacjentów z RZS hipoalbuminemia dotyczyła aż 64% badanych. Niski poziom HSA może świadczyć o przewlekłym stanie zapalnym, który jest charakterystyczny dla pacjentów z RZS. Cytokiny prozapalne, takie jak IL-6 i TNF- α , hamują syntezę HSA i przyspieszają jej katabolizm, co może dodatkowo prowadzić do hipoalbuminemii obserwowanej u pacjentów z RZS ^[182,183]. W celu porównania stężenia HSA pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną przeprowadzono test U Manna-Whitneya. Analiza wykazała istotną statystycznie różnicę między grupami ($p = 0,027$). Uzyskane wyniki sugerują, że monitorowanie poziomu stężenia HSA w praktyce klinicznej może pomóc w ocenie aktywności choroby i ogólnego stanu pacjenta, gdyż hipoalbuminemia nie jest chorobą samą w sobie, lecz skutkiem toczącego się w organizmie procesu patofizjologicznego. Całkowite stężenie GSH w osoczu u pacjentów chorych na RZS nie różniło się istotnie od stężenia w grupie kontrolnej ($p = 0,541$), co zaobserwowali również Hernanz i in. ^[125]. Wynik ten nie odzwierciedla jednak rzeczywistych zmian na poziomie komórkowym. W RZS stres oksydacyjny jest mocno nasilony w stawach, więc przypuszcza się, że to maź stawowa byłaby idealną matrycą do analizy istotności zmian w poziomie tego tiolu pomiędzy grupą kontrolną a chorymi, która mogłaby dostarczyć informacji o przydatności związku jako markera ciężkości choroby. Wyniki testu U Manna-Whitneya wykazały natomiast istotnie wyższy poziom Cys w osoczu pacjentów z RZS w porównaniu do osób zdrowych ($p < 0,05$), co może sugerować związek tego aminokwasu z patogenezą choroby. Cys bierze udział w regulacji szlaków sygnałowych, a jej podwyższone stężenie może być efektem zmian metabolicznych indukowanych przez stan zapalny. Uzyskane wyniki sugerują, że Cys może być potencjalnym biomarkerem diagnostycznym lub prognostycznym w przebiegu RZS. Niezbędne są jednak dalsze badania w celu określenia korelacji pomiędzy poziomem Cys a aktywnością choroby, uszkodzeniem stawów lub odpowiedzią na leczenie. W grupie zdrowych ochotników u żadnej z badanych osób nie stwierdzono

obecności Hcy w stężeniu przekraczającym 15 nmol/ml osocza, które świadczyłoby o występowaniu hiperhomocysteinemii. Natomiast wśród pacjentów cierpiących na RZS aż 52% badanych miało podwyższony poziom tego aminotiolu, co wskazuje na zwiększony stres oksydacyjny, który może przyczyniać się do uszkodzenia naczyń krwionośnych. Do analizy statystycznej wykorzystano test t-Welcha, zakładający nierówność wariancji, który wykazał istotną statystycznie różnicę między grupami ($t(30) = -7,06$, $p < 0,0001$). Bardzo niska wartość p wskazuje na znikome prawdopodobieństwo, że zaobserwowana różnica jest wynikiem losowego doboru próby, co sugeruje, że podwyższony poziom Hcy może być związany z procesem chorobowym. Hcy jest znanym czynnikiem prozapalnym i proaterogennym, a jej podwyższone stężenie zostało wcześniej powiązane ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym [139,184–187]. RZS jest chorobą, której towarzyszy przewlekły stan zapalny, który sam w sobie zwiększa ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych. Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy badanie dostarcza przesłanek sugerujących, że Hcy może pełnić rolę dodatkowego czynnika ryzyka w tej populacji pacjentów. Uzyskane wyniki pokrywają się z wcześniejszymi ustaleniami [120,122,123,127,130], co dodatkowo podkreśla znaczenie Hcy jako potencjalnego biomarkera ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów z RZS. Konieczne są dalsze badania w celu ustalenia, czy monitorowanie poziomu Hcy mogłoby stanowić istotny element ryzyka i strategii profilaktycznych w tej grupie pacjentów. Wyniki testu t-Studenta dla dwóch niezależnych prób, przy założeniu równości wariancji, wykazały istotną statystycznie różnicę w poziomie Cys-Gly pomiędzy grupą kontrolną a pacjentami z RZS ($t(48) = -2,69$, $p = 0,0099$). Wzrost poziomu Cys-Gly w osoczu pacjentów prawdopodobnie jest skutkiem zwiększonej degradacji GSH lub aktywacji γ -glutamylotranspeptydazy. Niniejsze badanie sugeruje, że tiol ten może być markerem nasilenia stresu oksydacyjnego i potencjalnie korelować z aktywnością RZS. Należy jednak ocenić, czy poziom Cys-Gly jest związany ze stopniem uszkodzenia stawów, odpowiedzią na terapię czy też progresją choroby w dłuższym okresie, co wymaga dalszych badań na większej populacji. Należy zaznaczyć, że dostępne dane dotyczące stężeń innych tioli, takich jak NAC czy α -LA, u pacjentów z RZS są ograniczone i stanowiły przedmiot niniejszych badań. Niemniej jednak, spodziewano się, że ich obecność nie zostanie w większości przypadków wykryta bez uprzedniej suplementacji, ze względu na fakt, że ich endogenne stężenia są bardzo niskie. Związki te mogą znajdować się w osoczu w stężeniach poniżej LOD opracowanej metody analitycznej, co dodatkowo utrudnia ich oznaczenie. U uczestników badania, u których wykryto obecność

tych związków, można przypuszczać, że prawdopodobnie przyjmowali je w postaci suplementów lub leków, ale błędnie wypełnili ankietę dotyczącą stosowania antyoksydantów. Możliwe jest również, że nie byli świadomi, iż spożywane przez nich środki farmaceutyczne lub suplementy diety zawierały te związki, co mogło wpłynąć na wyniki analizy.

Tabela 3. Wyniki oznaczeń końcowych przeprowadzonych za pomocą opracowanej i zwalidowanej metody HPLC-FLD opartej o chemiczną modyfikację analitów za pomocą mBBR; sposób przygotowania próbek do analizy opisano w podrozdziale 3.1.8, natomiast warunki chromatograficzne w podrozdziale 3.1.4; wartości średnie (nmol/ml lub mg/ml dla HSA) obliczono na podstawie wyników z trzech powtórzeń dla każdego osocza; n.w. = nie wykryto

LP	HSA		GSH		Cys		Hcy		Cys-Gly		NAC		α -LA	
	Średnia (SD)	RSD (%)	Średnia (SD)	RSD (%)	Średnia (SD)	RSD (%)	Średnia (SD)	RSD (%)	Średnia (SD)	RSD (%)	Średnia (SD)	RSD (%)	Średnia (SD)	RSD (%)
GRUPA KONTROLNA														
1	42,62 (3,01)	7,06	4,14 (0,25)	6,04	128,15 (3,22)	2,51	9,12 (0,55)	6,03	30,71 (0,29)	0,94	n.w.	–	n.w.	–
2	37,52 (3,48)	9,28	7,93 (0,67)	8,45	94,32 (0,99)	1,05	7,36 (0,21)	2,85	22,68 (2,42)	10,67	n.w.	–	n.w.	–
3	41,28 (1,32)	3,20	5,80 (0,28)	4,83	74,72 (7,48)	10,01	4,76 (0,22)	4,62	46,49 (4,98)	10,71	n.w.	–	n.w.	–
4	40,34 (2,64)	6,54	6,00 (0,40)	6,67	89,34 (4,60)	5,15	5,46 (0,54)	9,89	30,41 (1,14)	3,75	n.w.	–	n.w.	–
5	32,52 (2,19)	6,73	4,77 (0,22)	4,61	67,38 (5,56)	8,25	3,72 (0,25)	6,72	55,48 (4,38)	7,89	n.w.	–	n.w.	–
6	33,63 (1,29)	3,84	5,22 (0,33)	6,32	70,00 (3,38)	4,83	8,79 (0,36)	4,10	20,08 (1,02)	5,08	n.w.	–	n.w.	–
7	44,33 (0,95)	2,14	5,25 (0,23)	4,38	136,85 (3,78)	2,76	10,48 (0,57)	5,44	42,90 (1,40)	3,26	n.w.	–	n.w.	–
8	24,99 (1,02)	4,08	5,69 (0,24)	4,22	93,12 (4,11)	4,41	5,47 (0,48)	8,78	45,75 (3,14)	6,86	n.w.	–	n.w.	–
9	38,12 (3,18)	8,34	5,33 (0,41)	7,69	121,77 (5,11)	4,20	3,32 (0,31)	9,34	19,63 (1,83)	9,32	n.w.	–	n.w.	–
10	25,15 (1,31)	5,21	2,73 (0,10)	3,66	77,44 (5,79)	7,48	4,56 (0,45)	9,87	28,08 (3,22)	11,47	n.w.	–	n.w.	–
11	40,67 (0,68)	1,67	5,79 (0,28)	4,84	183,52 (8,28)	4,51	7,63 (0,84)	11,01	28,58 (1,27)	4,44	n.w.	–	0,83 (0,07)	8,43

12	38,94 (1,29)	3,31	5,49 (0,46)	8,38	174,72 (5,15)	2,95	6,83 (0,41)	6,00	31,84 (1,31)	4,11	n.w.	–	n.w.	–
13	38,74 (1,21)	3,12	6,17 (0,26)	4,21	179,59 (7,84)	4,37	6,63 (0,99)	14,93	27,05 (1,92)	7,10	n.w.	–	n.w.	–
14	40,65 (2,20)	5,41	5,65 (0,46)	8,14	184,31 (4,42)	2,40	3,42 (0,39)	11,40	42,19 (4,08)	9,67	n.w.	–	n.w.	–
15	39,74 (1,50)	3,77	5,65 (0,26)	4,60	181,04 (4,54)	2,51	8,12 (0,68)	8,37	27,82 (1,35)	4,85	n.w.	–	n.w.	–
16	41,64 (1,52)	3,65	6,21 (0,49)	7,89	174,21 (9,57)	5,49	7,83 (1,15)	14,69	32,29 (2,35)	7,28	2,81 (0,08)	2,85	n.w.	–
17	39,03 (0,90)	2,31	5,98 (0,60)	10,03	173,38 (6,70)	3,86	3,50 (0,09)	2,57	29,67 (4,28)	14,43	n.w.	–	n.w.	–
18	39,67 (1,64)	4,13	6,22 (0,45)	7,23	179,72 (4,63)	2,58	6,94 (0,46)	6,63	35,22 (3,13)	8,89	n.w.	–	0,21 (0,02)	9,52
19	38,74 (0,55)	1,42	6,16 (0,20)	3,25	168,16 (4,78)	2,84	10,37 (0,34)	3,28	19,26 (1,71)	8,88	n.w.	–	n.w.	–
20	39,26 (1,94)	4,94	4,70 (0,40)	8,51	177,14 (6,79)	3,83	6,89 (0,55)	7,98	48,14 (2,87)	5,96	n.w.	–	n.w.	–
21	31,77 (0,47)	1,48	3,01 (0,44)	14,62	153,65 (4,83)	3,14	4,50 (0,22)	4,89	18,72 (1,31)	7,00	n.w.	–	1,28 (0,05)	3,91
22	39,64 (0,75)	1,89	6,11 (0,55)	9,00	142,51 (17,23)	12,09	6,13 (0,62)	10,11	30,10 (4,65)	15,45	n.w.	–	n.w.	–
23	41,09 (3,05)	7,42	5,71 (0,32)	5,60	180,25 (8,83)	4,90	7,10 (0,74)	10,42	21,95 (2,48)	11,30	10,23 (1,25)	12,22	n.w.	–
24	40,66 (1,21)	2,98	4,91 (0,18)	3,67	138,90 (3,50)	2,52	5,13 (0,43)	8,38	49,61 (3,28)	6,61	n.w.	–	n.w.	–
25	30,38 (1,32)	4,35	4,11 (0,31)	7,54	145,83 (2,09)	1,43	5,79 (0,69)	11,92	34,91 (1,15)	3,29	n.w.	–	n.w.	–
PACJENCI Z RZS														
26	27,20 (2,57)	9,45	5,91 (0,32)	5,41	210,12 (2,08)	0,99	14,26 (1,40)	9,82	42,78 (1,43)	3,34	n.w.	–	n.w.	–

27	39,79 (5,00)	12,57	5,54 (0,28)	5,05	225,36 (4,32)	1,92	17,51 (1,13)	6,45	50,12 (3,09)	6,17	n.w.	–	n.w.	–
28	31,22 (2,09)	6,69	5,35 (0,27)	5,05	240,58 (8,01)	3,33	8,38 (0,59)	7,04	31,48 (0,89)	2,83	n.w.	–	n.w.	–
29	39,37 (3,74)	9,50	5,55 (0,33)	5,95	200,44 (11,52)	5,75	10,80 (0,43)	3,98	55,26 (2,70)	4,89	n.w.	–	n.w.	–
30	32,07 (2,29)	7,14	4,51 (0,35)	7,76	245,89 (6,76)	2,75	5,33 (0,31)	5,82	28,12 (1,43)	1,53	n.w.	–	n.w.	–
31	26,40 (3,06)	11,59	5,39 (0,35)	6,49	220,75 (12,23)	5,54	15,11 (0,76)	5,03	44,99 (2,86)	6,36	n.w.	–	n.w.	–
32	44,28 (3,39)	7,66	5,68 (0,26)	4,58	180,23 (10,09)	5,60	9,67 (0,18)	1,86	36,48 (4,31)	11,81	n.w.	–	n.w.	–
33	28,88 (2,14)	7,41	6,24 (0,28)	4,49	215,67 (2,58)	1,20	20,99 (1,45)	6,91	39,25 (2,19)	5,58	n.w.	–	n.w.	–
34	41,32 (0,32)	0,77	5,24 (0,32)	6,11	260,08 (21,12)	8,12	16,92 (0,22)	1,30	48,06 (3,92)	8,16	n.w.	–	n.w.	–
35	26,64 (3,78)	14,19	5,10 (0,35)	6,86	192,34 (12,57)	6,54	22,24 (1,67)	7,51	19,33 (1,59)	8,23	n.w.	–	n.w.	–
36	30,76 (5,34)	17,36	5,25 (0,28)	5,33	230,56 (28,77)	12,48	8,18 (0,09)	1,10	61,21 (5,87)	9,59	n.w.	–	n.w.	–
37	29,12 (4,57)	15,70	5,96 (0,29)	4,87	250,43 (8,57)	3,42	6,70 (0,05)	0,75	52,46 (0,94)	1,79	n.w.	–	n.w.	–
38	42,75 (1,39)	3,25	5,66 (0,24)	4,24	205,77 (19,69)	9,57	19,93 (0,63)	3,16	41,67 (1,52)	3,65	n.w.	–	n.w.	–
39	28,30 (1,22)	4,31	5,24 (0,24)	4,58	235,19 (13,48)	5,73	13,52 (0,71)	5,25	30,09 (2,17)	7,21	n.w.	–	n.w.	–
40	32,30 (3,79)	11,73	5,76 (0,34)	5,90	182,96 (21,06)	11,51	18,11 (0,21)	1,16	38,16 (0,55)	1,44	n.w.	–	n.w.	–
41	41,63 (2,49)	5,98	5,55 (0,37)	6,67	255,22 (28,29)	11,08	25,28 (1,08)	4,27	43,82 (1,09)	2,49	n.w.	–	n.w.	–

42	20,51 (1,13)	5,51	5,98 (0,30)	5,02	270,34 (12,74)	4,71	15,73 (0,24)	1,53	25,81 (0,92)	3,56	n.w.	–	n.w.	–
43	31,18 (2,98)	9,56	5,15 (0,35)	6,80	225,01 (14,83)	6,59	24,79 (0,81)	3,27	58,30 (2,93)	5,03	n.w.	–	n.w.	–
44	35,12 (2,92)	8,31	5,34 (0,32)	5,99	218,58 (9,56)	4,37	12,83 (0,55)	4,29	42,38 (1,89)	4,46	n.w.	–	n.w.	–
45	45,61 (3,57)	7,83	5,30 (0,27)	5,09	243,77 (28,31)	11,61	11,95 (0,12)	1,00	36,91 (0,96)	2,60	n.w.	–	n.w.	–
46	30,39 (3,97)	13,06	4,77 (0,32)	6,71	199,84 (4,71)	2,36	5,83 (0,11)	1,89	40,55 (3,74)	9,22	n.w.	–	n.w.	–
47	32,31 (0,83)	2,57	5,65 (0,38)	6,73	185,22 (7,66)	4,14	17,42 (0,28)	1,61	23,97 (1,04)	4,34	n.w.	–	n.w.	–
48	36,41 (3,26)	8,95	5,63 (0,30)	5,33	272,12 (31,42)	11,55	16,27 (1,62)	9,96	38,82 (1,62)	4,17	n.w.	–	n.w.	–
49	29,26 (2,93)	10,01	5,50 (0,38)	6,91	173,68 (5,29)	3,05	14,31 (0,97)	6,78	41,18 (2,33)	5,66	5,18 (0,09)	1,74	n.w.	–
50	27,05 (1,00)	3,70	5,38 (0,17)	3,16	267,09 (18,55)	6,95	18,86 (0,93)	4,93	48,72 (3,03)	6,22	n.w.	–	n.w.	–

4. OPRACOWANIE METODY OZNACZANIA WYBRANYCH BIAŁEK W PŁYNACH USTROJOWYCH CZŁOWIEKA TECHNIKĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ W ODWRÓCONYM UKŁADZIE FAZ Z DETEKcją ROZPROSZENIA ŚWIATŁA PRZEZ ODPAROWANIE

Wysokosprawna chromatografia cieczowa w połączeniu z detektorem rozpraszania światła przez odparowanie (HPLC-ELSD) to zaawansowana technika analityczna stosowana do rozdzielania i oznaczania półlotnych i nielotnych substancji, takich jak lipidy, węglowodany, steroidy czy peptydy i białka [188–190]. W przeciwieństwie do detektorów UV lub FLD, ELSD jest uniwersalnym detektorem, niezależnym od właściwości optycznych związku, co czyni go idealną alternatywą w przypadku oznaczeń substancji niezawierających w swej strukturze chromoforu lub fluoroforu. Dzięki temu technika HPLC-ELSD doskonale nadaje się do analizy substancji, które są trudne do wykrycia przy użyciu tradycyjnych metod spektroskopowych. W tym przypadku, substancja opuszczająca kolumnę chromatograficzną w formie aerozolu oddziałuje z promieniowaniem laserowym, powodując jego rozproszenie. Zasada działania detektora ELSD opiera się na nebulizacji eluentu zawierającego analit w obecności gazu obojętnego, co prowadzi do powstania aerozolu zawierającego równomiernie rozłożone krople. Mieszanina gazu i rozpuszczalnika w postaci aerozolu jest następnie przenoszona dzięki przepływowi gazu nośnego do komory parownika, gdzie dochodzi do odparowania fazy ruchomej przy jednoczesnym pozostawieniu zawiesiny (mgiełki) suchych cząstek analitu. To właśnie te cząsteczki rozpraszają światło, które trafia następnie na element światłoczuły, taki jak fotodioda lub fotopowielacz, generując sygnał w czasie rzeczywistym. Natężenie światła wykrytego przez detektor ELSD zależy od stężenia rozpuszczonej substancji oraz rozkładu wielkości powstałych cząstek. Ponieważ opary czystego rozpuszczalnika rozpraszają światło w minimalnym stopniu, poziom sygnału tła pozostaje niski i stabilny (stała linia tła). Należy mieć na uwadze, że skuteczność działania detektora ELSD zależy od tego, czy cząsteczka analitu jest mniej lotna niż faza ruchoma oraz czy jest w stanie utrzymać swoje właściwości rozpraszania światła, gdy przepływa przez detektor. Wiązka światła padającego jest najlepiej rozpraszana przez analit w postaci cząstek, a nie cieczy, dlatego konieczne jest przeprowadzenie

optymalizacji parametrów ELSD dla każdej analizowanej substancji. Jednym z prostych sposobów weryfikacji przydatności tej techniki do danego analitu jest sprawdzenie jego temperatury topnienia – substancje o niskiej temperaturze topnienia mogą generować sygnał trudny do odróżnienia od tła powstałego z odparowanej fazy ruchomej. Rozpuszczalniki stosowane w ELSD nie muszą być wyjątkowo wysokiej czystości, jednakże nie powinny zawierać rozpuszczonych ciał stałych ani składać się z nielotnych roztworów buforowych. Charakterystyczną cechą ELSD jest nieliniowa zależność odpowiedzi od stężenia analitu, jednak dzięki odpowiedniej modyfikacji składu eluentu można uzyskać wysoką czułość oraz powtarzalność wyników. W metodzie tej dopuszcza się stosowanie elucji gradientowej.

Zastosowanie HPLC-ELSD do analizy białek jest szczególnie korzystne w porównaniu z konwencjonalnymi metodami detekcji. Wiele białek, w szczególności małe peptydy i glikoproteiny, nie posiada w swojej strukturze aminokwasów aromatycznych, takich jak tryptofan, tyrozyna czy fenyloalanina, które absorbują promieniowanie UV, co uniemożliwia ich oznaczenie przy 280 nm. Jednakże, dzięki występowaniu wiązań peptydowych, pomiary można wykonać przy około 220 nm. Niemniej jednak, w materiale biologicznym, ze względu na obecność kwasów nukleinowych, które absorbują promieniowanie przy długości fali zbliżonej do białek (260 nm), oznaczenie może być dodatkowo utrudnione. ELSD wykrywa białka na podstawie ich właściwości fizycznych po odparowaniu rozpuszczalnika, dzięki czemu wszystkie białka obecne w mieszaninie mogą zostać wykryte i oznaczone ilościowo, niezależnie od ich składu aminokwasowego. Proces oznaczania białek przy użyciu HPLC-ELSD rozpoczyna się od ich chromatograficznego rozdzielania. W zależności od specyficznej natury analizowanych białek, stosowane są różne techniki HPLC, w tym chromatografia w układzie faz odwróconych (RP-HPLC), chromatografia wykluczania (SEC) lub chromatografia jonowymienna (IEC). Faza ruchoma złożona jest zwykle z wodnych roztworów buforowych, takich jak octan amonu, oraz rozpuszczalników organicznych, takich jak ACN. Modyfikatorami fazy ruchomej kompatybilnymi z ELSD są między innymi kwas mrówkowy, TFA, amoniak, czy kwas pentafluoropropionowy. Po rozdzielaniu na kolumnie eluat trafia do detektora, gdzie ulega rozpyleniu i odparowaniu, w wyniku czego w strumieniu gazu unoszą się cząstki białka, które rozpraszają światło proporcjonalnie do ich stężenia. Krzywa kalibracyjna wykreślana jest zwykle w postaci zależności logarytmu dziesiętnego odpowiedzi detektora od logarytmu dziesiętnego stężenia analitu. Technika HPLC-ELSD znajduje szerokie zastosowanie

w naukach o żywności, naukach farmaceutycznych (m.in. w charakterystyce przeciwciał monoklonalnych, peptydów terapeutycznych i leków biopodobnych), czy w biotechnologii (m.in. w monitorowaniu produkcji białek rekombinowanych w hodowlach komórkowych) [191–194].

W niniejszym rozdziale szczegółowo omówiono poszczególne etapy opracowywania nowych protokołów analitycznych opartych o technikę HPLC-ELSD i służących do jednoczesnego oznaczania endogennych białek, w tym albuminy, insuliny, fibrynogenu, mioglobiny, hemoglobiny oraz transferryny, w płynach ustrojowych człowieka, tj. krwi oraz osoczu. Związki te w sposób pośredni bądź bezpośredni pozwalają na szerszą ocenę funkcji układu sercowo-naczyniowego, w związku z czym opracowane procedury zostały z powodzeniem wykorzystane do analizy próbek rzeczywistych pochodzących od potencjalnie zdrowych ochotników (grupa kontrolna) oraz pacjentów ze zdiagnozowanym RZS (grupa badana), zgodnie z protokołem badania zatwierdzonym przez Komisję Bioetyczną przy Instytucie „Centrum Zdrowia Matki Polki” (Uchwała nr 64/2023 z dnia 20 czerwca 2023 r.).

4.1 Materiały i metody

4.1.1 Odczynniki

- albumina surowicy ludzkiej (skrót: HSA, nazwa handlowa: *human serum albumin*), proszek liofilizowany, $\geq 96\%$, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- insulina (skrót: Ins, nazwa handlowa: *insulin human*), białko rekombinowane, ekspresjonowane w drożdżach, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- fibrynogen (skrót: Fg, nazwa handlowa: *fibrinogen from human plasma*), 50-70% białka, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- mioglobina (skrót: Mb, nazwa handlowa: *myoglobin from equine heart*), $\geq 90\%$ (SDS-PAGE), proszek liofilizowany, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- hemoglobina (skrót: Hgb, nazwa handlowa: *hemoglobin human*), proszek liofilizowany, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- transferryna (skrót: Tf, nazwa handlowa: *transferrin human*), $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- acetonitryl, czystość HPLC, J.T. Beaker, Deventer, Holandia;
- kwas trifluorooctowy, czystość HPLC, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;

- sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS), pH 7,4, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- woda dejonizowana przygotowana w laboratorium przy użyciu systemu Direct-Q 3 UV (Millipore, Wiedeń, Austria);

4.1.2 Roztwory

- Roztwór podstawowy HSA o stężeniu 20 mg/ml sporządzono w probówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml poprzez rozpuszczenie 20 mg standardu w 1 ml wody dejonizowanej.
- Roztwór podstawowy Hgb o stężeniu 20 mg/ml sporządzono w probówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml poprzez rozpuszczenie 20 mg standardu w 1 ml wody dejonizowanej.
- Roztwór podstawowy Fg o stężeniu 8 mg/ml sporządzono w probówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml poprzez rozpuszczenie 8 mg standardu w 1 ml wody dejonizowanej.
- Roztwór podstawowy Ins o stężeniu 8 mg/ml sporządzono w probówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml poprzez rozpuszczenie 8 mg standardu w 1 ml wody dejonizowanej.
- Roztwór podstawowy Mb o stężeniu 8 mg/ml sporządzono w probówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml poprzez rozpuszczenie 8 mg standardu w 1 ml wody dejonizowanej.
- Roztwór podstawowy Tf o stężeniu 8 mg/ml sporządzono w probówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml poprzez rozpuszczenie 8 mg standardu w 1 ml wody dejonizowanej.
- Roztwory robocze przygotowywano poprzez odpowiednie rozcieńczenia wodą dejonizowaną według potrzeb i bezzwłocznie wykorzystywano.

4.1.3 Aparatura

Wszystkie analizy wykonano przy użyciu systemu Agilent 1220 Infinity LC wyposażonego w pompę podwójną zintegrowaną z dwukanałowym odgazowywaczem, automatyczny podajnik próbek, termostat kolumny, detektor UV oraz detektor ELSD serii 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy). Kontrola systemu oraz procesy pozyskiwania danych wraz z analizą były realizowane przy użyciu oprogramowania OpenLAB CDS. Próbkę przechowywano w zamrażarce

ultraniskotemperaturowej firmy Panasonic Healthcare Co., Ltd. (Sakata, Japonia). Wodę dejonizowaną przygotowywano przy użyciu systemu oczyszczania wody Direct-Q 3 UV (Millipore, Wiedeń, Austria). Podczas etapu przygotowania próbek do analizy chromatograficznej wykorzystano ponadto wagę laboratoryjną Scaltec SBC 21, pipety automatyczne firmy HTL, probówki typu Eppendorf, probówki polipropylenowe, fiołki stożkowe do HPLC i szpatułki ze stali nierdzewnej.

4.1.4 Warunki chromatograficzne oraz parametry detekcji

4.1.4.1 Matryca biologiczna – krew

Krew posłużyła w niniejszej pracy do ilościowego oznaczenia HSA oraz Hgb w próbkach pochodzących od uczestników badania. Anality rozdzielono przy użyciu kolumny Accucore 150-C4 (150 × 4,6 mm, 2,6 μm) firmy Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA) oraz fazy ruchomej składającej się z 0,1% TFA (składnik A) i 0,1% TFA w ACN (składnik B). Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min, a rozdzielenie chromatograficzne przeprowadzono w temperaturze 25 °C. Program elucji gradientowej wyglądał następująco: 0-6 min, 30-60% B; 6-10 min, 60-90% B; 10-13 min, 90-30% B; 13-15 min, 30% B. Objętość wprowadzanej próbki wynosiła 5 μl. Do detekcji analitów zastosowano następujące parametry:

- natężenie przepływu gazu (N₂): 1,0 SLM (standardowy litr na minutę),
- temperatura nebulizatora: 60 °C,
- temperatura parownika: 60 °C,
- wzmocnienie sygnału: 1,
- intensywność źródła światła: 100%,
- tempo zbierania danych: 40 Hz,
- wygładzenie: 30 (3,0 sekundy).

Piki identyfikowano zarówno poprzez porównanie czasów retencji, jak i widm UV uzyskanych z pomiarów absorbancji przy długości fali wynoszącej 280 nm, z odpowiednimi danymi pochodzącymi z analizy wzorców.

4.1.4.2 Matryca biologiczna – osocze

Zoptymalizowane warunki chromatograficzne oraz parametry detekcji służące do jednoczesnego oznaczenia Ins, Tf, HSA, Fb, Mg oraz fHgb w próbkach osocza były identyczne jak opisane powyżej, z wyjątkiem zastosowania dwukrotnego wzmocnienia sygnału detektora ELSD oraz zmodyfikowanego programu elucji gradientowej, który

wynosił odpowiednio: 0-8 min, 27-45% B; 8-14 min, 45-65% B; 14-15 min, 65-27% B; 15-17 min, 27% B.

4.1.5 Materiał badany oraz charakterystyka badanych grup pacjentów

Przeprowadzone oznaczenia wykonano w ramach części badań zaplanowanych w eksperymencie medycznym pt. *„Homeostaza tiolowo-disiarczkowa jako wskaźnik potencjalnych zaburzeń układu sercowo-naczyniowego w przebiegu wybranych chorób reumatycznych”*, realizowanym we współpracy z Zakładem Medycyny Rodzinnej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi oraz Kliniką Reumatologii z Pododdziałem Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 2 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, a także zatwierdzonym Uchwałą nr 64/2023 z dnia 20 czerwca 2023 r. Komisji Bioetycznej przy Instytucie „Centrum Zdrowia Matki Polki”. Dokładny opis sposobu pobierania próbek krwi do badań oraz szczegółowa charakterystyka badanych grup pacjentów zostały przedstawione odpowiednio w podrozdziałach 3.1.5. oraz 3.1.6.

4.1.6 Walidacja opracowanej metody chromatograficznej

Opracowana metoda została poddana walidacji zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi, dotyczącymi walidacji metod bioanalitycznych i analizy próbek badawczych ^[147,174]. Walidowane parametry obejmowały: selektywność, zakres liniowości, LOD, LOQ, precyzję, dokładność, odporność metody, przeniesienie próbki, efekt matrycy, stabilność oraz test zgodności systemu (SST – *System Suitability Test*).

4.1.6.1 Przygotowanie wzorców kalibracyjnych oraz próbek kontroli jakości

Roztwory podstawowe białek przygotowano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej masy związku w wodzie dejonizowanej, zgodnie z opisem przedstawionym w podrozdziale 4.1.2. Roztwory te przechowywano w temperaturze 4 °C przez kilka dni, nie obserwując zauważalnych zmian w zawartości analitów. Roztwory robocze przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie wodą, w zależności od potrzeb, i niezwłocznie wykorzystywano. Standardy kalibracyjne oraz QCs zostały przygotowane z oddzielnych roztworów podstawowych. W celu przygotowania standardów kalibracyjnych, do probówek typu Eppendorf o pojemności 500 µl dodawano 4 µl osocza lub krwi od potencjalnie zdrowych ochotników, a następnie wzbogacano je/ją 50 µl

mieszaniny roztworów wzorcowych analitów o rosnących ilościach roboczych roztworów standardowych białek w celu uzyskania następujących stężeń egzogennych: 1,35, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 10,00 mg/ml osocza dla Ins, 1,51, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 10,0 mg/ml osocza dla Tf, 1,39, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 35,0, 40,0, 50,0 mg/ml osocza dla HSA, 1,22, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0 mg/ml osocza dla Fg, 1,36, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 10,0 mg/ml osocza dla Mb oraz 1,31, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 10,0 mg/ml osocza dla Hgb w przypadku próbek osocza. Dla próbek krwi stężenia analitów wynosiły odpowiednio: 1,63, 3,0, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0 i 40,0 mg/ml krwi dla HSA oraz 1,31, 5,0, 10,0, 30,0, 50,0, 100,0 i 150,0 mg/ml krwi dla Hgb. Do wzbogaconych próbek osocza oraz krwi dodawano następnie wody dejonizowanej do objętości wynoszącej odpowiednio 200 i 400 μ l. Ostatecznie pobierano po 5 μ l odpowiednio przygotowanych próbek osocza oraz krwi do analizy HPLC.

Próbki kontroli jakości (QCs) przygotowano w trzech powtórzeniach dla każdego z czterech poziomów stężeń w zakresie krzywej kalibracyjnej poprzez dodanie 50 μ l mieszaniny roztworów wzorcowych białek do 4 μ l osocza, a następnie uzupełniając wodą dejonizowaną do objętości 200 μ l. Stężenia końcowe analitów w tak przygotowanych próbkach osocza wynosiły: 1,35, 4,05, 5,0 i 8,0 mg/ml osocza dla Ins, 1,51, 4,53, 5,0 i 8,0 mg/ml osocza dla Tf, 1,39, 4,17, 25,0 i 40,0 mg/ml osocza dla HSA, 1,22, 3,66, 5,0 i 8,0 mg/ml osocza dla Fg, 1,36, 4,08, 5,0 i 8,0 mg/ml osocza dla Mb oraz 1,31, 3,93, 5,0 i 8,0 mg/ml osocza dla Hgb. W przypadku próbek krwi, QCs przygotowano poprzez dodanie do 4 μ l krwi 50 μ l mieszaniny roztworów wzorcowych analitów i uzupełniając wodą dejonizowaną do objętości 400 μ l. Stężenia końcowe w przeliczeniu na 1 ml krwi wynosiły odpowiednio: 1,63, 4,89, 16,0 i 32,0 mg/ml dla HSA oraz 1,31, 3,93, 60,0 i 120,0 mg/ml dla Hgb.

4.1.6.2 Ocena selektywności

Ocena selektywności metody polegała na wykazaniu, że oznaczane białka mogą być jednoznacznie identyfikowane i oznaczane ilościowo w obecności potencjalnych substancji interferujących w matrycy biologicznej. Ocena selektywności była utrudniona ze względu na brak matryc wolnych od interferencji. W celu jej określenia przygotowano próbki osocza oraz krwi pełnej, uzyskane od sześciu różnych dawców, a także próbki hemolizowane oraz lipemiczne. Lizę erytrocytów uzyskano na skutek intensywnego mieszania próbki krwi oraz zamrażania w -80 °C i kolejno rozmrażania. Uzyskaną hemolizowaną krew dodano do osocza w stosunku $\geq 2\%$ v/v. Próbki lipemiczne

pochodziły od dawców z wysokim poziomem trójglicerydów. Każda próbka osocza została rozcieńczona pięćdziesięciokrotnie przed analizą z użyciem wody dejonizowanej, natomiast próbki krwi rozcieńczono stukrotnie. Dla każdej próbki wykonano analizę chromatograficzną w trzech powtórzeniach, zgodnie z protokołami opisanymi w podrozdziale 4.1.4, celem sprawdzenia zmienności matrycy i potencjalnych interferencji. Następnie przeprowadzono analizę próbek biologicznych wzbogaconych o znaną ilość wzorcowych białek referencyjnych, uzyskując odpowiednio stężenia: 5 i 40 mg/ml krwi dla HSA oraz 10 i 150 mg/ml krwi dla Hgb w przypadku próbek krwi, a także 1,5 i 40 mg/ml osocza dla HSA oraz 2,0 i 8 mg/ml osocza dla Tf, Fg, Mb, Ins i Hgb w przypadku próbek osocza. Dodatkowo przeanalizowano próbki hemolizowane i lipemiczne, aby ocenić wpływ triglicerydów i hemolizy na wynik oznaczenia. Selektywność oszacowano wstępnie na podstawie uzyskanych chromatogramów. Oceniono czy w czasach retencji oznaczanych białek nie pojawiają się dodatkowe, nieoczekiwane piki, a także czy kształty i rozdzielczości pików są stabilne w różnych próbkach. W przypadku próbek wzbogaconych sprawdzono czy sygnał oznaczanego białka uległ proporcjonalnemu zwiększeniu, kształt i czas retencji pików nie zmienił się po wzbogaceniu oraz czy nie pojawiły się dodatkowe piki w jego sąsiedztwie. Ponadto, w celu dokładniejszej oceny selektywności zastosowano metodę referencyjną – wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z detektorem z matrycą diodową (HPLC-DAD) – za pomocą której oceniono czystość pików. W tym celu, oprócz próbek biologicznych przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w tej sekcji, sporządzono próbki roztworów standardowych analizowanych białek o stężeniu 1 mg/ml, które poddano analizie, a następnie porównano odpowiednie widma poprzez nałożenie widm z różnych próbek na siebie.

4.1.6.3 Wyznaczenie zakresu liniowości

Liniowość opracowanej metody została wyznaczona w oparciu o metodę krzywej wzorcowej. Siedmiopunktowe (krew) lub ośmiopunktowe (osocze) krzywe kalibracyjne zostały wygenerowane dla każdego analitu z użyciem próbki ślepej oraz siedmiu/ośmiu poziomów stężeń standardów kalibracyjnych, w tym LOQ oraz ULOQ. Ponieważ odpowiedź detektora ELSD nie jest liniowa, ustalono zależność podwójnie logarytmiczną, wykonując pomiary w trzech powtórzeniach przez kolejne trzy dni robocze. Ze względu na bardzo dobre dopasowanie liniowe logarytmu odpowiedzi ELSD do logarytmu stężenia analitu, uzyskane dane pasowały do równania typu: $y = ax + b$.

W związku z tym równanie krzywej kalibracyjnej wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów (regresji liniowej). W przypadku próbek osocza badany zakres liniowości wynosił: 1,35 – 10,0 mg/ml osocza dla Ins, 1,51 – 10,0 mg/ml osocza dla Tf, 1,39 – 50,0 mg/ml osocza dla HSA, 1,22 – 10,0 mg/ml osocza dla Fg, 1,36 – 10,0 mg/ml osocza dla Mb oraz 1,31 – 10,0 mg/ml osocza dla Hgb. Gdy matrycą była krew, badany zakres kalibracyjny metody prezentował się następująco: 1,63 – 40,0 mg/ml krwi dla HSA oraz 1,31 – 150,0 mg/ml krwi dla Hgb. Sprawdzono, czy dokładność obliczonych wstecz stężeń każdego standardu kalibracyjnego mieściła się w zakresie $\pm 20\%$ nominalnego stężenia dla LOQ oraz $\pm 15\%$ dla pozostałych poziomów stężeń. Założono, że co najmniej 75% standardów kalibracyjnych powinno spełniać te kryteria.

4.1.6.4 Wyznaczenie granic wykrywalności i oznaczalności

W celu wyznaczenia LOD oraz LOQ sporządzono krzywe kalibracyjne dla każdego z analitów, przeprowadzając uprzednio pomiary dla próbek osocza lub krwi wzbogaconych roztworami wzorcowymi analizowanych białek na ośmiu (krew) lub siedmiu (osocze) poziomach stężeń wynoszących odpowiednio: 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 20,0 i 30,0 mg/ml krwi dla HSA i Hgb w przypadku, gdy matrycą była krew, oraz 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0 mg/ml osocza dla Ins, Fg, Mb i Hgb, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 mg/ml osocza dla Tf i 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 20,0, 35,0, 45,0 mg/ml osocza dla HSA, gdy matrycą było osocze. Sposób przygotowania próbki był analogiczny jak opisany w podrozdziale 4.1.6.1. Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach. LOD oraz LOQ określono na podstawie odchylenia standardowego wyrazu wolnego oraz nachylenia krzywej kalibracyjnej zgodnie ze wzorami:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{s}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{s}$$

gdzie:

σ – odchylenie standardowe wyrazu wolnego,

S – współczynnik kierunkowy prostej (nachylenie krzywej kalibracyjnej).

4.1.6.5 Ocena precyzji i dokładności

QCs użyte do badań dokładności i precyzji zostały przygotowane na czterech poziomach stężeń w zakresie krzywej kalibracyjnej: LOQ, trzykrotności LOQ (QC

niskie), 40% zakresu krzywej kalibracyjnej (QC średnie) oraz 80% ULOQ (QC wysokie). Dokładny sposób przygotowania QCs przedstawiono w podrozdziale 4.1.6.1. Dokładność i precyzja zostały ocenione na podstawie pięciu powtórzeń na każdym poziomie stężeń QCs w obrębie jednej serii analitycznej (dokładność i precyzja wewnątrzserijna) oraz poprzez analizę każdego poziomu QCs w trzech sekwencjach analitycznych przeprowadzonych w dwóch różnych dniach (dokładność i precyzja międzyseryjna). Ponadto dla każdego analitu określono jego stężenie endogenne w próbce ślepej, które następnie odjęto od całkowitego stężenia obserwowanego w próbkach wzbogaconych. Zgodnie z zaleceniami, dokładność była obliczana na podstawie wzoru przedstawionego w podrozdziale 3.2.3.2. Jako kryteria akceptacji przyjęto, iż dokładność, wyrażona jako procent odzysku analitu, na każdym poziomie stężenia powinna mieścić się w zakresie $\pm 15\%$ wartości nominalnej, z wyjątkiem LOQ, gdzie powinna mieścić się w zakresie $\pm 20\%$. Precyzja (wyrażona jako %RSD) oznaczonych stężeń na każdym poziomie nie powinna przekraczać 15%, z wyjątkiem najniższego stężenia na krzywej kalibracyjnej, gdzie nie powinna przekraczać 20%.

4.1.6.6 Testowanie odporności metody

Testowanie odporności miało na celu wykazanie niezawodności procedury analitycznej w odniesieniu do celowych zmian parametrów analitycznych, takich jak prędkość przepływu fazy ruchomej ($1,0 \pm 0,1$ ml/min), stężenie TFA w fazie wodnej i organicznej ($0,1\% \pm 0,01\%$) oraz temperatura separacji ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Parametrami ocenianymi w trakcie testowania odporności metody były: czas retencji, powierzchnia piku oraz rozdzielczość. Do oceny odporności metody wykorzystano wzbogacone próbki osocza oraz krwi o stężeniu egzogennym każdego z białek wynoszącym 5 mg/ml, z wyjątkiem HSA, której stężenie w osoczu wynosiło 25 mg/ml. Procedura przygotowania próbek biologicznych do analizy była identyczna jak w przypadku wzorców kalibracyjnych. Wszystkie próbki analizowano trzykrotnie.

4.1.6.7 Ocena występowania zjawiska przeniesienia próbki

Celem procedury była ocena i minimalizacja efektu przeniesienia próbki, czyli niepożądanego zanieczyszczenia próbki poddawanej analizie chromatograficznej białkami endogennymi znajdującymi się w pętli automatycznego podajnika próbek, pochodzącymi z poprzednio analizowanej próbki. Przeniesienie próbki oceniono poprzez analizę próbek zawierających PBS o pH 7,4 umieszczonych bezpośrednio po próbkach

standardów kalibracyjnych o najwyższym stężeniu z zakresu kalibracyjnego (ULOQ). Próbkę analizowano trzykrotnie. Przeniesienie próbki zostało obliczone ze wzoru:

$$\text{Przeniesienie próbki (\%)} = \frac{Y_0}{Y_{LOQ}} \times 100$$

gdzie:

Y_0 – sygnał analitu w próbce zawierającej matrycę zastępczą,

Y_{LOQ} – sygnał analitu w standardzie kalibracyjnym na poziomie LOQ.

Jako kryterium akceptacji przyjęto, że odpowiedź analitu w próbce zawierającej matrycę zastępczą po standardzie ULOQ nie powinna przekraczać 20% odpowiedzi na poziomie LOQ.

4.1.6.8 Ocena wpływu matrycy

W badaniu wykorzystano osocze i krew pochodzące od sześciu niezależnych dawców, a także próbki hemolizowane i lipemiczne. Ocena efektu matrycy została przeprowadzona poprzez analizę QCs na dwóch poziomach stężeń, tj. niskim oraz wysokim. W przypadku próbek osocza stężenia egzogenne białek wynosiły odpowiednio: 4,05 i 8,0 mg/ml osocza dla Ins, 4,53 i 8,0 mg/ml osocza dla Tf, 4,17 i 40,0 mg/ml osocza dla HSA, 3,66 i 8,0 mg/ml osocza dla Fg, 4,08 i 8,0 mg/ml osocza dla Mb oraz 3,93 i 8,0 mg/ml osocza dla Hgb. Dla próbek krwi zawartości analitów były następujące: 4,89 i 32,0 mg/ml krwi dla HSA oraz 3,93 i 120 mg/ml krwi dla Hgb. Każda próbka została przygotowana zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.1.6.1 w trzech powtórzeniach dla każdej z sześciu matryc i analizowana za pomocą opracowanej procedury analitycznej. Jako kryterium akceptacji przyjęto, iż %RSD (precyzja) dla każdego stężenia nie powinien być większy niż 15%, natomiast dokładność, wyrażona jako % odzysku, dla każdego ze stężeń powinna mieścić się w przedziale 85 – 115%.

4.1.6.9 Badania stabilności analitów w matrycy

Badania stabilności przeprowadzono z wykorzystaniem QCs na tych samych poziomach stężeń, jakie zostały opisane w podrozdziale 4.1.6.8. Próbkę analizowano zarówno w momencie początkowym (czas zero), jak i po zastosowaniu warunków, które były oceniane. W przypadku każdego testu stabilności, QCs były analizowane względem świeżo przygotowanych krzywych kalibracyjnych. Aby ocenić wpływ wielokrotnego wyjmowania próbek z zamrażarki, stabilność analizowanych związków została oceniona po trzech cyklach zamrażania i rozmrażania, przy czym próbki były przechowywane w zamrażarce przez co najmniej 12 godzin pomiędzy cyklami. Stabilność

krótkoterminową określono poprzez rozmrożenie QCs w temperaturze pokojowej oraz przechowywanie na stole laboratoryjnym przez ten sam czas, co próbki badane. Stabilność długoterminową testowano w temperaturze -80 °C przez 6 miesięcy. Dodatkowo zbadano stabilność analitów w próbkach przechowywanych w automatycznym podajniku próbek w temperaturze pokojowej w czasie 20 godzin. W celu sprawdzenia, czy uzyskane wyniki analityczne odzwierciedlają stężenia analizowanego związku we krwi badanego w chwili pobrania próbki, przetestowano stabilność analitów w matrycy, tj. krwi pełnej, bezpośrednio po pobraniu próbek od uczestników badania i przed przygotowaniem do przechowywania w temperaturze -80 °C. W tym celu próbki analizowano zgodnie z opracowaną procedurą niezwłocznie po pobraniu materiału do badań (czas zerowy). Następnie próbki te przechowywano przez 30 minut w temperaturze 4 °C, co symulowało warunki, które występują pomiędzy pobraniem a transportem próbek do laboratorium, i ponownie poddawano analizie.

4.1.6.10 Przeprowadzenie testu zgodności

Test zgodności został przeprowadzony poprzez analizę QCs o stężeniach wynoszących 80% ULOQ w dziesięciu powtórzeniach. Parametrami ocenianymi w trakcie przeprowadzania testu zgodności były podstawowe parametry charakteryzujące proces chromatograficzny, w tym liczba pól teoretycznych (N), rozdzielczość (R_s), współczynnik ogonowania (T_f), retencja względna (k') oraz całkowity czas retencji (t_r). Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SD (%RSD) i porównano z kryteriami akceptacji.

4.1.7 Zielona chemia analityczna – oceny ekologiczności etapu przygotowania próbki w procedurze analitycznej oraz opracowanej metody chromatograficznej

Do oceny ekologiczności etapu przygotowania próbki do analizy chromatograficznej wykorzystano oprogramowanie AGREEp^{rep} w wersji 0.91 ^[195], natomiast w celu oceny zieloności opracowanej metody chromatograficznej zastosowano oprogramowanie AGREE – Analytical GREENness Calculator (wersja 0.5 beta) ^[196]. Pierwsze narzędzie metryczne opiera się na 10 kategoriach oceny, przeliczając wyniki w skali 0 – 1. W drugim przypadku kryteria oceny oparte były o 12 zasad zielonej chemii analitycznej i także przekształcane w ujednoliconą skalę 0 – 1. Wynik przedstawiono w postaci piktogramu wskazującego końcową ocenę, wydajność procedury analitycznej

w każdym kryterium oraz wagi przypisane przez użytkownika. W niniejszej procedurze, dla wszystkich ocenianych zasad stosowano domyślne wagi.

4.1.8 Zastosowanie opracowanych procedur analitycznych do oznaczenia wybranych białek w próbkach biologicznych

Opracowane i zwalidowane protokoły chromatograficzne wykorzystano do oznaczenia wybranych białek endogennych w próbkach osocza oraz krwi pełnej pochodzących od 25 potencjalnie zdrowych ochotników oraz 25 pacjentów ze zdiagnozowanym RZS. Próbki do oznaczeń końcowych rozcieńczano 50-krotnie (osocze) lub 100-krotnie (krew) za pomocą wody dejonizowanej. W tym celu do probówki typu Eppendorf o pojemności 500 μ l dodawano 4 μ l osocza lub krwi, a następnie uzupełniano odpowiednio 196 μ l lub 396 μ l wody dejonizowanej i delikatnie mieszano. Tak przygotowane próbki wprowadzano do układu HPLC w objętości 5 μ l i poddawano analizie. Każdy pomiar wykonano w trzech powtórzeniach.

4.1.9 Analiza statystyczna

Wszystkie obliczenia, wykresy i analizy statystyczne zostały przeprowadzone za pomocą programu Microsoft Excel 16.0 (Microsoft Corporation) oraz platformy Statistics Kingdom. O ile nie zaznaczono inaczej, wykresy przedstawiają reprezentatywny zestaw wyników uzyskanych dla próbki osocza/krewi pochodzącej od jednej, potencjalnie zdrowej osoby. Wszystkie wyniki z etapu walidacji metody przedstawiono jako średnią $\pm$ SD z co najmniej trzech, niezależnych analiz chromatograficznych. Normalność rozkładu danych oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Do oceny homogeniczności wariancji wykorzystano test Levene'a. W przypadku zmiennych o rozkładzie normalnym do porównania grup zastosowano test t-Studenta (test t z dwiema próbami zakładający równe wariancje) lub test t-Welcha (test t z dwiema próbami zakładający nierówne wariancje). W przypadku zmiennych o rozkładzie odbiegającym od normalnego zastosowano test U Manna-Whitneya. Dla każdej zmiennej obliczono wartości średnie i SD lub mediany (Me) i rozstępu ćwiartkowego (IQR), w zależności od rozkładu danych. Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$. Do wyznaczenia równania krzywej kalibracyjnej zastosowano model regresji liniowej oparty o metodę najmniejszych kwadratów. W celu uzyskania liniowości, zarówno sygnał detektora, jak i stężenie analitu zostały przekształcone do skali logarytmicznej (logarytm dziesiętny). Po dokonaniu transformacji danych, wyznaczono zależność między logarytmem średniej powierzchni

piku a logarytmem stężenia analitu. Równanie krzywej kalibracyjnej przyjęło postać prostoliniową:

$$\log(A) = a \cdot \log(C) + b$$

gdzie:

$\log(A)$ – logarytm średniej powierzchni piku,

a – współczynnik kierunkowy prostej,

$\log(C)$ – logarytm stężenia analitu,

b – wyraz wolny.

Wartości współczynnika kierunkowego prostej oraz wyrazu wolnego obliczono za pomocą regresji liniowej. Jako miarę jakości dopasowania modelu do danych zastosowano współczynnik determinacji R^2 .

4.2 Wyniki i dyskusja

W niniejszym podrozdziale przedstawiono szczegółową analizę wyników uzyskanych przy użyciu opracowanej metody HPLC-ELSD służącej do oznaczania wybranych białek endogennych w płynach ustrojowych człowieka. Szczególna uwaga została poświęcona optymalizacji procedur, które umożliwiły zarówno selektywne rozdzielenie i detekcję analitów w próbkach biologicznych pochodzących od ochotników badania, jak i wygenerowanie wysokiej jakości wyników analitycznych. Podczas rozwijania metody, kluczowym elementem była troska o ekologiczność stosowanych procedur laboratoryjnych, które optymalizowano z uwzględnieniem 12 zasad zielonej chemii analitycznej. Celem było opracowanie protokołów, które będą nie tylko efektywne, ale także przyjazne dla środowiska ze względu na minimalizację zużycia odczynników chemicznych oraz redukcję generowanych odpadów, pozwalając tym samym na uzyskanie wiarygodnych wyników w sposób bardziej zrównoważony. Niewątpliwą zaletą jest fakt, iż zastosowanie detekcji ELSD w połączeniu z RP-HPLC umożliwiło precyzyjne określenie stężenia białek w próbkach osocza i krwi, przy jednoczesnym zachowaniu prostoty przygotowania próbki do analizy. Pozwoliło to bowiem na oszczędność czasu, redukcję zużycia toksycznych odczynników i minimalizację całkowitego błędu metody. Zgodnie z wiedzą autorki, dotychczas nie opublikowano badań, które obejmowałyby zastosowanie techniki HPLC-ELSD do jednoczesnego oznaczania kilku białek endogennych w płynach biologicznych człowieka. W szczególności brak jest literatury dotyczącej zastosowania tej metody do analizy stężenia białek ostrej fazy w próbkach osocza i krwi pacjentów z RZS, co stanowi

istotną lukę w analityce klinicznej. Ponadto większość badań dotyczących oznaczania białek w przebiegu chorób autoimmunologicznych opiera się na innych metodach bioanalitycznych ^[197–199], takich jak ELISA, immunoblotting czy spektrometria mas, co dodatkowo podkreśla nowatorski charakter przeprowadzonych badań. Dyskusję wyników skoncentrowano na interpretacji uzyskanych danych w kontekście literatury przedmiotu i aktualnych badań oraz ich potencjalnego zastosowania w diagnostyce i monitorowaniu postępu autoimmunologicznych chorób zapalnych, takich jak RZS. Wnioski z analizy mają na celu ocenę efektywności opracowanej metodologii oraz potencjalnych kierunków dalszych badań nad rolą białek w predykcji ryzyka sercowo-naczyniowego w przebiegu chorób z autoagresji.

4.2.1 Etap przygotowania próbek biologicznych do analizy

Analiza białek w próbkach biologicznych, takich jak krew czy osocze, stanowi istotne wyzwanie w chemii analitycznej ze względu na złożoność tych matryc, wynikającą z obecności dużej liczby składników o różnorodnych właściwościach fizyko-chemicznych ^[200]. Jednym z kluczowych problemów jest szeroki zakres stężeń białek w osoczu krwi. HSA jest białkiem dominującym, stanowiącym ponad 50% wszystkich białek osocza, podczas gdy inne białka, takie jak hormony peptydowe (np. insulina), występują w znacznie mniejszych stężeniach ^[201]. Dysproporcja ta sprawia, że detekcja białek o niskim stężeniu może być znacznie utrudniona, gdyż sygnały pochodzące od najobficiej występujących analitów białkowych mogą maskować obecność tych mniej licznych. Ponadto pozostałe składniki osocza, takie jak metabolity czy lipidy, mogą prowadzić do zakłóceń sygnału i trudności w optymalizacji warunków chromatograficznych. Aby zminimalizować wpływ matrycy na wyniki oznaczeń, często konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych etapów przygotowania próbki, takich jak ekstrakcja do fazy stałej, oczyszczanie czy zateżanie. Dodatkowo białka mogą ulegać denaturacji lub degradacji, co wymaga stosowania odpowiednich inhibitorów oraz kontroli warunków przechowywania próbek biologicznych w celu minimalizacji wystąpienia modyfikacji, które mogą wpłynąć na wynik analizy. Zastosowanie detekcji ELSD w analizie endogennych białek w próbkach biologicznych pozwoliło na uproszczenie procesu przygotowania próbki w porównaniu do innych technik detekcji stosowanych w połączeniu z HPLC. ELSD jest detektorem niezależnym od właściwości optycznych związku, pozwalającym na oznaczanie substancji, które nie posiadają grup chromoforowych, ani nie wykazują naturalnej fluorescencji, dzięki czemu nie ma

konieczności przeprowadzania reakcji znakowania białek jak ma to miejsce na przykład w detekcji FLD [202–204]. W przypadku spektrometrii mas, która jest jedną z najczęściej stosowanych metod oznaczania białek, przygotowanie próbki jest znacznie bardziej złożone. Wymaga ono często etapów oczyszczania, odsalania i usuwania składników matrycy, które mogą wywoływać jonizację analitu. Dodatkowo analiza białek techniką chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) wiąże się z koniecznością zastosowania trawienia enzymatycznego, zwykle z użyciem trypsyny, co znacząco wydłuża czas analizy i zwiększa stopień skomplikowania procedury. W porównaniu do tych metod, przygotowanie próbek do analizy z zastosowaniem ELSD jest znacznie mniej wymagające. Wystarczy odpowiednie rozcieńczenie próbki w kompatybilnym rozpuszczalniku, co nie tylko minimalizuje efekt matrycowy, ale także eliminuje konieczność wieloetapowego oczyszczania i modyfikacji chemicznej analitów. W konsekwencji, metoda ta charakteryzuje się większą powtarzalnością, mniejszą liczbą potencjalnych źródeł błędów oraz krótszym czasem przygotowania próbki, co czyni ją bardziej efektywną w rutynowych analizach białek w złożonych matrycach biologicznych.

Ze względu na obserwowany efekt matrycy, polegający na supresji sygnału oraz potencjalnym przeładowaniu detektora ELSD, dokonano oceny wpływu różnych stopni rozcieńczenia próbek osocza oraz krwi pełnej na wyniki analizy. W tym celu próbki rozcieńczano 10-, 25-, 50- oraz 100-krotnie, wykorzystując jako rozpuszczalnik wodę dejonizowaną. Każdą z rozcieńczonych próbek analizowano przy zastosowaniu zoptymalizowanych warunków chromatograficznych oraz parametrów detekcji, a odpowiedź detektora oceniano pod kątem powtarzalności oraz intensywności sygnału. Uzyskane wyniki wykazały, że przy niższych stopniach rozcieńczenia występowało obcinanie sygnału oraz zwiększona wariancja między pomiarami, co prawdopodobnie wynikało z interferencji składników matrycy, takich jak lipidy czy sole. Innym czynnikiem mogła być nieliniowość wskazań detektora, która objawia się ograniczoną odpowiedzią przy wysokich stężeniach analitu. ELSD działa na zasadzie odparowywania rozpuszczalnika i rozpraszania światła przez pozostałe cząstki, dlatego przy bardzo wysokich stężeniach składników próbek mogło dochodzić do zjawiska wysycenia detektora. Kolejną z możliwych przyczyn obserwowanego zjawiska mógł być także fakt, iż w stężonych próbkach białka mogły wykazywać większą tendencję do interakcji cząsteczkowych, tworząc agregaty, co mogło mieć wpływ na intensywność sygnału. Zwiększona lepkość próbki mogła skutkować mniej efektywnym generowaniem aerozolu

i nierównomiernym rozkładem cząstek, prowadząc do obniżenia czułości detekcji i większej zmienności wyników. Optymalne rezultaty otrzymano przy 50-krotnym rozcieńczeniu próbek osocza oraz 100-krotnym rozcieńczeniu próbek krwi pełnej. W tych warunkach sygnały analitów były stabilne, nie obserwowano efektu supresji, a odpowiedź detektora wykazywała dobrą powtarzalność. W związku z tym do dalszych analiz przyjęto te wartości jako optymalne.

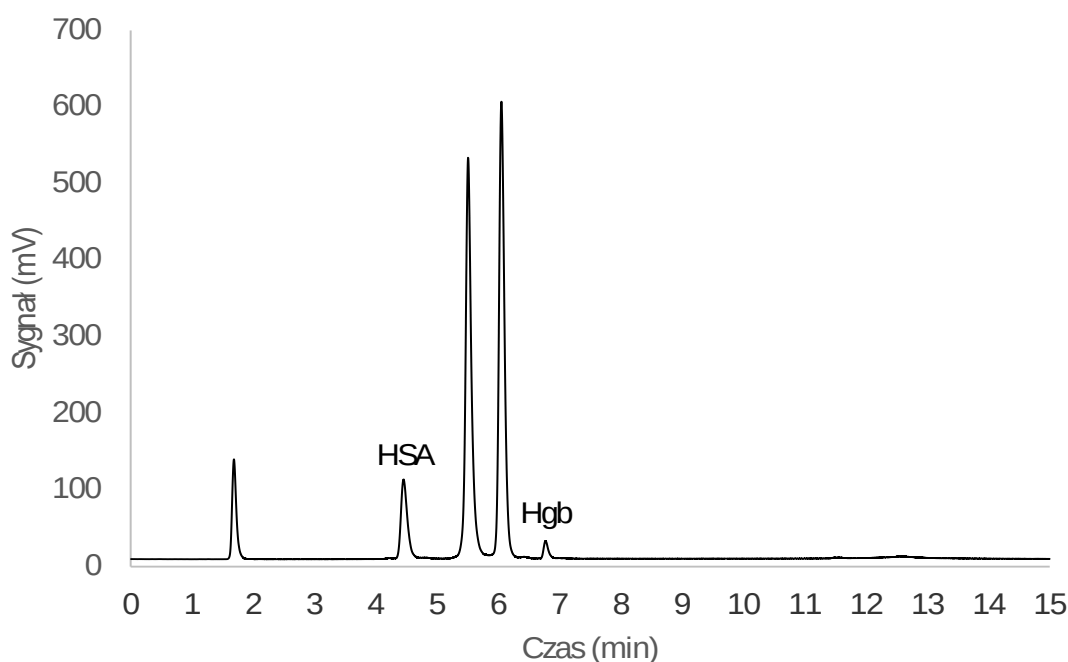
Zastosowana procedura przygotowania próbek biologicznych do analizy chromatograficznej, oparta wyłącznie na rozcieńczeniu osocza i krwi za pomocą wody dejonizowanej, charakteryzuje się wyjątkową szybkością i prostotą. Brak konieczności stosowania skomplikowanych etapów ekstrakcji czy oczyszczania próbek przekłada się na minimalizację ryzyka utraty analitu oraz potencjalnych błędów proceduralnych. Prostota etapu zapewnia wysoką efektywność badań i powtarzalność wyników nawet przy analizie dużej liczby próbek, co redukuje koszty i czas analizy. Metoda ta doskonale wpisuje się w zasady zielonej chemii analitycznej ^[205,206], gdyż wyłączne użycie wody dejonizowanej jako rozpuszczalnika eliminuje potrzebę stosowania toksycznych, organicznych substancji, co nie tylko minimalizuje zużycie odczynników, ale również zapobiega powstawaniu szkodliwych dla środowiska odpadów chemicznych. Co więcej, prosty sposób obróbki próbki, niewymagający użycia jakichkolwiek sprzętów laboratoryjnych, zmniejsza zapotrzebowanie na energię, przyczyniając się tym samym do redukcji śladu węglowego. Takie podejście stanowi doskonały przykład chemii zrównoważonego rozwoju, o której pisali m.in. Gałuszka i in. ^[205], Armenta i in. ^[206], Anastas ^[207], czy Marciniec ^[208] oraz Bystrzanowska i in. ^[209]. Ich prace podkreślają znaczenie minimalizacji zużycia niebezpiecznych odczynników chemicznych oraz redukcji generowania toksycznych odpadów, co stanowi fundament zielonej analityki.

4.2.2 Optymalizacja warunków chromatograficznych i parametrów detekcji

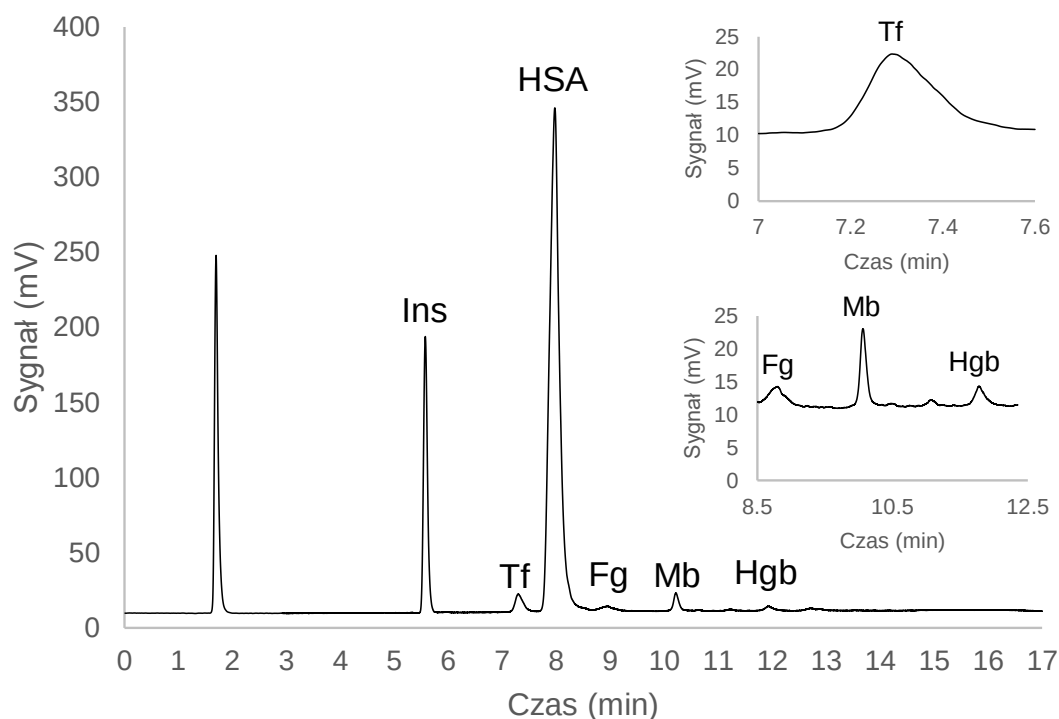
Istotnym celem niniejszych badań było opracowanie jak najbardziej uniwersalnych warunków chromatograficznych, pozwalających na oznaczenie wybranych białek endogennych zarówno w próbkach osocza, jak i krwi pełnej. Spośród kolumn dedykowanych białkom i dostępnych w laboratorium, Accucore 150-C4 (150 × 4,6 mm, 2,6 µm) firmy Thermo Fisher Scientific, okazała się najlepszym wyborem. Dzięki jej zastosowaniu możliwe było wykorzystanie tej samej kolumny w obu protokołach, co pozwoliło na redukcję kosztów związanych z etapem rozwijania i walidacji metody oraz wykonaniem oznaczeń końcowych. W celu uzyskania

zadowalającej selektywności oraz korzystnej wartości rozdzielczości pików, przebadano wiele zmiennych wpływających na rozdzielenie chromatograficzne, w tym skład fazy ruchomej, prędkość jej przepływu oraz tryb elucji. Każdy testowany rozpuszczalnik był czystości HPLC oraz w pełni kompatybilny z zastosowaną kolumną chromatograficzną i detektorem. Należy bowiem pamiętać, że przy stosowaniu detekcji ELSD wymagane jest używanie wyłącznie lotnych dodatków do fazy ruchomej ^[189]. Ponadto rozpuszczalnik nie powinien zawierać środków konserwujących, takich jak na przykład butylowany hydroksytoluen, który jest zwykle stosowany jako stabilizator w tetrahydrofuranie, gdyż może to zwiększać poziom szumu bazowego. Nie zaleca się także stosowania rozpuszczalników o wysokiej temperaturze wrzenia. Testowanymi lotnymi modyfikatorami fazy ruchomej były kwas mrówkowy, kwas octowy oraz TFA. Sprawdzano wpływ stężenia modyfikatora oraz pH eluentu na separację analitów. W każdym przypadku bazę fazy ruchomej stanowiły woda i ACN. Wybór docelowego składu fazy ruchomej, prędkości jej przepływu oraz profilu gradientu każdorazowo poprzedzony był oceną kluczowych parametrów chromatograficznych, takich jak stabilność i powtarzalność czasów retencji, symetria i kształt pików oraz rozdzielczość. Minimalizacja efektu ogonowania pików oraz skuteczne rozdzielenie wszystkich analitów w badanych matrycach biologicznych zostało osiągnięte dzięki zastosowaniu fazy ruchomej złożonej z 0,1% TFA w H₂O (składnik A) oraz 0,1% TFA w ACN (składnik B), a także prędkości przepływu wynoszącej 1 ml/min. Obecność modyfikatora w postaci TFA pozwoliła na efektywną separację białek poprzez modulację ich ładunku elektrycznego oraz wzrost hydrofobowości docelowych analitów, co skutkowało lepszą retencją i selektywnością. Ponadto odpowiedni dobór fazy ruchomej skutkowało obniżeniem poziomów szumu detektora ELSD, co zwiększyło czułość oznaczeń. Zastosowanie elucji gradientowej pozwoliło na efektywną separację białek o różnych właściwościach fizyko-chemicznych i hydrofobowości. Stopniowe zwiększanie stężenia składnika organicznego w fazie ruchomej umożliwiało wymywanie białek o różnych polarnościach w optymalnym czasie. Zoptymalizowane programy elucji skutkowały uzyskaniem lepszej rozdzielczości i uniknięciem nakładania się pików, co miało miejsce w przypadku zastosowania elucji izokratycznej. Ponadto elucja gradientowa pozwalała na skrócenie czasu analizy i minimalizację przeniesienia próbki. Programy elucji różniły się w zależności od analizowanej matrycy biologicznej, ponieważ krew zawierała dodatkowe składniki komórkowe, takie jak erytrocyty, leukocyty oraz płytki krwi, które mogły wpływać na oddziaływanie analitów z kolumną chromatograficzną. Gradient

został zoptymalizowany w sposób umożliwiający skuteczne wymywanie interferujących składników morfotycznych oraz uniknięcie ich adsorpcji na kolumnie. Wszystkie przeprowadzone eksperymenty doprowadziły do ustalenia optymalnych warunków chromatograficznych dla każdego z analitów, które opisano w podrozdziale 4.1.4. Kolejność elucji białek w analizowanych próbkach osocza była następująca: Ins ($t_r = 5,57$ min), Tf ($t_r = 7,29$ min), HSA ($t_r = 7,97$ min), Fg ($t_r = 8,95$ min), Mb ($t_r = 10,21$ min) oraz Hgb ($t_r = 11,93$ min). W przypadku próbek krwi, czasy retencji HSA i Hgb wynosiły odpowiednio 4,49 oraz 6,78 min. Przykładowe chromatogramy uzyskane dla wzbogaconych próbek osocza oraz krwi pochodzących od zdrowego ochotnika przedstawiono na Rysunkach 24 i 25.



Rysunek 24. Przykładowy chromatogram uzyskany dla próbki krwi wzbogaconej znaną ilością wzorców o końcowym stężeniu egzogennym białek wynoszącym 10 mg/ml dla HSA oraz 30 mg/ml dla Hgb; protokół przygotowania próbki opisano w podrozdziale 4.1.6.1, natomiast warunki chromatograficzne w podrozdziale 4.1.4.1



Rysunek 25. Przykładowy chromatogram uzyskany dla próbki osocza wzbogaconej znaną ilością wzorców o końcowym stężeniu egzogennym białek wynoszącym 4 mg/ml osocza dla Ins, 3 mg/ml osocza dla Tf, 15 mg/ml osocza dla HSA, 2,5 mg/ml osocza dla Fg oraz 3 mg/ml osocza dla Mb i Hgb; protokół przygotowania próbki opisano w podrozdziale 4.1.6.1, natomiast warunki chromatograficzne w podrozdziale 4.1.4.2

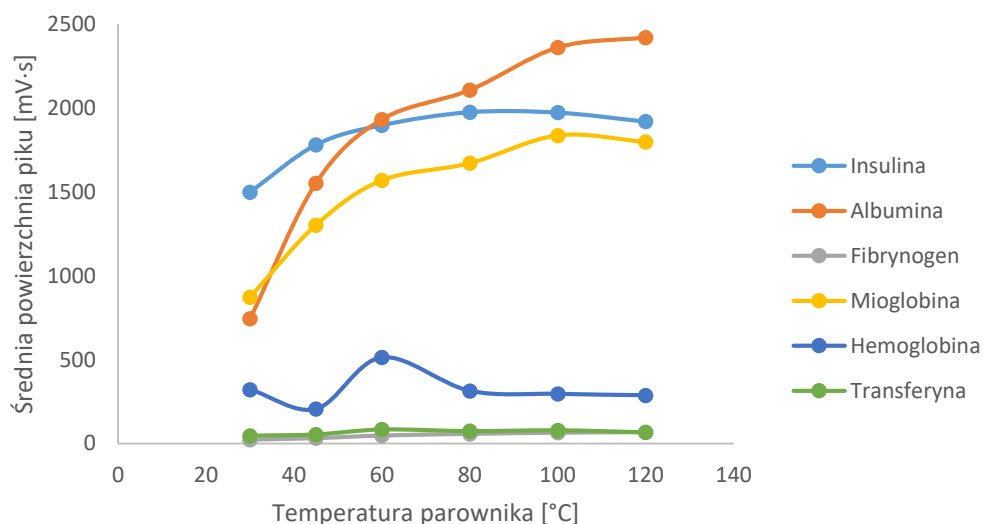
Podczas etapu opracowywania metody, optymalizacji poddano także parametry detekcji ELSD, co miało na celu zwiększenie czułości i selektywności analiz. Testowane parametry obejmowały temperaturę parownika, temperaturę nebulizatora, przepływ gazu parownika, wzmocnienie sygnału, tempo zbierania danych oraz wygładzenie sygnału. Początkowe eksperymenty przeprowadzono z domyślnymi ustawieniami detektora ELSD, zalecanymi przez producenta i przedstawionymi w Tabeli 4 ^[189]. Następnie każdy z wymienionych parametrów został dostosowany w celu uzyskania najlepszej wydajności. Zmianie podlegał wyłącznie jeden parametr w zakresie określonym w zaleceniach, podczas gdy wartość pozostałych była stała. Wszystkie testy przeprowadzono w co najmniej trzech powtórzeniach, a uzyskane wyniki uśredniano.

Tabela 4. Domyślne ustawienia detektora ELSD ^[189]

Parametr detekcji ELSD	Wartość domyślna
Temperatura parownika [°C]	30
Temperatura nebulizatora [°C]	30
Przepływ gazu parownika [SLM]	1,6

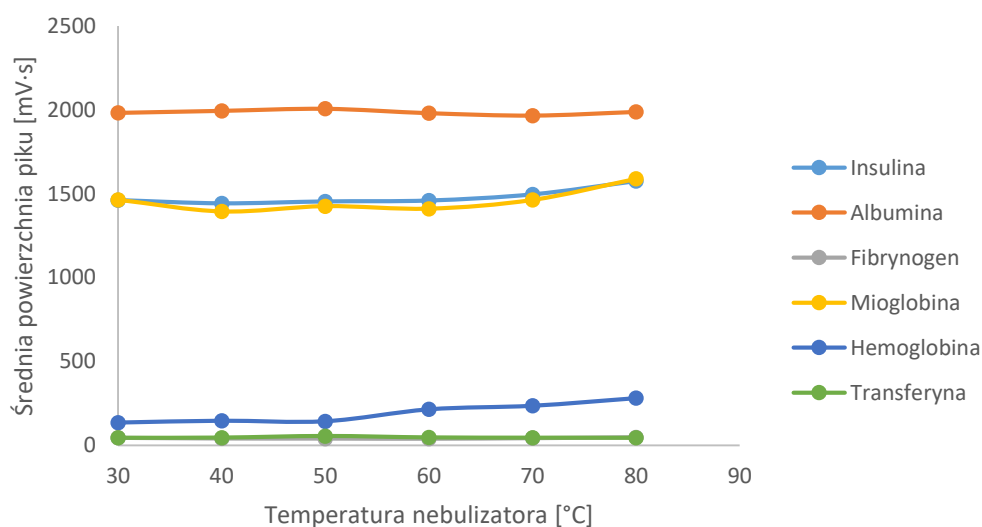
Tempo zbierania danych [Hz]	10
Wyglądzenie sygnału	30
Intensywność źródła światła [%]	100

W pierwszej kolejności zbadano wpływ temperatury parownika na wyniki oznaczeń. Parametr ten należy ustawić zgodnie z lotnością analizowanych związków. W niniejszych badaniach, wydajność odparowywania rozpuszczalnika sprawdzano w temperaturach 30, 45, 60, 80, 100 oraz 120 °C. Wykres przedstawiający zależność średniej powierzchni pików od temperatury parownika przedstawiono na Rysunku 26. W przypadku HSA oraz Mb wzrostowi temperatury parownika towarzyszył wzrost średniej powierzchni pików analitów, natomiast dla Ins, po osiągnięciu temperatury 80 °C, zauważono tendencję spadkową. Dla Hgb, Tf oraz Fg maksymalne powierzchnie pików uzyskiwano z zastosowaniem temperatury parownika wynoszącej 60 °C. Ze względu na znaczące różnice w endogennej zawartości, budowie oraz właściwościach badanych analitów, a także mając na uwadze zapewnienie wysokiej czułości opracowanej metody, do dalszych eksperymentów, jako optymalną temperaturę parownika, wybrano 60 °C.



Rysunek 26. Wykres zależności średniej powierzchni pików analitu od temperatury parownika, $n = 3$; pozostałe parametry detekcji ustawiono jak następuje: temperatura nebulizatora = 30 °C, przepływ gazu parownika = 1,6 SLM, wzmacnienie sygnału fotopowielacza = 1, wyglądzenie = 30, tempo zbierania danych = 10 Hz, intensywność źródła światła = 100%; warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4

Oprócz temperatury parownika, w celu optymalizacji odpowiedzi sygnału, przetestowano różne temperatury nebulizatora w zakresie 30 – 80 °C. Wyższe wartości parametru powodują wzrost sygnału detektora (Rysunek 27), jednakże należy mieć na uwadze, że temperatura nebulizatora nie może przekraczać temperatury wrzenia fazy ruchomej. Z tego powodu jako optymalną wartość przyjęto 60 °C.



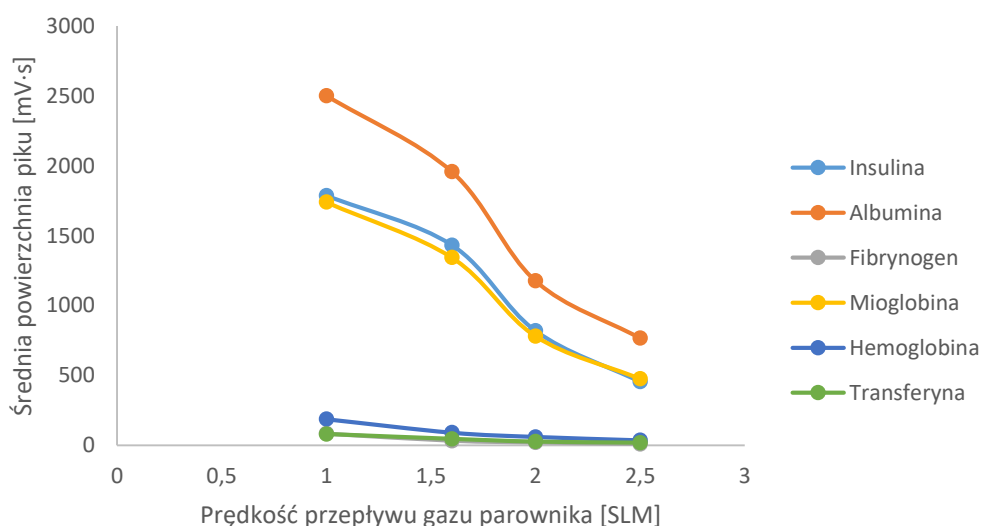
Rysunek 27. Wykres zależności średniej powierzchni pików analitu od temperatury nebulizatora, $n = 3$; pozostałe parametry detekcji ustawiono jak następuje: temperatura parownika = 60 °C, przepływ gazu parownika = 1,6 SLM, wzmacnienie sygnału fotopowielacza = 1, wygładzenie = 30, tempo zbierania danych = 10 Hz, intensywność źródła światła = 100%; warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4

Prędkość przepływu gazu jest parametrem sterującym proces odparowywania rozpuszczalnika, a jego wartość jest ściśle powiązana ze składem fazy ruchomej oraz temperaturą parownika ^[189]. Im wyższa wartość tego ostatniego, tym niższe wymagane wartości przepływu gazu. Gdy temperatura parownika zbliżona jest do temperatury pokojowej, przepływ gazu musi zostać zwiększony, aby to zrekompensować. W ramach prowadzonych eksperymentów, przetestowano cztery wartości prędkości przepływu gazu parownika wynoszące 1,0, 1,6, 2,0 oraz 2,5 SLM. Zgodnie z wykresem przedstawionym na Rysunku 28, dla wszystkich analitów, powierzchnie pików malały wraz ze wzrostem wartości badanego parametru. W związku z tym za optymalną prędkość przepływu gazu parownika przyjęto wartość 1,0 SLM.

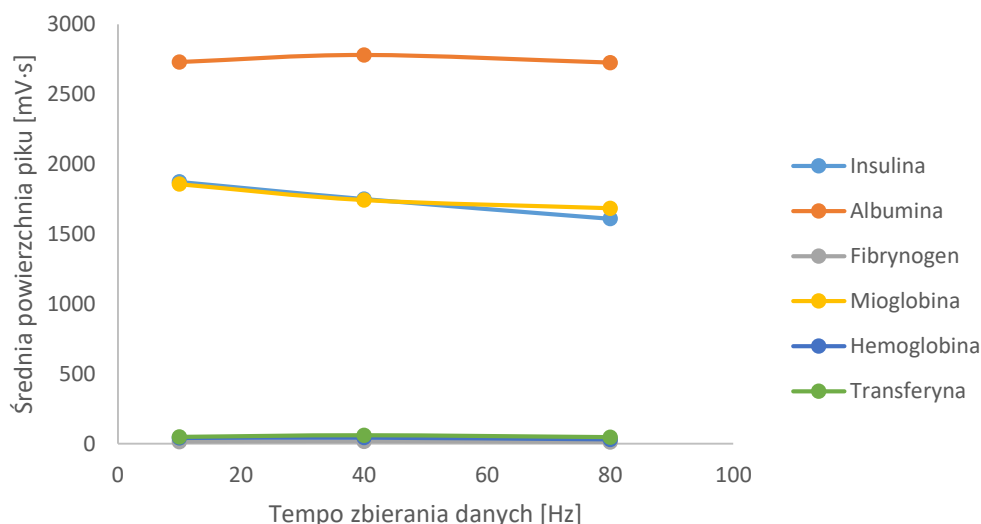
Tempo zbierania danych sprawdzano przy 10 Hz, wartości wybieranej dla standardowych zastosowań, 40 Hz dla szybszych separacji oraz 80 Hz, które używane jest dla zastosowań typu UHPLC. Wykres przedstawiający zależność średniej

powierzchni piku od tempa zbierania danych przedstawiono na Rysunku 29. W przypadku HSA, Fg, Hgb, i Tf najlepsze rezultaty uzyskano dla 40 Hz. Z kolei dla Ins oraz Mb największe wartości średniej powierzchni piku uzyskano przy 10 Hz. Jako optymalną wartość przyjęto zatem 40 Hz.

Wzmocnienie sygnału fotopowielacza zostało przetestowane w zakresie 1 – 5 dla każdej z badanych matryc. Parametr ten określa współczynnik, przez który wzmacniany jest sygnał wyjściowy detektora ELSD. Warto podkreślić, że ustawienie wzmocnienia nie wpływa na czułość detektora, lecz jedynie na amplifikację rejestrowanego sygnału zgodnie z wprowadzonym współczynnikiem, co oznacza, że wartość stosunku sygnału do szumu (S/N) pozostaje stała. W przypadku próbek osocza sygnał detektora wzmacniany był dwukrotnie, podczas gdy dla próbek krwi nie było takiej konieczności, gdyż sygnały pochodzące od badanych analitów były widoczne na chromatogramie.

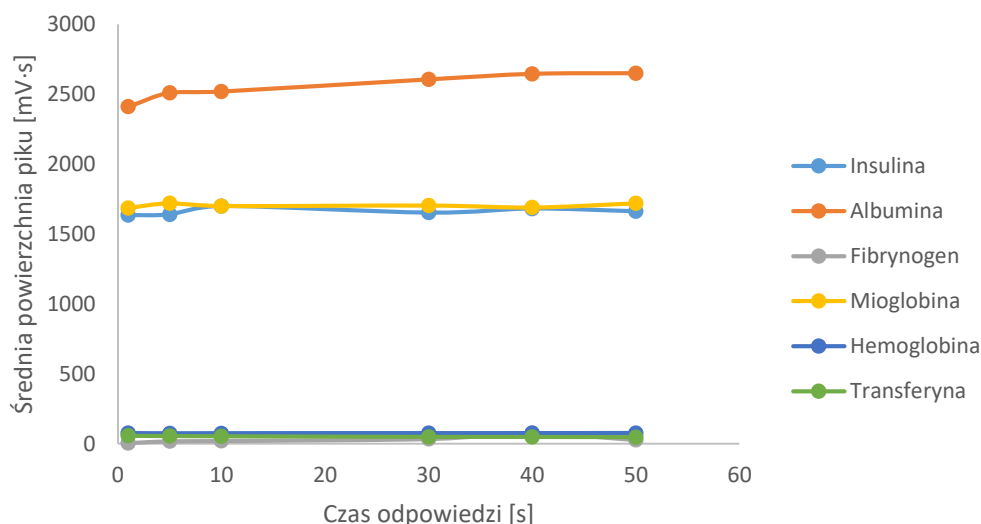


Rysunek 28. Wykres zależności średniej powierzchni piku analitu od prędkości przepływu gazu parownika, $n = 3$; pozostałe parametry detekcji ustawiono jak następuje: temperatura parownika = 60 °C, temperatura nebulizatora = 60 °C, wzmocnienie sygnału fotopowielacza = 1, wygładzenie = 30, tempo zbierania danych = 10 Hz, intensywność źródła światła = 100%; warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4



Rysunek 29. Wykres zależności średniej powierzchni pików analitu od tempa zbierania danych, $n = 3$; pozostałe parametry detekcji ustawiono jak następuje: temperatura parownika = 60 °C, temperatura nebulizatora = 60 °C, przepływ gazu parownika = 1,0 SLM, wzmacnienie sygnału fotopowielacza = 1, wygładzenie = 30, intensywność źródła światła = 100%; warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4

Ostatnim testowanym parametrem było wygładzanie. Szerokość wygładzania jest określana jako liczba punktów danych, na podstawie których następuje uśrednianie, i może być traktowana jako cyfrowa stała czasowa. W większości zastosowań HPLC domyślna wartość 30 (3 s) jest wystarczająca. Jednak w przypadku szybszych separacji, gdzie szerokość pików wynosi mniej niż 3 s, zaleca się ustawienie wartości 1. Zakres wygładzania sprawdzano w przedziale od 1 do 50, co odpowiada przedziałowi czasowemu od 0,1 do 5,0 s. Wyniki testu przedstawiono na Rysunku 30. Za optymalną wartość wygładzania przyjęto wartość domyślną.



Rysunek 30. Wykres zależności średniej powierzchni pików analitu od wygładzania, $n = 3$; pozostałe parametry detekcji ustawiono jak następuje: temperatura parownika = 60 °C, temperatura nebulizatora = 60 °C, przepływ gazu parownika = 1,0 SLM, wzmacnienie sygnału fotopowielacza = 1, tempo zbierania danych = 40 Hz, intensywność źródła światła = 100%; warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4

Identyfikację analitów przeprowadzono poprzez analizę roztworów wzorcowych białek o stężeniu 1 mg/ml, przygotowanych poprzez rozpuszczenie odpowiedniej masy związku w 1 ml wody dejonizowanej. Każdy roztwór przygotowano osobno, a następnie poddano analizie zgodnie z warunkami opisanymi w podrozdziale 4.1.4. W ten sposób sprawdzono, czy pojedynczy analit generuje dokładnie jeden pik na chromatogramie. Dodatkowo oceniono czystość pików każdego z analitów za pomocą systemu HPLC-ELSD-UV. Uzyskane widma porównano i na tej podstawie dokonano oceny, w wyniku której potwierdzono czystość pików danego analitu. Ostateczną identyfikację analitu w próbkach rzeczywistych potwierdzono poprzez porównanie czasów retencji z odpowiednimi danymi uzyskanymi podczas analizy związków wzorcowych.

4.2.3 Walidacja metod bioanalitycznych

Opracowana metoda analityczna oparta o technikę HPLC-ELSD została poddana szczegółowej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH ^[147,174] dotyczącymi walidacji metod bioanalitycznych i analizy próbek badawczych. Proces ten miał na celu ocenę niezawodności, powtarzalności oraz dokładności zastosowanych procedur w odniesieniu do oznaczania wybranych białek endogennych w dwóch różnych matrycach biologicznych. Przeprowadzona walidacja obejmowała kluczowe parametry, takie jak selektywność, zakres liniowości, LOD, LOQ, precyzję, dokładność, odporność metody, przeniesienie próbki, efekt matrycy, stabilność oraz test zgodności systemu.

Przeprowadzona walidacja potwierdziła, że opracowana metoda spełnia wszystkie wymagania stawiane metodom bioanalitycznym i może być z powodzeniem stosowana do analizy rzeczywistych próbek biologicznych, w tym osocza oraz krwi pełnej. Szczegółowe wyniki uzyskane podczas etapu walidacji przedstawiono w niniejszym podrozdziale.

4.2.3.1 Selektywność

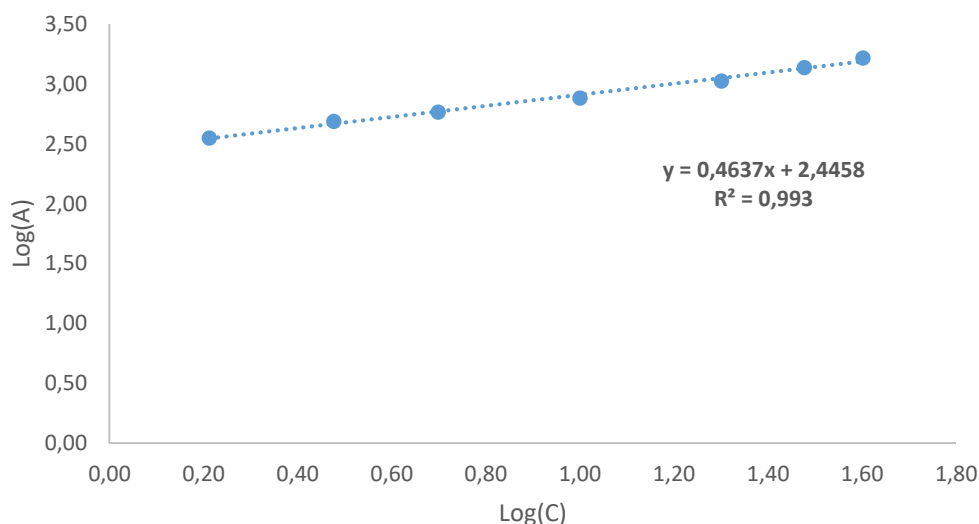
Jednym z kluczowych kryteriów skuteczności danej metody analitycznej jest jej selektywność, czyli zdolność do jednoznacznej identyfikacji i ilościowego oznaczania docelowych analitów w obecności substancji interferujących występujących w złożonej matrycy biologicznej ^[174]. Ze względu na brak matryc całkowicie wolnych od substancji przeszkadzających i analitów, konieczne było zastosowanie alternatywnej strategii badawczej. Przeprowadzenie analiz chromatograficznych próbek osocza i krwi pełnej, pobranych od sześciu różnych dawców, pozwoliło na ocenę osobniczej zmienności składu biologicznego i jego wpływu na końcowe wyniki oznaczeń badanych białek. Co więcej, symulacja rzeczywistych warunków analizy klinicznej poprzez dodatek hemolizowanej krwi do próbek osocza umożliwiła oszacowanie potencjalnych interferencji wynikających z uwolnienia hemoglobiny i pozostałych składników krwinek czerwonych (erytrocytów) na skutek hemolizy, która może występować naturalnie ^[210]. Ponadto przeprowadzona analiza próbek lipemicznych pozwoliła na ocenę wpływu wysokiego stężenia trójglicerydów na efektywność separacji i jakość uzyskanych wyników. W celu potwierdzenia, że badane białka zostały jednoznacznie zidentyfikowane i oznaczone w obecności pozostałych składników danej matrycy, analizie poddano zarówno próbki biologiczne pochodzące od potencjalnie zdrowego uczestnika, jak i próbki wzbogacone znanym stężeniem wzorców. Kluczowym kryterium było wykazanie, że sygnał analitu wzrasta w próbkach wzbogaconych, bez zmian w czasie retencji i kształcie pików. Analiza uzyskanych chromatogramów wykazała brak dodatkowych pików w bliskim sąsiedztwie analitów, co wskazywało na minimalizację wpływu interferencji oraz wysoką czystość oznaczanych białek. Wzbogacenie próbek o znane ilości wzorcowych białek referencyjnych nie spowodowało zmiany kształtu ani czasu retencji pików, co dodatkowo świadczyło o wysokiej selektywności metody. W celu dodatkowej weryfikacji selektywności metody, do badań zastosowano także alternatywną metodę opartą na technice HPLC-DAD. Celem tego podejścia było potwierdzenie czystości pików poprzez porównanie widm uzyskanych w różnych

częściach piku danego analitu. Przeprowadzone analizy wykazały, że nałożone na siebie widma uzyskane z różnych części tego samego piku były identyczne, co świadczy o braku interferencji oraz o czystości oznaczanych białek. Ponadto porównanie widm próbek biologicznych z widmami uzyskanymi dla roztworów standardowych białek o stężeniu 1 mg/ml wykazało ich wysoką zgodność, co stanowiło dodatkowe potwierdzenie selektywności metody.

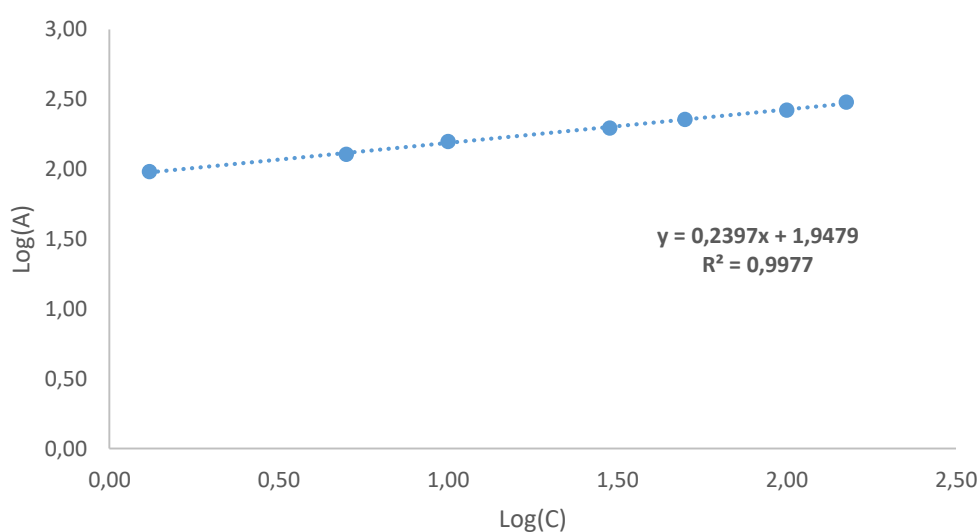
4.2.3.2 Zakres liniowości

W przeciwieństwie do detektorów o liniowej odpowiedzi, takich jak UV-Vis czy FLD, detektor ELSD charakteryzuje się nieliniową zależnością sygnału od stężenia analitu. W związku z tym określenie odpowiedniego modelu matematycznego dla krzywej kalibracyjnej było kluczowe w kontekście oznaczenia ilościowego badanych białek. Najlepsze rezultaty uzyskano po podwójnie logarytmicznym przekształceniu danych, co pozwoliło na uzyskanie zależności liniowej zgodnej z równaniem typu $y = ax + b$. Takie podejście było zgodne z literaturą dotyczącą analizy ilościowej przy użyciu detektora ELSD [211–216]. Metoda najmniejszych kwadratów, za pomocą której wyznaczono parametry krzywej kalibracyjnej, zapewniła dopasowanie uzyskanych danych do wybranego modelu. Krzywe kalibracyjne wygenerowano dla każdego badanego związku w próbce celem określenia zakresu liniowości metody analitycznej (Rysunki 31 – 38). Stężenia standardów kalibracyjnych oraz zakres kalibracyjny ustalano dla każdej matrycy na podstawie oczekiwanych stężeń badanych analitów w próbkach. Pomiary wykonano w trzech powtórzeniach w ciągu trzech kolejnych dni roboczych. Uzyskane wartości były powtarzalne, co sugeruje, że metoda zapewnia spójne wyniki niezależnie od dnia analizy. Zakresy stężeń, w którym uzyskiwane wyniki pomiarów były wprost proporcjonalne do stężeń analizowanych substancji przedstawiono w Tabeli 5. Wszystkie uzyskane wartości R^2 dla analizowanych białek były większe niż 0,99, co świadczy o bardzo dobrym dopasowaniu krzywych kalibracyjnych do zastosowanego modelu regresji, a tym samym silnej i przewidywalnej zależności pomiędzy stężeniem analitu a odpowiedzią detektora. Wysokie wartości uzyskanych współczynników R^2 są również dowodem na liniowość odpowiedzi detektora, po zlogarytmowaniu uzyskanych wartości, w szerokim zakresie stężeń analitów, co jest kluczowe dla uzyskania rzetelnych wyników w różnych zastosowaniach analitycznych. Ważnym aspektem walidacji było sprawdzenie dokładności obliczonych wstecz stężeń standardów kalibracyjnych. Przyjęte kryteria dopuszczały maksymalne odchylenie wynoszące $\pm 20\%$ dla LOQ oraz $\pm 15\%$ dla

pozostałych poziomów stężeń. Zgodnie z wymaganiami, co najmniej 75% standardów kalibracyjnych musiało spełniać te kryteria, co zapewniało akceptowalną precyzję i dokładność oznaczeń w badanym zakresie stężeń. Uzyskane wyniki potwierdziły, że dla każdego oznaczanego analitu opracowana metoda spełniała te wymagania, co wskazuje na jej wysoką powtarzalność i wiarygodność wykonywanych z jej zastosowaniem oznaczeń.

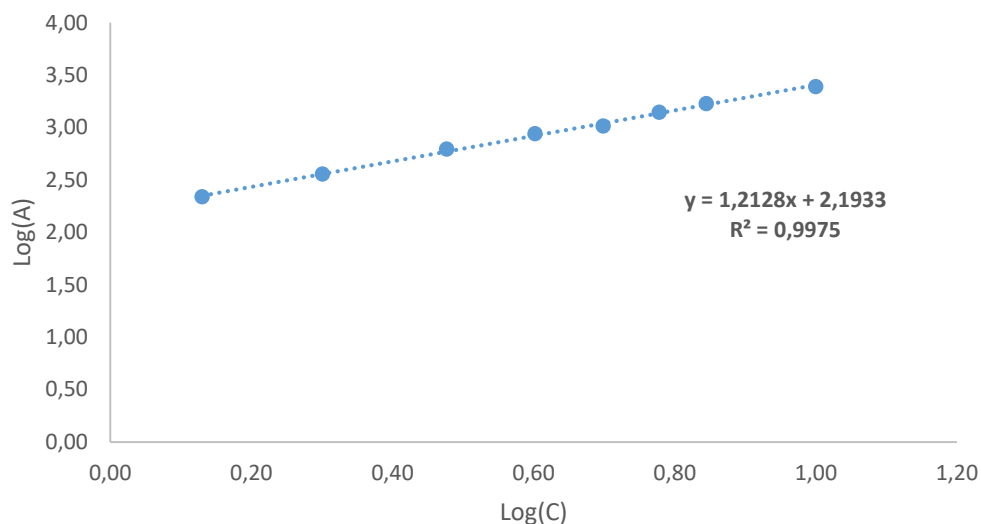


Rysunek 31. Krzywa kalibracyjna dla HSA w próbce krwi przedstawiająca zależność logarytmu dziesiętnego powierzchni piku w funkcji logarytmu dziesiętnego stężenia standardu kalibracyjnego; punkty na wykresie odpowiadają średnim wartościom logarytmowanych sygnałów uzyskanych z trzech powtórzeń ($n = 3$); warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4.1

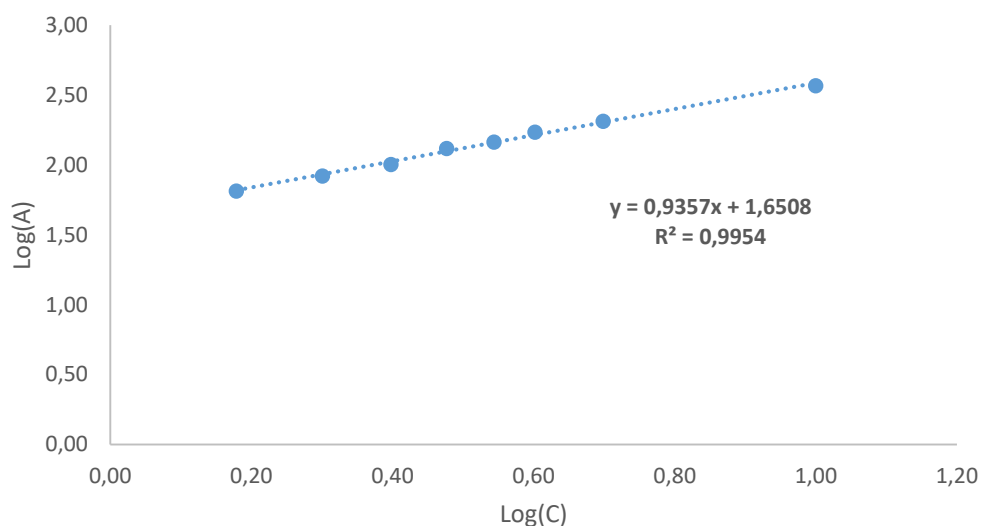


Rysunek 32. Krzywa kalibracyjna dla Hgb w próbce krwi przedstawiająca zależność logarytmu dziesiętnego powierzchni piku w funkcji logarytmu dziesiętnego stężenia

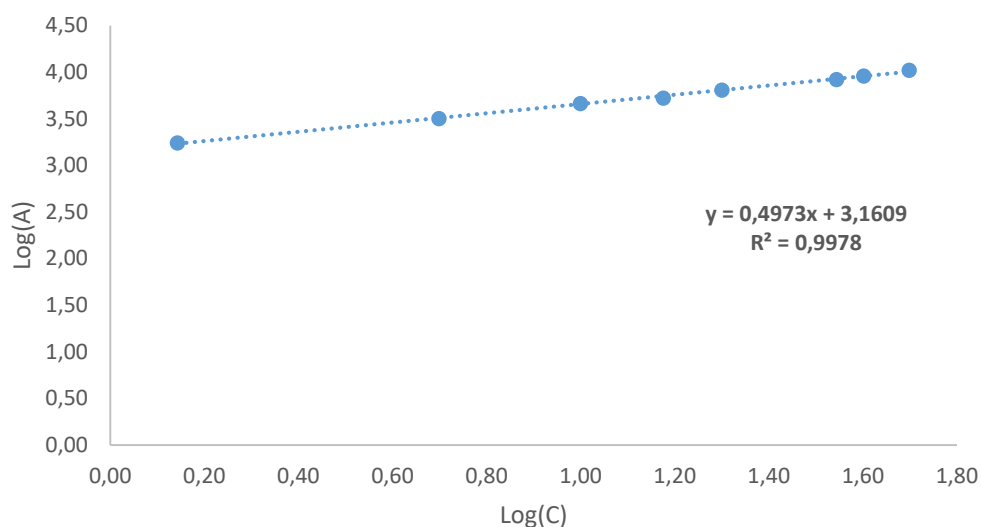
standardu kalibracyjnego; punkty na wykresie odpowiadają średnim wartościom logarytmowanych sygnałów uzyskanych z trzech powtórzeń ($n = 3$); warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4.1



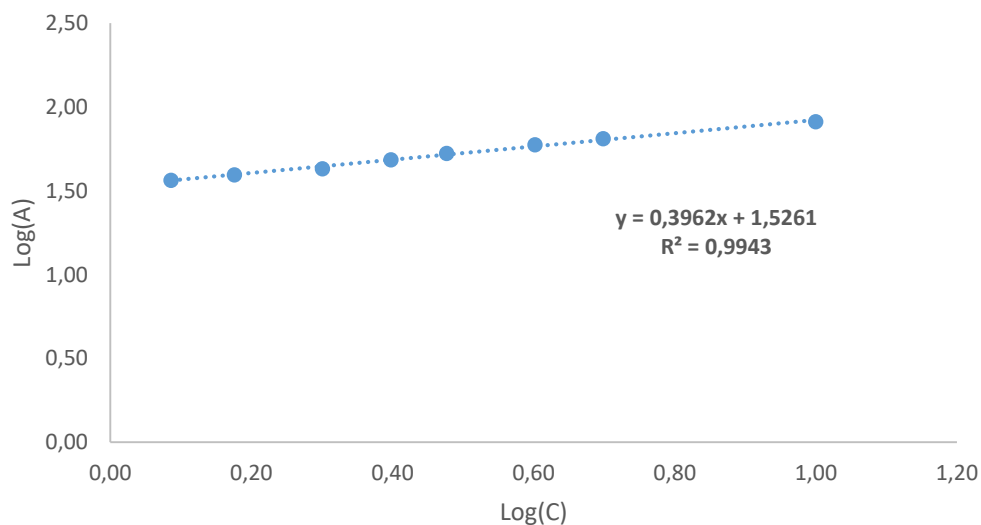
Rysunek 33. Krzywa kalibracyjna dla Ins w próbce osocza przedstawiająca zależność logarytmu dziesiętnego powierzchni piku w funkcji logarytmu dziesiętnego stężenia standardu kalibracyjnego; punkty na wykresie odpowiadają średnim wartościom logarytmowanych sygnałów uzyskanych z trzech powtórzeń ($n = 3$); warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4.2



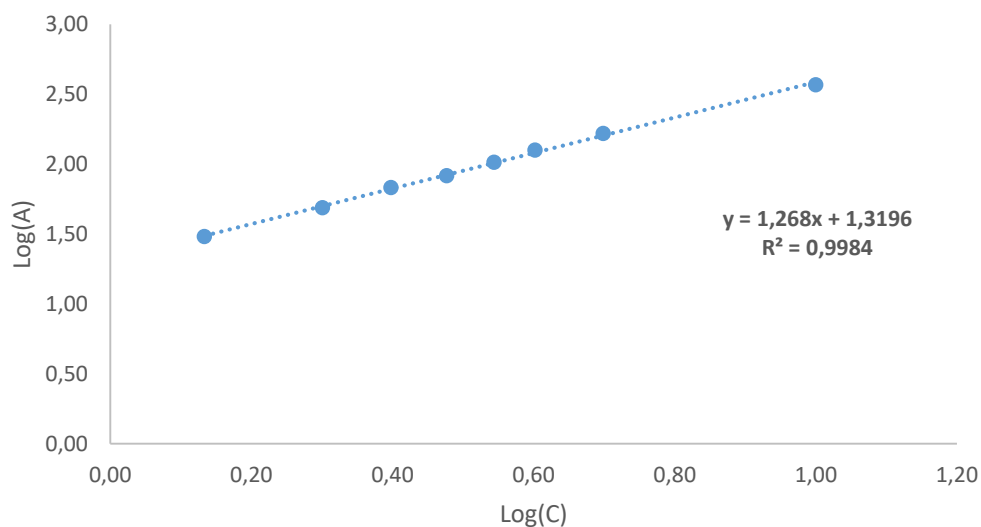
Rysunek 34. Krzywa kalibracyjna dla Tf w próbce osocza przedstawiająca zależność logarytmu dziesiętnego powierzchni piku w funkcji logarytmu dziesiętnego stężenia standardu kalibracyjnego; punkty na wykresie odpowiadają średnim wartościom logarytmowanych sygnałów uzyskanych z trzech powtórzeń ($n = 3$); warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4.2



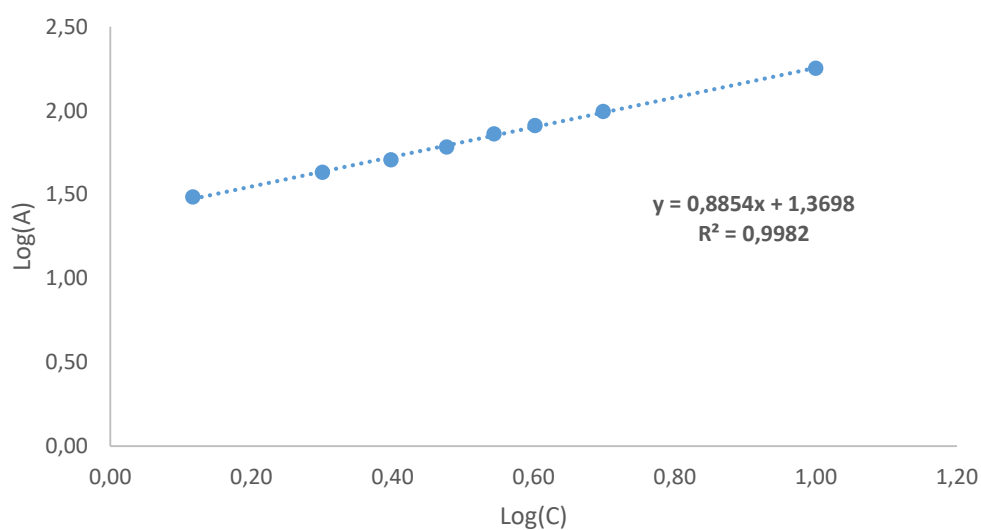
Rysunek 35. Krzywa kalibracyjna dla HSA w próbce osocza przedstawiająca zależność logarytmu dziesiętnego powierzchni pików w funkcji logarytmu dziesiętnego stężenia standardu kalibracyjnego; punkty na wykresie odpowiadają średnim wartościom logarytmowanych sygnałów uzyskanych z trzech powtórzeń ($n = 3$); warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4.2



Rysunek 36. Krzywa kalibracyjna dla Fg w próbce osocza przedstawiająca zależność logarytmu dziesiętnego powierzchni pików w funkcji logarytmu dziesiętnego stężenia standardu kalibracyjnego; punkty na wykresie odpowiadają średnim wartościom logarytmowanych sygnałów uzyskanych z trzech powtórzeń ($n = 3$); warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4.2



Rysunek 37. Krzywa kalibracyjna dla Mb w próbce osocza przedstawiająca zależność logarytmu dziesiętnego powierzchni pików w funkcji logarytmu dziesiętnego stężenia standardu kalibracyjnego; punkty na wykresie odpowiadają średnim wartościom logarytmowanych sygnałów uzyskanych z trzech powtórzeń ($n = 3$); warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4.2



Rysunek 38. Krzywa kalibracyjna dla Hgb w próbce osocza przedstawiająca zależność logarytmu dziesiętnego powierzchni pików w funkcji logarytmu dziesiętnego stężenia standardu kalibracyjnego; punkty na wykresie odpowiadają średnim wartościom logarytmowanych sygnałów uzyskanych z trzech powtórzeń ($n = 3$); warunki chromatograficzne opisano w podrozdziale 4.1.4.2

4.2.3.3 Granice wykrywalności i oznaczalności

LOD oraz LOQ to kluczowe parametry określające najmniejsze stężenia analitów, które można odpowiednio wykryć i precyzyjnie oznaczyć z akceptowalną dokładnością. W celu wyznaczenia LOD i LOQ dla każdego z analizowanych białek, sporządzono

krzywe kalibracyjne, wykorzystując próbki osocza lub krwi wzbogacone roztworami wzorcowymi białek na siedmiu (osocze) lub ośmiu (krew) poziomach stężeń. Próbki przygotowano w trzech powtórzeniach zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.1.6.4. Uzyskane wartości LOD i LOQ dla badanych analitów przedstawiono w Tabeli 5. W porównaniu do innych metod oznaczania objętych niniejszym badaniem białek w matrycach biologicznych opartych o technikę HPLC, uzyskane wartości LOD i LOQ są gorsze. W literaturze dostępne są dane na temat LOD i LOQ dla HSA oznaczanej w próbkach osocza metodą SEC-ICP-MS, które wynoszą odpowiednio 0,23 mg/l oraz 9,79 mg/l ^[217]. W pracy Borowczyk i in. ^[157] wartości LOD i LOQ dla HSA przyjmowały wartości 0,15 $\mu\text{mol/l}$ i 0,5 $\mu\text{mol/l}$, co w przeliczeniu wynosi odpowiednio 0,009975 mg/ml oraz 0,033 mg/ml. Z kolei dla Tf zastosowanie chromatografii powinowactwa pozwoliło osiągnąć LOD wynoszące 3 $\mu\text{g/ml}$ ^[218]. Grebe i in. ^[219] opracowali metodę oznaczania Tf w próbkach krwi fok pospolitych przy użyciu HPLC-ICP-MS. W podanych warunkach instrumentalnych obliczono LOD dla żelaza wynoszącą 170 pg i LOQ wynoszącą 440 pg, co odpowiada odpowiednio około 123 μg i 320 μg Tf. Podobne porównania można odnieść do innych białek analizowanych w niniejszej pracy. Dla Ins oznaczanej w osoczu szczurów metoda HPLC-UV wykazała LOD i LOQ na poziomie 0,35 $\mu\text{g/ml}$ i 0,7 $\mu\text{g/ml}$ ^[220], podczas gdy Yilmaz i in. ^[221] osiągnęli wartości wynoszące odpowiednio 0,10 $\mu\text{g/ml}$ i 0,15 $\mu\text{g/ml}$. Najjar i in. opracowali metodę oznaczania Ins i produktów jej degradacji za pomocą RP-HPLC-UV, gdzie LOD i LOQ wyniosły 2,93 $\mu\text{g/ml}$ i 9,78 $\mu\text{g/ml}$ ^[222]. Należy mieć jednak na uwadze, że większość opisanych metod HPLC-UV została zwalidowana wyłącznie przy użyciu wzorców Ins, a nie rzeczywistych próbek biologicznych. W przypadku Fg, metoda alternatywna, taka jak opracowana przez Xie i in. ^[223], polegająca na oznaczeniu fibrynogenu wieprzowego w osoczu szczura i psa po dootrzewnowym wstrzyknięciu fibrynowego kleju pochodzącego od świni metodą znakowania izotiocyjanianem fluoresceiny w połączeniu z SEC-HPLC-FLD, osiągnęła granicę oznaczalności równą 0,51 $\mu\text{g/ml}$ w przypadku osocza szczura oraz 0,49 $\mu\text{g/ml}$ w przypadku osocza psa. W pracy tej nie podano jednak danych na temat granic wykrywalności. W przypadku Mb, metoda alternatywna oparta na technice HPLC-UV ^[224] pozwoliła uzyskać wartości LOD i LOQ wynoszące 0,4 ppm i 1,0 ppm, co w przeliczeniu daje wartości równe 0,0004 oraz 0,001 mg/ml. W badaniu przeprowadzonym przez Pan i in. ^[225], polegającym na oznaczeniu Tf oraz Hgb w próbce krwi pełnej za pomocą wysokosprawnej chromatografii

cieczowej z rozcieńczaniem izotopów i spektrometrią masową z plazmą sprzężoną indukcyjnie, wartości LOD wyniosły: 0,01 mg/ml dla HSA oraz 0,024 mg/ml dla Tf. Na podstawie przeprowadzonej analizy można stwierdzić, że opracowana metoda charakteryzuje się słabszymi wartościami LOD i LOQ w porównaniu do innych technik oznaczania białek w próbkach biologicznych. Niemniej jednak, należy zaznaczyć, że w żadnej z opublikowanych metod procedura nie zakładała jednoczesnego oznaczenia tak wielu analitów podczas jednej analizy jak zaproponowano w niniejszej pracy, wobec czego można uznać ją za bardziej wszechstronną i efektywniejszą w kontekście kompleksowej charakterystyki białek endogennych w płynach ustrojowych. Ponadto jej zastosowanie może przyczynić się do zwiększenia wydajności i przepustowości analiz oraz ograniczenia czasu i kosztów związanych z wielokrotnym wykonywaniem oddzielnych oznaczeń dla poszczególnych białek.

Tabela 5. Dane walidacyjne dla metody oznaczania wybranych białek w płynach ustrojowych człowieka techniką HPLC-ELSD

Analit	Równanie regresji	R ²	Zakres liniowości (mg/ml)	RSD (%)		Odzysk (%)		LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
				Min.	Max.	Min.	Max.		
Krew									
Albumina	y = 0,4637x + 2,4458	0,9930	1,63 – 40,00	1,27	8,89	87,25	114,32	1,17	1,63
Hemoglobina	y = 0,2397x + 1,9479	0,9977	1,31 – 150,00	3,64	10,57	89,99	110,02	1,09	1,31
Osocze									
Insulina	y = 1,2128x + 2,1933	0,9975	1,35 – 10,00	0,89	4,04	95,00	104,26	1,10	1,35
Transferyna	y = 0,9357x + 1,6508	0,9954	1,51 – 10,00	0,24	3,68	90,94	102,67	1,15	1,51
Albumina	y = 0,4973x + 3,1609	0,9978	1,39 – 50,00	0,48	7,30	88,92	107,75	1,12	1,39
Fibrynogen	y = 0,3962x + 1,5261	0,9943	1,22 – 10,00	1,28	8,61	85,71	102,96	1,07	1,22
Mioglobina	y = 1,268x + 1,3196	0,9984	1,36 – 10,00	0,21	3,71	96,66	103,48	1,11	1,36
Hemoglobina	y = 0,8854x + 1,3698	0,9982	1,31 – 10,00	1,01	3,54	90,06	98,58	1,09	1,31

4.2.3.4 Precyzja i dokładność metody

Ocenę jakości opracowanej metody określono poprzez precyzję i dokładność wewnątrzseryjną oraz międzyseryjną, wykorzystując QCs przygotowane na czterech poziomach stężeń w zakresie krzywej kalibracyjnej. Z uwagi na fakt, że oznaczane białka są związkami endogennymi, stężenia analitów zostały określone także w próbkach ślepych, a następnie odjęte od całkowitych stężeń zaobserwowanych w próbkach wzbogaconych. Dla każdego stężenia analizy chromatograficzne powtarzano pięciokrotnie w ciągu tego samego dnia w celu oceny precyzji i dokładności wewnątrzseryjnej oraz przez kolejne trzy dni w celu określenia precyzji i dokładności międzyseryjnej. Wszystkie stężenia analizowano przy użyciu krzywych kalibracyjnych przygotowanych na dany dzień. Precyzję wyrażono jako %RSD, natomiast dokładność jako procent odzysku analitu. Otrzymane wyniki analityczne spełniały kryteria akceptacji ^[174] i wskazują, że zaproponowane protokoły są dokładne i charakteryzują się dobrą precyzją. W przypadku próbek krwi, dokładność metody w odniesieniu do HSA wynosiła od 84,11 do 99,35% dla pomiarów wykonanych w obrębie jednej serii analitycznej oraz od 81,69 do 101,25% dla pomiarów międzyseryjnych. Precyzja wewnątrzseryjna wahała się od 2,91 do 9,54%, natomiast międzyseryjna od 4,18 do 7,96%. W odniesieniu do Hgb dokładność wynosiła od 82,14 do 104,55% oraz od 83,77 do 102,22%, odpowiednio dla pomiarów wewnątrz- i międzyseryjnych. Precyzja wahała się od 1,19 do 6,81% dla pomiarów wewnątrzseryjnych oraz od 2,71 do 7,01% dla pomiarów międzyseryjnych. W przypadku próbek osocza, wartości precyzji wewnątrzseryjnej dla wszystkich analitów wahały się od 0,68% do 11,22%, natomiast dla precyzji międzyseryjnej od 0,33% do 10,84%, spełniając tym samym kryterium $\leq 15\%$, a dla LOQ $\leq 20\%$. Dokładność wewnątrzseryjna wahała się od 85,89% do 104,40% oraz od 82,57% do 108,24% w przypadku dokładności międzyseryjnej, mieszcząc się w zakresie akceptowalnym $\pm 15\%$, a dla LOQ $\pm 20\%$. Szczegółowe dane dotyczące precyzji i dokładności przedstawiono w Tabeli 6. W porównaniu do innych metod oznaczania białek w płynach biologicznych ^[217–226], metoda wykazała porównywalną precyzję i dokładność. Zastosowanie detekcji ELSD pozwoliło na uzyskanie stabilnych i powtarzalnych sygnałów analitycznych, co stanowi istotną zaletę opracowanej metody. Uzyskane wyniki podkreślają potencjał metody do zastosowań w analizie klinicznej, w szczególności w równoległym monitorowaniu stężeń wybranych białek endogennych w różnych stanach patofizjologicznych.

4.2.3.5 Odporność metody

W niniejszej pracy odporność metody oceniono poprzez analizę wpływu celowych zmian wybranych parametrów chromatograficznych na czas retencji, powierzchnię pików oraz rozdzielczość. Przeprowadzone testy obejmowały modyfikacje prędkości przepływu fazy ruchomej ($1,0 \pm 0,1$ ml/min), stężenia TFA w fazie wodnej i organicznej ($0,1\% \pm 0,01\%$) oraz temperatury separacji ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Wszystkie analizy przeprowadzono z wykorzystaniem wzbogaconych próbek osocza oraz krwi, przy stężeniu egzogennym każdego z białek wynoszącym w przeliczeniu na 1 ml krwi lub osocza 5,0 mg/ml, z wyjątkiem HSA, dla której stężenie w osoczu wynosiło 25,0 mg/ml. Wszystkie próbki analizowano w trzech powtórzeniach.

W przypadku zmian prędkości przepływu fazy ruchomej wartości parametrów chromatograficznych przedstawionych w kolejności czas retencji, powierzchnia pików oraz rozdzielczość pomiędzy sąsiadującymi pikami dla oznaczanych analitów w próbkach krwi wynosiły odpowiednio: $4,43 \pm 0,08$ min (%RSD = 1,81), $586,6 \pm 10,10$ mV · s (%RSD = 1,72), $8,01 \pm 0,12$ (%RSD = 1,50) dla HSA oraz $6,69 \pm 0,16$ min (%RSD = 1,94), $129,6 \pm 2,60$ mV · s (%RSD = 2,00), $1,73 \pm 0,03$ (%RSD = 1,73) dla Hgb. Dla próbek osocza oceniane parametry wyglądały następująco: $5,61 \pm 0,10$ min (%RSD = 1,78), $1025,2 \pm 20,20$ mV · s (%RSD = 1,97), $11,06 \pm 0,15$ (%RSD = 1,45) dla Ins, $7,19 \pm 0,11$ min (%RSD = 1,53), $203,6 \pm 4,08$ mV · s (%RSD = 2,00), $4,28 \pm 0,05$ (%RSD = 1,17) dla Tf, $7,90 \pm 0,15$ min (%RSD = 1,90), $7248,9 \pm 148,1$ mV · s (%RSD = 2,04), $1,56 \pm 0,02$ (%RSD = 1,28) dla HSA, $8,93 \pm 0,09$ min (%RSD = 1,01), $64,62 \pm 1,25$ mV · s (%RSD = 1,93), $1,84 \pm 0,03$ (%RSD = 1,63) dla Fg, $10,19 \pm 0,14$ min (%RSD = 1,37), $166,8 \pm 3,1$ mV · s (%RSD = 1,86), $3,60 \pm 0,06$ (%RSD = 1,67) dla Mb oraz $11,92 \pm 0,10$ min (%RSD = 0,84), $100,5 \pm 1,1$ mV · s (%RSD = 1,09), $5,68 \pm 0,07$ (%RSD = 1,23) dla Hgb.

Tabela 6. Wyznaczone wartości precyzji i dokładności wewnątrzseryjnej ($n = 5$) oraz międzyseryjnej ($n = 3$) dla analitów oznaczanych opracowaną metodą HPLC-ELSD we krwi oraz osoczu

Analit	Stężenie (mg/ml)	Precyzja (%)		Dokładność (%)	
		Wewnątrz serii	Pomiędzy seriami	Wewnątrz serii	Pomiędzy seriami
Krew					
HSA	1,63	2,91	4,18	84,11	81,69
	4,86	5,47	5,82	97,33	101,25
	16,0	9,54	7,96	97,70	95,63
	32,0	6,93	5,55	99,35	89,24
Hgb	1,31	6,81	7,01	82,14	83,77
	3,93	3,93	4,12	90,08	100,52
	60,0	1,19	2,71	95,05	94,61
	120,0	4,10	4,56	104,55	102,22
Osocze					
Ins	1,35	9,43	3,04	99,02	100,56
	4,05	7,38	1,04	101,17	97,98
	5,0	7,57	1,06	101,54	100,76
	8,0	5,11	2,33	97,78	100,70
Tf	1,51	6,62	2,94	86,80	85,47
	4,53	1,53	0,33	89,55	88,54
	5,0	3,92	5,11	93,42	96,22
	8,0	5,26	3,55	102,13	100,27
HSA	1,39	11,22	10,84	89,88	97,72
	4,17	5,90	3,92	101,08	98,78
	25,0	10,10	5,13	95,14	90,97
	40,0	8,78	6,28	102,78	108,24
Fg	1,22	4,90	6,64	85,89	82,57
	3,66	1,28	2,16	95,14	94,01
	5,0	0,76	2,47	95,06	93,77
	8,0	0,68	5,12	98,88	98,70
Mb	1,36	1,85	3,88	101,98	100,14
	4,08	0,91	0,83	97,37	101,23
	5,0	0,95	1,52	96,42	97,65
	8,0	1,15	2,10	104,40	101,00
Hgb	1,31	5,09	9,18	91,65	90,81
	3,93	1,52	2,24	92,53	89,49
	5,0	2,28	6,72	93,12	98,23
	8,0	1,12	5,05	103,74	101,40

Po wprowadzeniu niewielkich zmian w temperaturze kolumny wartości czasów retencji, powierzchni pików i rozdzielczości wynosiły odpowiednio: $4,48 \pm 0,03$ min (%RSD = 0,67), $581,2 \pm 9,91$ mV · s (%RSD = 1,70), $8,09 \pm 0,13$ (%RSD = 1,61) dla HSA oraz $6,71 \pm 0,06$ min (%RSD = 0,89), $131,2 \pm 2,08$ mV · s (%RSD = 1,59), $1,78 \pm 0,02$ (%RSD = 1,12) dla Hgb w przypadku próbek krwi. Gdy matrycą było osocze, oceniane parametry przyjęły wartości: $5,59 \pm 0,07$ min (%RSD = 1,25), $1027,6 \pm 16,7$ mV · s (%RSD = 1,63), $11,09 \pm 0,18$ (%RSD = 1,62) dla Ins, $7,22 \pm 0,14$ min (%RSD = 1,94), $206,2 \pm 3,07$ mV · s (%RSD = 1,49), $4,30 \pm 0,09$ (%RSD = 2,09) dla Tf, $7,95 \pm 0,15$ min (%RSD = 1,89), $7250,4 \pm 106,8$ mV · s (%RSD = 1,47), $1,59 \pm 0,03$ (%RSD = 1,89) dla HSA, $8,94 \pm 0,08$ min (%RSD = 0,89), $65,9 \pm 1,01$ mV · s (%RSD = 1,53), $1,81 \pm 0,02$ (%RSD = 1,10) dla Fg, $10,20 \pm 0,13$ min (%RSD = 1,27), $169,8 \pm 2,52$ mV · s (%RSD = 1,48), $3,58 \pm 0,07$ (%RSD = 1,96) dla Mb i $11,94 \pm 0,14$ min (%RSD = 1,17), $102,3 \pm 1,5$ mV · s (%RSD = 1,47), $5,71 \pm 0,11$ (%RSD = 1,93) dla Hgb.

Gdy początkowe stężenie TFA w fazie wodnej zostało zmienione o $\pm 0,01\%$, wartości czasów retencji, powierzchni pików i rozdzielczości dla próbek krwi wynosiły odpowiednio: $4,48 \pm 0,08$ min (%RSD = 1,79), $590,2 \pm 7,1$ mV · s (%RSD = 1,20), $7,96 \pm 0,13$ (%RSD = 1,63) dla HSA oraz $6,79 \pm 0,11$ min (%RSD = 1,62), $132,8 \pm 1,4$ mV · s (%RSD = 1,05), $1,76 \pm 0,03$ (%RSD = 1,70) dla Hgb. W przypadku osocza parametry te wynosiły: $5,52 \pm 0,09$ min (%RSD = 1,63), $1034,7 \pm 13,9$ mV · s (%RSD = 1,34), $11,13 \pm 0,08$ (%RSD = 0,72) dla Ins, $7,26 \pm 0,15$ min (%RSD = 2,07), $210,4 \pm 3,09$ mV · s (%RSD = 1,47), $4,38 \pm 0,08$ (%RSD = 1,83) dla Tf, $7,98 \pm 0,13$ min (%RSD = 1,63), $7248,6 \pm 119,2$ mV · s (%RSD = 1,64), $1,56 \pm 0,03$ (%RSD = 1,92) dla HSA, $8,93 \pm 0,17$ min (%RSD = 1,90), $68,5 \pm 0,95$ mV · s (%RSD = 1,39), $1,84 \pm 0,03$ (%RSD = 1,63) dla Fg, $10,22 \pm 0,16$ min (%RSD = 1,57), $163,2 \pm 3,05$ mV · s (%RSD = 1,87), $3,61 \pm 0,04$ (%RSD = 1,11) dla Mb i $11,92 \pm 0,08$ min (%RSD = 0,67), $98,6 \pm 1,8$ mV · s (%RSD = 1,83), $5,74 \pm 0,12$ (%RSD = 2,09) dla Hgb.

Taka sama zmiana stężenia TFA w fazie organicznej powodowała następujące zmiany w czasach retencji, powierzchni pików i rozdzielczości: $4,46 \pm 0,05$ min (%RSD = 1,12), $588,3 \pm 6,1$ mV · s (%RSD = 1,04), $8,05 \pm 0,14$ (%RSD = 1,74) dla HSA oraz $6,72 \pm 0,14$ min (%RSD = 2,08), $128,9 \pm 2,1$ mV · s (%RSD = 1,63), $1,70 \pm 0,02$ (%RSD = 1,17) dla Hgb, gdy matrycą była krew. W przypadku próbek osocza zmiany parametrów podlegających ocenie prezentowały się następująco: $5,63 \pm 0,11$ min (%RSD = 1,95),

1016,8 ± 16,1 mV · s (%RSD = 1,58), 11,08 ± 0,13 (%RSD = 1,17) dla Ins, 7,21 ± 0,10 min (%RSD = 1,39), 205,2 ± 3,1 mV · s (%RSD = 1,51), 4,30 ± 0,07 (%RSD = 1,63) dla Tf, 7,91 ± 0,14 min (%RSD = 1,77), 7258,1 ± 114,1 mV · s (%RSD = 1,57), 1,54 ± 0,03 (%RSD = 1,95) dla HSA, 8,95 ± 0,16 min (%RSD = 1,79), 65,1 ± 1,3 mV · s (%RSD = 2,00), 1,85 ± 0,02 (%RSD = 1,08) dla Fg, 10,21 ± 0,15 min (%RSD = 1,47), 170,0 ± 3,4 mV · s (%RSD = 2,00), 3,62 ± 0,07 (%RSD = 1,93) dla Mb i 11,91 ± 0,15 min (%RSD = 1,26), 100,6 ± 2,1 mV · s (%RSD = 2,09), 5,70 ± 0,06 (%RSD = 1,05) dla Hgb.

W przypadku zmian prędkości przepływu fazy ruchomej odnotowano nieznaczne przesunięcia czasów retencji, jednakże nie miały one istotnego wpływu na jakość rozdzielenia chromatograficznego. Podobnie, modyfikacja stężenia TFA w fazie ruchomej nie wpłynęła znacząco na powierzchnię pików ani rozdzielczość. Zmiany temperatury kolumny również nie prowadziły do istotnych różnic w rozdzielczości i powtarzalności sygnału analitycznego. Wyniki wykazały, że celowo wprowadzone zmiany parametrów chromatograficznych nie miały istotnego wpływu na oceniane wskaźniki analityczne. Średnie wartości czasów retencji, powierzchni pików oraz rozdzielczości mieściły się w akceptowalnych granicach, a odchylenia standardowe dla każdego z analizowanych parametrów były niewielkie. Wartości %RSD < 2 wskazują, że metoda jest odporna.

4.2.3.6 Przeniesienie próbek

Ocena przeniesienia próbki została przeprowadzona poprzez analizę próbek matrycy zastępczej zawierających PBS o pH 7,4, umieszczonych bezpośrednio po próbkach standardów kalibracyjnych o najwyższym stężeniu, tj. ULOQ. Próbkę tę były analizowane trzykrotnie w celu uzyskania reprezentatywnych wyników. Wartości przeniesienia próbki dla poszczególnych białek w analizowanych matrycach przedstawiono w Tabeli 7.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że poziom zanieczyszczenia próbki poddawanej analizie białkami pochodzącymi z poprzednio analizowanych próbek o wysokim stężeniu analitów, został skutecznie zredukowany poprzez zastosowanie elucji gradientowej. Wartości przeniesienia próbki dla wszystkich badanych analitów w obu matrycach biologicznych przyjmowały wartości < 20%, co świadczy o odpowiedniej wydajności procedury płukania pętli automatycznego podajnika próbek oraz minimalizacji ryzyka kontaminacji. Pomimo zaobserwowania niewielkich wartości

przeniesienia próbki, uzyskane wyniki są zgodne z wymaganiami stawianymi dla metod bioanalitycznych i nie wpływają negatywnie na dokładność i precyzję oznaczeń.

Tabela 7. Wartości przeniesienia próbki dla metody oznaczania wybranych białek w płynach ustrojowych człowieka techniką HPLC-ELSD ($n = 3$)

Matryca	Analit	Sygnał analitu w PBS (mV · s)	Sygnał analitu na poziomie LOQ (mV · s)	Przeniesienie próbki (%)
Krew	HSA	33,7	421,2	8,0
Krew	Hgb	6,7	95,8	7,0
Osocze	Ins	19,7	217,8	9,0
Osocze	Tf	3,3	65,1	5,1
Osocze	HSA	278,7	1741,9	16,0
Osocze	Fg	2,8	36,5	7,6
Osocze	Mb	3,2	30,4	10,5
Osocze	Hgb	2,4	30,5	7,9

4.2.3.7 Wpływ matrycy

Ocena efektu matrycy została przeprowadzona w oparciu o analizę QC's na dwóch poziomach stężeń (niskim oraz wysokim) w próbkach osocza oraz krwi pełnej pochodzących od sześciu różnych dawców, a także w próbkach hemolizowanych i lipemicznych. Każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach zgodnie z opracowanymi protokołami chromatograficznymi. Uzyskane wartości %RSD oraz % odzysku dla poszczególnych analitów i matryc przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Wartości precyzji i dokładności dla badanych białek analizowanych na dwóch poziomach stężeń w próbkach pochodzących od sześciu różnych dawców wyznaczone podczas analizy wpływu matrycy

Analit	Poziom QC	RSD (%)	Odzysk (%)
Krew			
HSA	Niski	7,9	96,0
	Wysoki	7,1	101,8
Hgb	Niski	6,4	97,5
	Wysoki	5,7	103,0
Osocze			
Ins	Niski	6,2	98,5

Tf	Wysoki	5,4	102,1
	Niski	7,1	96,8
	Wysoki	6,3	101,2
HSA	Niski	8,5	94,3
	Wysoki	7,2	103,4
Fg	Niski	6,7	97,6
	Wysoki	5,9	99,8
Mb	Niski	7,4	95,2
	Wysoki	6,8	100,5
Hgb	Niski	5,8	98,0
	Wysoki	6,0	102,7

Analiza efektu matrycowego wykazała, że opracowana metoda HPLC-ELSD zapewnia wysoką precyzję i dokładność oznaczeń w różnych matrycach biologicznych (krew, osocze). Wszystkie uzyskane wartości precyzji i dokładności spełniały przyjęte kryteria akceptacji ^[174], tj. wartości RSD były poniżej 15%, a odzysk mieścił się w przedziale 85 – 115%. Przeprowadzona ocena wskazuje na minimalny wpływ składu matrycy na wyniki oznaczeń endogennych białek stanowiących przedmiot zainteresowania, a także potwierdza powtarzalność oznaczeń i brak znaczących strat analitów podczas procesu obróbki i analizy próbek.

4.2.3.8 Badania stabilności

Badania stabilności przeprowadzono w oparciu o wytyczne ICH ^[174] dotyczące walidacji metod bioanalitycznych, które obejmowały testowanie stabilności krótkoterminowej, długoterminowej, podczas cykli zamrażania i rozmrażania, w automatycznym podajniku próbek oraz stabilności we krwi pełnej bezpośrednio po pobraniu. W celu oceny stabilności krótkoterminowej próbki QCs rozmrażano w temperaturze pokojowej i przechowywano na stole laboratoryjnym przez taki sam czas jak próbki badane. Wyniki badań nie wykazały istotnych zmian w poziomie stężeń analitów, a wszelkie różnice nie przekraczały 10%, co świadczy o stabilności badanych białek w warunkach rutynowej analizy oraz o braku konieczności natychmiastowej obróbki próbek po rozmrożeniu. Testy stabilności długoterminowej prowadzone w temperaturze -80 °C przez 6 miesięcy wykazały nieznaczne zmiany w stężeniach białek, nieprzekraczające 15%, co potwierdza fakt, że pobrane próbki biologiczne mogą

być przechowywane przez długi czas bez ryzyka degradacji analitów. Podczas kolejnego testu, próbki poddano trzem cyklom zamrażania i rozmrażania, przy czym pomiędzy kolejnymi cyklami próbki przechowywano w temperaturze -80°C przez co najmniej 12 godzin. Wyniki wykazały, że odchylenia w poziomach stężeń białek nie przekraczały 13%, co oznacza, że opracowana procedura może być z powodzeniem wykorzystywana w przypadkach, w których próbki wymagają wielokrotnego zamrażania i rozmrażania, a tym samym długotrwałego przechowywania w laboratoriach analitycznych. Stabilność analitów w przetworzonych próbkach przechowywanych w automatycznym podajniku próbek w temperaturze pokojowej przez 20 godzin została oszacowana poprzez porównanie stężeń badanych białek względem wartości początkowych. Odchylenia dla wszystkich analitów nie przekraczały 12%, co wskazuje na stabilność białek w próbkach przygotowanych do analizy w trakcie przechowywania w aparaturze analitycznej. Możliwość pozostawienia próbek w podajniku przez dłuższy czas bez wpływu na wynik analizy chromatograficznej jest niezwykle istotna w wysokoprzepustowych metodach badawczych. Aby ocenić, czy wyniki analityczne odzwierciedlają rzeczywiste stężenia badanych analitów w chwili pobrania próbki, testowi poddano stabilność analizowanych białek we krwi pełnej. Probki analizowano natychmiast po pobraniu materiału biologicznego (czas zerowy), a następnie przechowywano przez 30 minut w temperaturze 4°C , co symulowało warunki ich transportu do laboratorium. Stężenia badanych analitów nie uległy istotnym zmianom (różnice nie przekraczały 10%), co potwierdza, że próbki pobrane do badań pozostają stabilne przez krótki czas przed zamrożeniem i odzwierciedlają rzeczywiste warunki kliniczne. Ponadto brak istotnych zmian w stężeniach po krótkim przechowywaniu w warunkach obniżonej temperatury wskazuje, że wstępne zabezpieczenie próbek i transport przeprowadzono w sposób nie wpływający na ich skład biochemiczny. Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na wysoką stabilność badanych analitów, co pozwala na ich wiarygodne oznaczanie w różnych warunkach laboratoryjnych i klinicznych. Badane białka wykazują odporność na degradację w standardowych procedurach przechowywania i analizy, co jest istotnym czynnikiem dla ich zastosowania zarówno w rutynowej diagnostyce, jak i badaniach naukowych.

4.2.3.9 Test zgodności systemu

W ramach procesu walidacji przeprowadzono test zgodności systemu, który miał na celu potwierdzenie jakości i wiarygodności pomiarów analitycznych poprzez

weryfikację działania zastosowanego układu HPLC zgodnie z określonymi kryteriami, a tym samym sprawdzenie jego zdolności do generowania dokładnych oraz precyzyjnych wyników w czasie. Podczas badań dziesięciokrotnie analizowano QCs o stężeniach wynoszących 80% ULOQ. Ocenie poddano podstawowe parametry charakterystyczne dla procesu chromatograficznego, takie jak N , k' , R_s , T_f oraz t_r . Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SD (%RSD) i porównano z określonymi kryteriami akceptacji. Średnia liczba pól teoretycznych (N) uzyskana dla każdego analitu w próbce krwi wynosiła odpowiednio: 2645 ± 53 (%RSD = 2,00) dla HSA oraz 8179 ± 91 (%RSD = 1,11) dla Hgb. W przypadku matrycy jaką było osocze wartości te prezentują się następująco: 5401 ± 128 (%RSD = 2,37) dla Ins, 3402 ± 84 (%RSD = 2,47) dla Tf, 2043 ± 39 (%RSD = 1,9) dla HSA, 3560 ± 72 (%RSD = 2,02) dla Fg, 18550 ± 346 (%RSD = 1,87) dla Mb oraz 14232 ± 208 (%RSD = 1,46) dla Hgb. W każdym przypadku spełnione zostały kryteria akceptacji $N \geq 2000$, co wskazuje na dobrą separację analitów na zastosowanej kolumnie chromatograficznej. Wartości współczynnika retencji w przypadku próbek krwi wynosiły: $1,67 \pm 0,05$ (%RSD = 2,99) dla HSA oraz $3,02 \pm 0,09$ (%RSD = 2,98) dla Hgb. W przypadku próbek osocza wartości k' dla Ins, Tf, HSA, Fg, Mb oraz Hgb były następujące: $2,29 \pm 0,03$ (%RSD = 1,31), $3,30 \pm 0,08$ (%RSD = 2,42), $3,70 \pm 0,10$ (%RSD = 2,70), $4,28 \pm 0,07$ (%RSD = 1,64), $5,02 \pm 0,08$ (%RSD = 1,59) oraz $6,03 \pm 0,12$ (%RSD = 1,99). Uzyskane wartości k' sugerują, że wszystkie anality są odpowiednio zatrzymywane przez fazę stacjonarną. Zgodnie z kryteriami akceptacji, najwcześniejszy interesujący pik powinien mieć $k' > 1$. W idealnej sytuacji wartości ta powinna wynosić ≥ 2 . Należy jednak zaznaczyć, że bardzo wysokie współczynniki retencji mogą prowadzić do potencjalnego poszerzenia piku, co wpływa na ogólną wydajność chromatograficzną. W praktyce wartość $R_s > 1,50$ jest uznawana za akceptowalną dla większości zastosowań chromatograficznych. W niniejszej pracy wartości rozdzielczości dla białek w próbkach krwi, wyliczone pomiędzy sąsiadującymi sygnałami, wynosiły: $8,03 \pm 0,13$ (%RSD = 1,62) dla HSA oraz $1,77 \pm 0,07$ (%RSD = 3,95) dla Hgb. W przypadku osocza wartości rozdzielczości były następujące: $11,93 \pm 0,12$ (%RSD = 1,01) dla Ins, $4,29 \pm 0,08$ (%RSD = 1,86) dla Tf, $1,51 \pm 0,02$ (%RSD = 1,32) dla HSA, $1,95 \pm 0,05$ (%RSD = 2,56) dla Fg, $3,62 \pm 0,07$ (%RSD = 1,93) dla Mb oraz $5,28 \pm 0,09$ (%RSD = 1,70) dla Hgb. Uzyskane wartości R_s świadczą o dobrym rozdzieleniu sąsiadujących pików, co umożliwia ich dokładne oznaczenie w analizowanych matrycach. Idealnie symetryczny pik („gaussowski”) powinien mieć wartość $T_f = 1,0$, jednak typowe wartości mieszczą się

w zakresie od 0,8 do 1,5. Dla wszystkich analitów oznaczanych w próbkach biologicznych średnia wartość T_f mieściła się w zakresie 0,87 – 1,53 przy %RSD w przedziale 0,99 – 3,12, co świadczy o symetrycznym kształcie pików dla większości białek. Precyzję nastrzyku, wyrażoną jako %RSD (kryterium akceptacji $\leq 1\%$), oceniono na podstawie całkowitych czasów retencji analitów, która w przypadku próbek krwi wynosiła odpowiednio: 0,67% ($t_r = 4,50 \pm 0,03$ min) dla HSA oraz 0,74% ($t_r = 6,78 \pm 0,05$ min) dla Hgb. W przypadku próbek osocza wartości te były następujące: 0,36% ($t_r = 5,57 \pm 0,02$ min) dla Ins, 0,41% ($t_r = 7,29 \pm 0,03$ min) dla Tf, 0,25% ($t_r = 7,97 \pm 0,02$ min) dla HSA, 0,22% ($t_r = 8,95 \pm 0,02$ min) dla Fg, 0,39% ($t_r = 10,21 \pm 0,04$ min) dla Mb oraz 0,25% ($t_r = 11,93 \pm 0,03$ min) dla Hgb. Uzyskane wyniki wskazują na powtarzalność i dokładność procesu wprowadzania próbki do układu HPLC. Podsumowując, wszystkie parametry testu zgodności systemu mieściły się w określonych kryteriach akceptacji, co świadczy o jego prawidłowym działaniu i dostarczaniu spójnych oraz wiarygodnych wyników analitycznych.

4.2.4 Zieloność metody

Podczas opracowywania metod analitycznych niezwykle istotne jest stosowanie praktyk minimalizujących ich ślad ekologiczny ^[195,196]. Zastosowanie zasad zielonej chemii analitycznej przynosi liczne korzyści zarówno dla środowiska, jak i dla efektywności pracy laboratoryjnej. Ograniczenie stosowania toksycznych lub niebezpiecznych substancji chemicznych, zmniejszenie zużycia rozpuszczalników oraz efektywne wykorzystanie surowców prowadzą do mniejszej emisji zanieczyszczeń i redukcji ilości generowanych odpadów. Minimalizacja zużycia odczynników oraz zmniejszenie liczby etapów przygotowania próbek do analizy wiążą się również z obniżeniem zużycia wody i energii. Optymalizacja procesów zgodnie z zasadami zielonej chemii analitycznej przekłada się także na zmniejszenie ryzyka zdrowotnego dla personelu laboratoryjnego. Wprowadzenie ekologicznych metod analitycznych sprzyja poszukiwaniu przez naukowców nowych rozwiązań i technologii przyjaznych środowisku. W niniejszej pracy ocenę ekologiczności opracowanej procedury analitycznej przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch narzędzi metrycznych: AGREEprep ^[195] oraz AGREE – Analytical GREENness Calculator ^[196]. Każde z nich służy do kompleksowej analizy zastosowanych metodologii pod kątem zgodności z zasadami zielonej chemii analitycznej, jednak różnią się one zakresem oceny. AGREEprep służy do oceny ekologiczności etapu przygotowania próbki poprzez analizę

10 zasad ekologicznego przygotowania próbki, natomiast AGREE ocenia całą metodę chromatograficzną na podstawie 12 zasad zielonej chemii analitycznej. Oba narzędzia przeliczają wyniki w skali 0 – 1, co umożliwia obiektywne porównanie i wizualizację wpływu poszczególnych parametrów na ekologiczność metody. Zastosowanie tych narzędzi pozwala na przejrzystą interpretację wyników oraz identyfikację obszarów wymagających optymalizacji. Uzyskane piktogramy nie tylko przedstawiają końcowe wyniki przeprowadzonych ocen, ale także szczegółowo ilustrują efektywność opracowanych procedur dla każdego kryterium oraz wagi przypisane przez użytkownika. W niniejszej analizie zdecydowano się na zastosowanie domyślnych wag dla wszystkich ocenianych zasad, zgodnie z sugestią twórców narzędzi.

W przypadku oceny zieloności protokołu przygotowania próbki do analizy pierwszym ocenianym kryterium było miejsce, w którym proces ten się odbywał. Promowane było przygotowanie próbki *in situ*, które minimalizuje straty czasu oraz zużycie materiałów i energii, jak również pozwala uniknąć degradacji próbki wynikającej z nieodpowiedniego przechowywania w trakcie transportu. W kryterium tym otrzymano zero punktów ze względu na to, że próbki osocza oraz krwi procedowane były w laboratorium, po wcześniejszym pobraniu i przetransportowaniu próbek (sposób przygotowania próbki: *ex situ*). Drugie kryterium zielonego przygotowania próbek zakłada stosowanie bezpieczniejszych rozpuszczalników i odczynników, które charakteryzują się lepszymi właściwościami fizykochemicznymi oraz niską lub zerową toksycznością dla ludzi i środowiska. Zasada ta obejmuje także minimalizację stosowania niebezpiecznych reagentów, takich jak kwasy i zasady wykorzystywane na przykład w reakcjach chemicznej modyfikacji analitów (derywatyzacji). Z uwagi na wykorzystanie wyłącznie wody dejonizowanej do rozcieńczenia próbek osocza oraz krwi, opracowana metoda charakteryzuje się całkowitym wyeliminowaniem toksycznych rozpuszczalników na etapie przygotowania próbki, co skutkowało maksymalnym wynikiem 1 w ocenie tego kryterium. W kolejnym etapie ocenie podlegał stopień wykorzystania zrównoważonych i odnawialnych materiałów w metodach przygotowania próbek. Ze względu na zakaźny charakter badanego materiału, do przygotowania próbek wykorzystywano wyłącznie polipropylenowe materiały jednorazowego użytku (końcówki do pipet, probówki typu Eppendorf oraz fiolki do HPLC), w związku z czym uzyskano zero punktów w tym kryterium. Czwarta zasada zielonego przygotowania próbek dotyczy zapobiegania generowania odpadów. W tym przypadku wszystkie zużyte materiały (w tym jednorazowego użytku) i substancje dodane do próbki (rozpuszczalniki,

odczynniki, kwasy, zasady) traktuje się jako odpady. Dodatkowo, sama próbka również powinna być traktowana jako odpad, jeśli została skażona toksycznymi substancjami podczas przygotowania do analizy. Zarówno próbki biologiczne, jak i próbka wody nie stanowiły w tym przypadku odpadu, gdyż nie dodano do nich żadnych toksycznych reagentów. W niniejszej metodzie masa wytworzonych odpadów analitycznych wynosiła 1,212 g i odpowiadała masie materiałów jednokrotnego użytku. Kryterium piąte odnosi się do minimalizacji ilości próbki. W opracowanych protokołach przygotowania próbek biologicznych do analizy, zmniejszono objętość próbki do jedynie 4 µl osocza lub krwi, co przyczyniło się do redukcji zużycia zasobów, nakładu pracy, a także zwiększenia potencjału automatyzacji i przenośności metody. Kryterium szóste odnosi się do szybkości całego procesu przygotowania próbek. Ocenie podlega liczba próbek możliwych do przygotowania w ciągu jednej godziny. Podczas przeprowadzonych testów, wartość ta wyniosła średnio 85 próbek. Kryterium siódme odnosi się do minimalizacji etapów procedury przygotowania próbki, a także promuje automatyzację procesu. W niniejszej metodzie, próbki wyłącznie rozcieńczano 50- lub 100-krotnie za pomocą wody dejonizowanej, w związku z czym maksymalnie uproszczono proces, co pozytywnie wpłynęło na zieloność metody (1 punkt). Procedura ta nie była jednak zautomatyzowana, co wpłynęło na uzyskanie oceny wynoszącej 0,25. Końcowy wynik stanowił iloczyn obu ocen. W kolejnym etapie ocenie podlega minimalizacja zużycia energii. W niniejszej metodzie podczas etapu przygotowania próbek do analizy HPLC nie wykorzystywano żadnego sprzętu, w związku z czym zapotrzebowanie energetyczne było zerowe. W kryterium 8 uzyskano zatem maksymalną ocenę równą 1,0. Kryterium 9 odnosi się do ekologiczności zastosowanej metody instrumentalnej do dalszej analizy. Preferowane są metody, które są proste, wymagają niskiego zużycia energii oraz odczynników chemicznych. Ostateczny wybór techniki zależy jednak od wymagań analitycznych, wydajności metody i dostępności sprzętu. Niniejsza metoda opierała się na analizie endogennych białek w oparciu o technikę HPLC-ELSD, co zostało uwzględnione w czasie obliczania zieloności przygotowania próbki. Jako ostatnie kryterium, ocenie podlega bezpieczeństwo operatora. Z uwagi na fakt, że w procedurze przygotowania próbki do analizy nie wykorzystywano żadnych toksycznych odczynników oraz rozpuszczalników, w kryterium tym uzyskano 1 punkt. Ostateczny wynik wskazujący na ogólną efektywność ekologiczności przygotowania próbek do analizy przedstawiono na Rysunku 39. Wokół okręgu z wynikiem ogólnym znajduje się 10 segmentów, z których każdy odpowiada jednemu z kryteriów oceny. Długość każdego

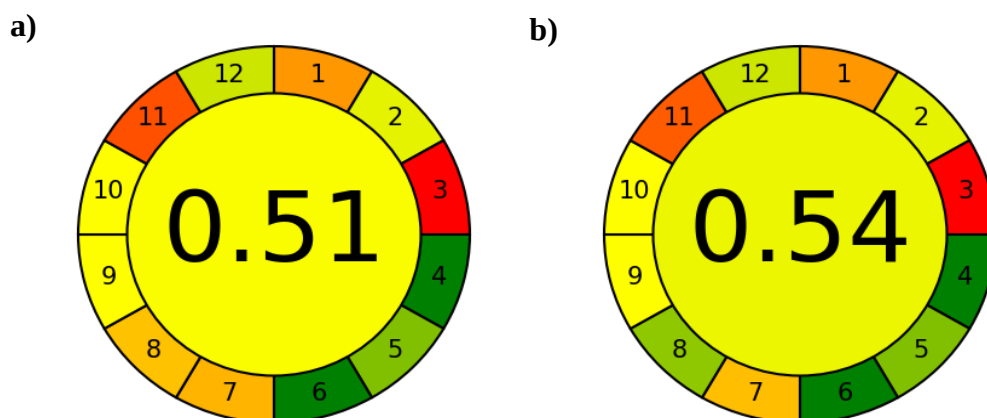
segmentu odzwierciedla wagę przypisaną danemu kryterium oceny, podczas gdy jego kolor wizualizuje wydajność w danym kryterium i umożliwia porównanie charakteru zagrożeń i ryzyka. Uzyskany wynik 0,75 sugeruje, że przygotowanie próbek zostało zoptymalizowane pod kątem ekologii, ale możliwe są dalsze ulepszenia.



Rysunek 39. Wyniki oceny ekologiczności etapu przygotowania próbek do analizy przeprowadzonej za pomocą narzędzia AGREEprep; kryteria: 1 – miejsce przygotowania próbek, 2 – materiały niebezpieczne, 3 – zrównoważony rozwój, odnawialność i ponowne wykorzystanie materiałów, 4 – odpady, 5 – ekonomia wielkości próbek, 6 – przepustowość próbek, 7 – integracja i automatyzacja, 8 – zużycie energii, 9 – metoda analizy, 10 – bezpieczeństwo operatora

Ocenie poddano także zieloność opracowanej metody chromatograficznej. Pierwsza zasada zielonej chemii analitycznej stanowi o stosowaniu bezpośrednich technik analitycznych w celu uniknięcia obróbki próbek. W związku z pobieraniem próbek krwi oraz osocza, a następnie transportowaniem ich do laboratorium, gdzie poddawane były dalszej obróbce, procedura pobierania próbek wykorzystywana w ocenianej metodzie analitycznej uzyskała 0,3 punktu. Druga zasada odnosi się do minimalizacji rozmiaru próbki oraz liczby próbek. Objętość pobieranej krwi każdorazowo wynosiła 2 ml, co uwzględniono w ocenie zieloności metody. Z perspektywy 12 zasad zielonej chemii analitycznej ważne jest, aby urządzenie znajdowało się jak najbliżej miejsca pomiaru, ponieważ wówczas czas między kolejnymi analizami jest krótki, a opóźnienie między pobraniem próbki a uzyskaniem istotnych informacji analitycznych jest minimalne. W tym kontekście preferowane są przenośne

urządzenia terenowe oraz zminiaturyzowane systemy analityczne. W niniejszej metodzie pomiary przeprowadzano w trybie off-line (zasada 3, wynik równy 0 punktów), natomiast procedura przygotowania próbki składała się wyłącznie z jednego etapu (zasada 4), jakim było rozcieńczanie, za co uzyskano maksymalną ocenę wynoszącą 1 punkt. Metoda ma charakter półautomatyczny, a przygotowanie próbki zostało zminiaturyzowane (zasada 5), uzyskując wynik 0,75 punktu. Podczas etapu przygotowania próbek biologicznych do analizy nie stosowano reakcji chemicznej modyfikacji analitów za pomocą odczynników derywatyzujących (zasada 6), co skutkowało maksymalnym wynikiem równym 1 punkt. W przypadku analizy próbek krwi, odpady analityczne obejmowały 0,399 g próbki, 1,212 g materiałów zużywalnych oraz 15 ml fazy ruchomej, w tym ok. 9,5 g ACN. W przypadku osocza zużyto 17 ml fazy ruchomej, w tym ok. 11 g ACN, a masa próbki wynosiła 0,2 g. W pojedynczym przebiegu oznaczano od dwóch (krew) do sześciu analitów (osocze), a przepustowość metody wynosiła 4 próbki na godzinę (krew) lub 3 próbki na godzinę (osocze) – zasada 8. Najbardziej energochłonną techniką była chromatografia cieczowa (zasada 9), co dało wynik 0,5 punktu, natomiast zgodnie z zasadą 10 niektóre odczynniki można uzyskać ze źródeł biologicznych. Opracowane procedury wymagają zużycia od 12 do 14 ml toksycznych rozpuszczalników (zasada 11), które są wysoce łatwopalne i mogą tworzyć mieszaniny wybuchowe w powietrzu (zasada 12). Końcowe wyniki dla obu protokołów chromatograficznych opracowanych w ramach niniejszej metody HPLC-ELSD przedstawiono na Rysunku 40.



Rysunek 40. Wyniki oceny zieloności metody analitycznej przeprowadzonej za pomocą narzędzia AGREE uzyskane dla protokołów chromatograficznych służących oznaczeniu wybranych białek endogennych w próbkach: a) krwi pełnej, b) osocza; kryteria: 1 – przygotowanie próbki, 2 – rozmiar próbki, 3 – miejsce urządzeń analitycznych, 4 – liczba etapów przygotowania próbki, 5 – automatyzacja i miniaturyzacja, 6 – derywatyzacja, 7 – odpady, 8 – przepustowość analizy, 9 – konsumpcja energii, 10 – źródło reagentów, 11 – toksyczność, 12 – bezpieczeństwo operatora

Wartości 0,51 i 0,54 wskazują na umiarkowaną zgodność opracowanych protokołów chromatograficznych z 12 zasadami zielonej chemii analitycznej. Wyższy wynik uzyskany dla osocza wynika z większej przepustowości metody (6 analitów oznaczanych jednocześnie w jednej próbce; 3 próbki w ciągu godziny).

4.2.5 Zastosowanie opracowanych procedur analitycznych do oznaczenia wybranych białek w próbkach rzeczywistych

Opracowane i zwalidowane procedury analityczne zastosowano do oznaczenia wybranych białek endogennych w próbkach osocza oraz krwi pełnej pochodzących od 50 uczestników badania, w tym 25 osób potencjalnie zdrowych oraz 25 pacjentów ze zdiagnozowanym RZS. Spodziewane zakresy stężeń poszczególnych analitów oparte były o dane literaturowe, które wskazywały na następujące zakresy referencyjne białek u osób zdrowych: 35 – 50 mg/ml dla HSA ^[227,228], 110 – 180 mg/ml dla Hgb ^[229], 0,00 – 0,30 mg/ml dla wolnej Hgb (fHgb) ^[230,231], 2,5 – 3,0 mg/ml dla Tf ^[232], 1,5 – 5,0 mg/ml dla Fg ^[233,234], 0,0 – 0,0003 mg/ml dla Mb ^[235,236] oraz 5 – 15 µU/ml (35,88 – 107,63 pmol/l, tj. 0,0002083 – 0,0006248 mg/ml) dla Ins ^[237]. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń przedstawiono w Tabeli 9. Analiza statystyczna wykazała, że w przypadku niektórych białek ich stężenie różniło się w sposób statystycznie istotny w próbkach pochodzących od pacjentów z RZS w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Test Shapiro-Wilka wykazał, że dla większości zmiennych rozkład danych był zgodny z rozkładem normalnym, co pozwoliło na zastosowanie testów t-Studenta (przy spełnieniu założenia homogeniczności wariancji) i t-Welcha (w przypadku heterogeniczności wariancji) do porównań międzygrupowych. W przypadkach, gdy dane odbiegały od normalności, zastosowano test U Manna-Whitneya. Statystyki opisowe obejmują średnią i SD dla zmiennych o rozkładzie normalnym oraz Me i IQR dla zmiennych ciągłych nieparametrycznych.

Tabela 9. Wyniki analizy porównawczej średniej zawartości wybranych białek endogennych w płynach ustrojowych 25 pacjentów z RZS i 25 ochotników z grupy kontrolnej oznaczonych za pomocą opracowanych protokołów chromatograficznych ($n = 3$)

Analit	Wykryte stężenie białka (średnia ± SD lub Me ± IQR)		Test statystyczny	Wartość p
	(mg/ml)			
	Pacjenci z RZS	Grupa kontrolna		
Krew				
HSA	32,67 ± 6,53	40,8 ± 5,09	test U Manna-Whitneya	8,45 × 10 ⁻⁴
Hgb	123,58 ± 12,51	146,59 ± 8,51	test t-Studenta	8,76 × 10 ⁻¹⁰
Osocze				
Ins	n.w.	n.w.	-	-
Tf	1,84 ± 0,26	3,10 ± 0,56	test t-Welcha	6,45 × 10 ⁻¹²
HSA	34,18 ± 4,58	43,70 ± 3,20	test U Manna-Whitneya	9,64 × 10 ⁻⁴
Fg	4,70 ± 0,77	2,55 ± 0,47	test t-Welcha	1,12 × 10 ⁻¹⁴
Mb	n.w.	n.w.	-	-
fHgb	n.w.	n.w.	-	-

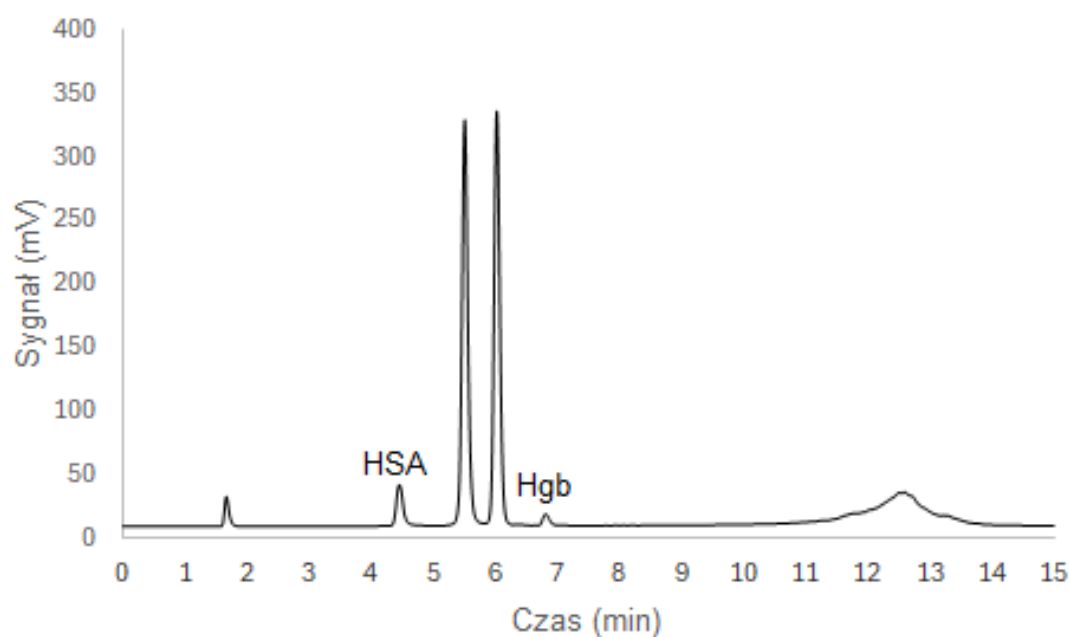
Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą testu U Manna-Whitneya wykazała istotną różnicę w poziomie HSA we krwi między pacjentami z RZS a grupą kontrolną. Średnie stężenie HSA w grupie RZS wyniosło 32,67 $\pm$ 6,53 mg/ml krwi, podczas gdy w grupie kontrolnej było istotnie wyższe i wynosiło 40,8 $\pm$ 5,09 mg/ml krwi. Otrzymana wartość $p < 0,05$ sugeruje, że obniżony poziom HSA może być związany z procesem chorobowym w RZS. W przypadku próbek osocza wyniki były podobne. Średnie stężenie HSA w osoczu pacjentów z RZS było istotnie niższe niż w grupie kontrolnej, co zostało potwierdzone za pomocą testu U Manna-Whitneya. HSA jest ujemnym białkiem ostrej fazy, co oznacza, że jej poziom zwykle maleje w odpowiedzi na procesy zapalne, dlatego zmniejszenie jej stężenia u pacjentów z RZS było zjawiskiem naturalnym i oczekiwanym ^[238]. Przedstawione wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi dla metody referencyjnej opisanej w rozdziale trzecim niniejszej rozprawy,

co świadczy o spójności obu podejść oraz potwierdza poprawność zastosowanych metodologii. Uzyskane wyniki ($t(48) = 7,60$, $p < 0,05$) wskazują na istotnie niższy poziom Hgb u pacjentów z RZS w porównaniu do osób zdrowych. Wariancja wyników była większa w grupie chorych (156,49) niż w grupie zdrowych (72,34), co sugeruje większe zróżnicowanie poziomu Hgb wśród pacjentów z RZS. Niemniej jednak, wyniki testu Levene'a ($p \geq 0,05$) wskazują, iż nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej, zgodnie z czym przyjęto, że wariancje grup są sobie równe. Zgodnie z definicją WHO^[239], stężenie Hgb świadczące o niedokrwistości wynosi u kobiet <120 mg/ml, natomiast u mężczyzn <130 mg/ml. W grupie kontrolnej, u żadnego z ochotników nie stwierdzono poziomu Hgb świadczącego o anemii, podczas gdy 52% pacjentów z RZS towarzyszyła niedokrwistość. Uzyskany obraz kliniczny jest zgodny z wcześniejszymi badaniami^[240–244] sugerującymi wpływ przewlekłego stanu zapalnego w RZS na obniżenie poziomu Hgb, który może wynikać ze zwiększonej degradacji erytrocytów, uszkodzenia szpiku kostnego i spadku produkcji czerwonych krwinek, zaburzeń produkcji erytropoetyny, czy niedoborów żelaza. Anemia jest bowiem najczęstszym zaburzeniem hematologicznym występującym u chorych na RZS. fHgb pojawia się w osoczu gdy jest uwalniana z krwinek czerwonych w ilości przekraczającej pojemność transportową haptoglobiny^[245]. Podwyższone stężenie fHgb jest charakterystyczne dla zespołów hemolitycznych. fHgb może uszkadzać naczynia krwionośne, wywoływać stan zapalny i prowadzić do występowania zdarzeń zakrzepowych, dlatego pomiar stężenia wolnej hemoglobiny w osoczu stanowi ważny element diagnostyczny w ocenie nasilenia hemolizy oraz w monitorowaniu pacjentów z tego typu schorzeniami. Podczas przeprowadzonych badań nie wykryto fHgb, ponieważ jej normalne stężenie jest znacznie niższe niż LOD zastosowanej procedury. Opracowana metoda pozwala jednak na precyzyjną analizę poziomu Hgb we krwi pacjentów z RZS, co może być wykorzystane do monitorowania niedokrwistości, oceny aktywności choroby oraz skuteczności terapii. Fg jest białkiem osocza, które odgrywa kluczową rolę w procesie krzepnięcia krwi^[245]. Jest również jednym z wielu dodatnich białek ostrej fazy, którego poziom może wzrosnąć w odpowiedzi na stan zapalny, infekcję czy uraz^[238,246]. Wzrost poziomu Fg zwiększa ryzyko powstawania zakrzepów, dlatego pomiar jego stężenia może służyć do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego oraz do identyfikowania pacjentów o wyższym ryzyku rozwoju miażdżycy i chorób zakrzepowo-zatorowych. Wyniki testu t-Welcha ($t(40) = -11,865$, $p < 0,05$) wykazały istotnie wyższy poziom Fg w osoczu pacjentów z RZS w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami. Analiza wariancji wykazała ponadto większą

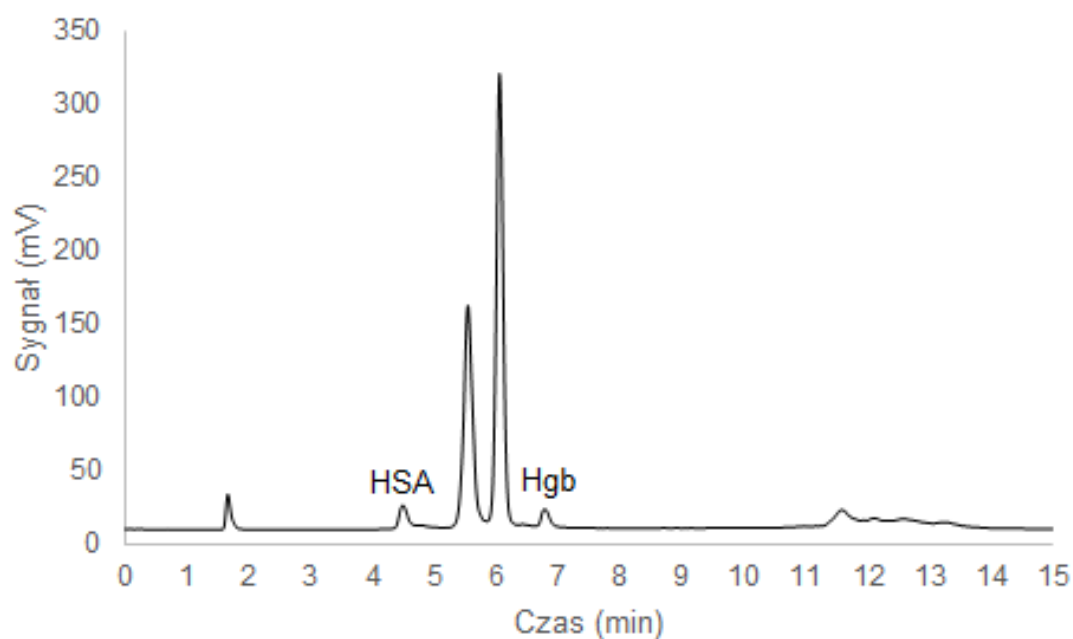
rozbieżność wyników w grupie pacjentów z RZS (0,5986) w porównaniu z grupą kontrolną (0,2204). Wartość p dla testu dwustronnego wyniosła $1,12 \times 10^{-14}$, co jest znacznie mniejsze od przyjętego poziomu istotności $p < 0,05$ i oznacza, że istnieje statystycznie istotna różnica w średnim stężeniu Fg między osobami zdrowymi a pacjentami z RZS. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [247,248], co oznacza, że opracowana metoda może być z powodzeniem stosowana do precyzyjnego oznaczania stężenia Fg w przebiegu wybranych chorób reumatycznych, w szczególności do monitorowania stanu zapalnego, oceny ryzyka wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych oraz do oceny skuteczności terapii. Do wyznaczenia różnic w poziomach Tf pomiędzy pacjentami z RZS a grupą kontrolną zastosowano test t-Welcha, zakładający nierówność wariancji. Wariancja stężenia Tf w grupie zdrowych osób wynosiła 0,3135, podczas gdy w grupie pacjentów z RZS 0,0679, co sugeruje, że rozproszenie wyników u zdrowych ochotników było większe niż u chorych. Wyniki analizy statystycznej jednoznacznie wskazują na istotną różnicę w stężeniu Tf między zdrowymi osobami a pacjentami z RZS ($t(34) = 10,23$, $p < 0,05$). Niższe stężenie Tf w grupie pacjentów z RZS może być związane z procesami zapalnymi charakterystycznymi dla tej choroby i zostało już odnotowane w literaturze [249–251]. Zgodnie z założeniami, w osoczu nie wykryto Mb oraz Ins, ponieważ ich stężenia endogenne są znacznie poniżej LOD opracowanej metody. Niemniej jednak, skoro niewielkie zmiany w programie elucji gradientowej oraz wzmocnieniu sygnału detektora wystarczyły, aby z powodzeniem oznaczyć wybrane białka zarówno w osoczu, jak i krwi pełnej przy użyciu tych samych procedur, śmiało można stwierdzić, że opracowana metoda charakteryzuje się wysoką elastycznością. Fakt, że takie zmiany są wystarczające do uzyskania wiarygodnych wyników w różnych próbkach biologicznych, wskazuje na potencjał metody do wykorzystania w szerszym zakresie aplikacji. Istnieje zatem uzasadnione przypuszczenie, że opracowana metoda HPLC-ELSD może zostać zaadaptowana do innych matryc, w których stężenia analizowanych białek, w tym Ins oraz Mb będą powyżej LOQ. Przykładowe chromatogramy uzyskane dla próbek krwi pochodzących od ochotnika z grupy kontrolnej oraz pacjenta z RZS przedstawiono na Rysunkach 41 i 42, natomiast dla próbek osocza na Rysunkach 43 i 44.

Przeprowadzona analiza wykazała, że opracowana metoda HPLC-ELSD jest skutecznym narzędziem do oznaczania wybranych białek endogennych w płynach ustrojowych człowieka, w szczególności białek ostrej fazy w osoczu oraz Hgb we krwi, co umożliwia jej zastosowanie w diagnostyce klinicznej. Metoda charakteryzuje się

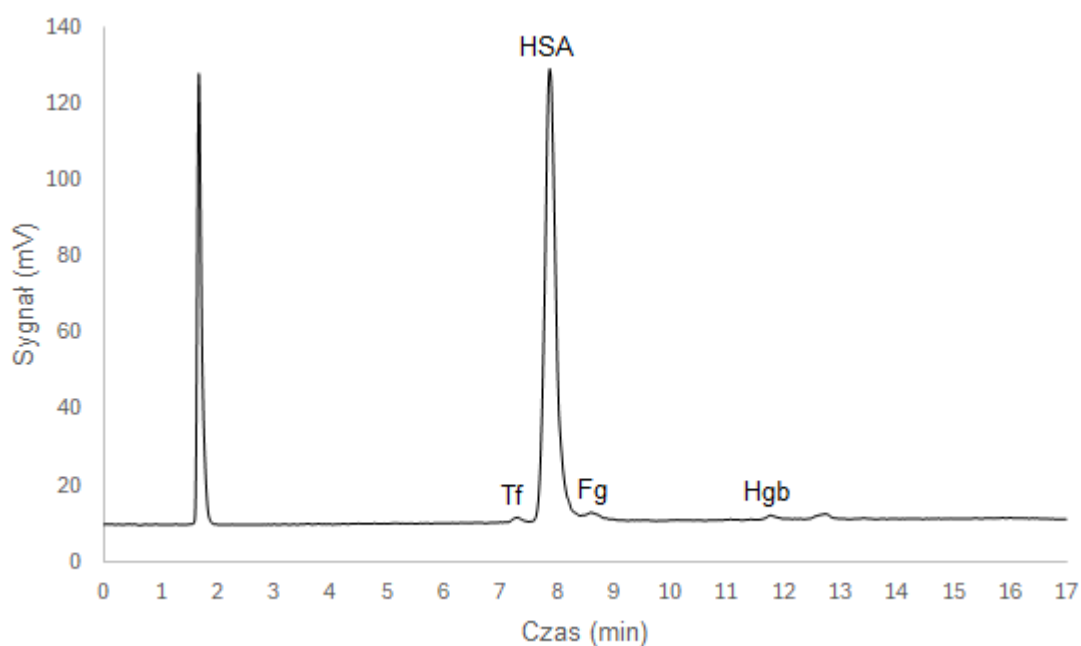
wysoką selektywnością, precyzją i powtarzalnością, co potwierdzają zarówno wyniki walidacji, jak i przeprowadzona analiza statystyczna. Istotne różnice w poziomach oznaczanych białek między grupą kontrolną a pacjentami z RZS mogą wskazywać na potencjalne znaczenie tych markerów w diagnostyce i monitorowaniu choroby.



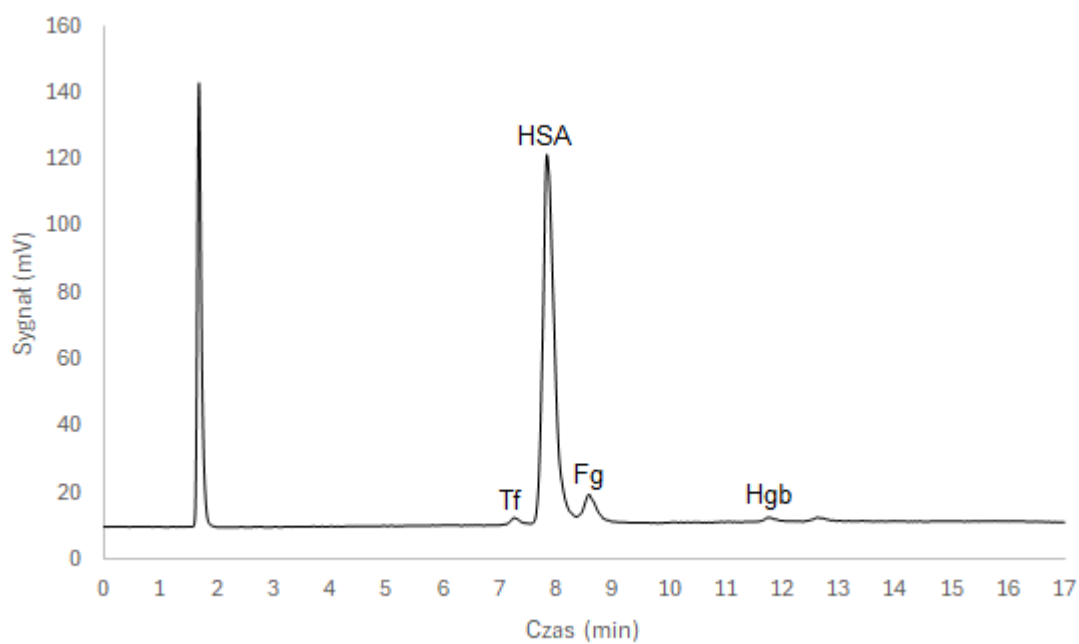
Rysunek 41. Przykładowy chromatogram uzyskany dla próbki krwi pochodzącej od zdrowego ochotnika badania; protokół przygotowania próbki opisano w podrozdziale 4.1.6.1, natomiast warunki chromatograficzne w podrozdziale 4.1.4.1



Rysunek 43. Przykładowy chromatogram uzyskany dla próbki krwi pochodzącej od pacjenta z RZS; protokół przygotowania próbki opisano w podrozdziale 4.1.6.1, natomiast warunki chromatograficzne w podrozdziale 4.1.4.1



Rysunek 42. Przykładowy chromatogram uzyskany dla próbki osocza pochodzącej od ochotnika z grupy kontrolnej; protokół przygotowania próbki opisano w podrozdziale 4.1.6.1, natomiast warunki chromatograficzne w podrozdziale 4.1.4.2



Rysunek 44. Przykładowy chromatogram uzyskany dla próbki osocza pochodzącej od pacjenta z RZS; protokół przygotowania próbki opisano w podrozdziale 4.1.6.1, natomiast warunki chromatograficzne w podrozdziale 4.1.4.2

5. OPRACOWANIE METODY OZNACZANIA RÓŻNYCH FORM REDOKS TIOLI TECHNIKĄ HPLC-FLD W CELU OSZACOWANIA RYZYKA WYSTĄPIENIA ZDARZEŃ SERCOWO-NACZYNIOWYCH NA SKUTEK ZAKAŻENIA WIRUSEM SARS-COV-2 I SZCZEPIENIA PRZECIWKO COVID-19

W niniejszym rozdziale szczegółowo opisano etapy rozwijania czułej i selektywnej metody oznaczania różnych form redoks tioli z wykorzystaniem HPLC-FLD. Procedura wykorzystuje przedkolumnową modyfikację chemiczną analitów przy użyciu ABD-F. W celu oznaczenia zarówno wolnych tioli, jak i związanych z białkami, przed reakcją derywatyzacji przeprowadzana była redukcja wiązań disiarczkowych za pomocą NaBH₄. Opracowana metoda umożliwia precyzyjną analizę biomarkerów oksydacyjnych, co zostało wykorzystane w niniejszej pracy do oceny wpływu stresu oksydacyjnego na układ sercowo-naczyniowy w kontekście COVID-19 i działań profilaktycznych. Opracowaną metodologię wykorzystano ponadto w ramach eksperymentu medycznego pt. „*Badania wpływu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 oraz szczepienia przeciwko COVID-19 na układ sercowo-naczyniowy*”, prowadzonego we współpracy z Zakładem Medycyny Rodzinnej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi oraz Wojewódzkim Specjalistycznym Szpitalem im. dra Wł. Biegańskiego w Łodzi (Oddział Chorób Wewnętrznych – Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi).

5.1 Materiały i metody

5.1.1 Odczynniki

- glutation zredukowany (GSH), ≥98%, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- utleniony glutation (GSSG), ≥98% (HPLC), Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- L-cysteinylo-glicyna (Cys-Gly), ≥85% (TLC), nadająca się do HPLC, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- DL-homocysteina (Hcy), standard analityczny, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- L-homocystyna (Hcy-Hcy), ≥98% (HPLC), Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- N-acetylo-L-cysteina (NAC), ≥99% (TLC), Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;

- γ -L-glutamyl-L-cysteina (γ -Glu-Cys), $\geq 80\%$ (HPLC), Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- n-oktanol, czysty do analizy, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- dimetylosulfotlenek (DMSO), czysty do analizy, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- kwas trifluorooctowy (TFA), czystość HPLC, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- 4-(aminosulfonylo)-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol (ABD-F), Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- L-cysteina (Cys), Reanal, Budapeszt, Węgry;
- L-cystyna (Cys-Cys), $\geq 99,7\%$ (TLC), Reanal, Budapeszt, Węgry;
- wodorotlenek sodu (NaOH), czysty do analizy, J.T. Beaker, Deventer, Holandia;
- metanol (MeOH), czystość HPLC, J.T. Beaker, Deventer, Holandia;
- kwas solny (HCl), 35 – 38%, czysty do analizy, POCH, Gliwice, Polska;
- kwas chlorowy(VII) (PCA), 70%, czysty do analizy, POCH, Gliwice, Polska;
- borowodorek sodu (NaBH_4), czysty do analizy, Merck, Darmstadt, Niemcy;
- dziesięciowodny tetraboran sodu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$), $\geq 99,5\%$, Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy;
- woda dejonizowana przygotowana w laboratorium przy użyciu systemu Direct-Q 3 UV (Millipore, Wiedeń, Austria);

5.1.2 Roztwory

- Roztwór podstawowy GSSG o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano poprzez odważenie 6,1263 mg GSSG do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml, rozpuszczenie odważonej masy w 200 μl 1 mol/l HCl, a następnie uzupełnienie wodą destylowaną do objętości 1 ml i dokładne wymieszanie.
- Roztwór podstawowy Hcy-Hcy o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano poprzez odważenie 2,683 mg Hcy-Hcy do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml, rozpuszczenie odważonej masy w 200 μl 1 mol/l HCl, a następnie uzupełnienie wodą destylowaną do objętości 1 ml i dokładne wymieszanie.
- Roztwór podstawowy Cys-Gly o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano poprzez odważenie 1,7821 mg Cys-Gly do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml,

- rozpuszczenie odważonej masy w 200 μ l 1 mol/l HCl, a następnie uzupełnienie wodą destylowaną do objętości 1 ml i dokładne wymieszanie.
- Roztwór podstawowy Cys-Cys o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano poprzez odważenie 2,403 mg Cys-Cys do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml, rozpuszczenie odważonej masy w 200 μ l 1 mol/l HCl, a następnie uzupełnienie wodą destylowaną do objętości 1 ml i dokładne wymieszanie.
 - Roztwór podstawowy γ -Glu-Cys o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano poprzez odważenie 2,5027 mg γ -Glu-Cys do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml, rozpuszczenie odważonej masy w 200 μ l 1 mol/l HCl, a następnie uzupełnienie wodą destylowaną do objętości 1 ml i dokładne wymieszanie.
 - Roztwór podstawowy NAC o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano poprzez odważenie 1,6319 mg NAC do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml, rozpuszczenie odważonej masy w 200 μ l 1 mol/l HCl, a następnie uzupełnienie wodą destylowaną do objętości 1 ml i dokładne wymieszanie.
 - Roztwór odczynnika redukującego przygotowano każdorazowo w dniu analiz poprzez rozpuszczenie 0,11352 g NaBH₄ w 500 μ l 0,1 mol/l NaOH, a następnie sporządzenie mieszaniny 6 mol/l NaBH₄ i DMSO w stosunku objętościowym 2:1.
 - Roztwór ABD-F o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano poprzez odważenie 2,1718 mg ABD-F do bursztynowej probówki polipropylenowej o pojemności 1,5 ml i rozpuszczenie odważonej masy w 1 ml buforu wg Sørensen-Valbuma o pH 9,5.
 - Bufor wg Sørensen-Valbuma o pH 9,5 przygotowano poprzez rozpuszczenie 19,07 g Na₂B₄O₇ $\times$ 10 H₂O w 1 litrze wody dejonizowanej, a następnie zmieszanie 80 ml 0,05 mol/l Na₂B₄O₇ $\times$ 10 H₂O z 20 ml 0,1 mol/l NaOH. Otrzymany roztwór buforowy dokładnie wymieszano i sprawdzono pH z wykorzystaniem metody potencjometrycznej.
 - Roztwór NaOH o stężeniu 1 mol/l sporządzono odważając 40 g NaOH do kolby o pojemności 1 litr i uzupełniając wodą destylowaną do kreski.
 - Roztwory HCl o stężeniach 1 oraz 3 mol/l przygotowano odmierzając odpowiednio: 4,139 i 12,42 ml 37% HCl do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniając wodą destylowaną do kreski.
 - Roztwór kwasu chlorowego(VII) (PCA) o stężeniu 3 mol/l przygotowano odmierzając 12,82 ml 70% PCA do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniając wodą destylowaną do kreski.

- Roztwory robocze sporządzano codziennie poprzez odpowiednie rozcieńczenie wodą dejonizowaną i natychmiastowo wykorzystywano.

5.1.3 Aparatura

Wszystkie analizy przeprowadzono za pomocą zintegrowanego systemu LC-4000 Series JASCO RHPLC (JASCO, Tokio, Japonia) wyposażonego w pompę poczwórną z odgazowaniem (model nr PU-4180, Tokio, Japonia), automatyczny podajnik próbek (model nr AS-4150, Tokio, Japonia), termostat kolumnowy (model nr CO-4062, Tokio, Japonia) oraz detektor fluorescencyjny (model nr FP-4020, Tokio, Japonia). Chromatogramy i widma fluorescencji rejestrowano przy długości fali wzbudzenia wynoszącej 380 nm i długości fali emisji równej 515 nm. Sygnał detektora został wzmocniony stukrotnie w przypadku oznaczania tioli związanych z białkami oraz tysiąckrotnie, gdy analizowano tiole wolne i zredukowane. Dla tioli całkowitych wzmocnienie detektora ustawiono na jednokrotną wartość. Sygnał wyjściowy rejestrowano za pomocą oprogramowania ChromNAV2, a analizę widm przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Spectra Manager ver. 2.

W trakcie przygotowywania próbek do analizy chromatograficznej użyto również następujących narzędzi i urządzeń laboratoryjnych:

- waga laboratoryjna Scaltec SBC 21,
- waga laboratoryjna OHAUS, model Pioneer Pa214CM,
- pehametr firmy Mettler Toledo FiveEasy PLUS FP20 z elektrodą szklaną kombinowaną wyposażoną w czujnik temperatury,
- system oczyszczania wody Direct-Q 3 UV (Millipore, Wiedeń, Austria),
- wirówka firmy Hettich, model Mikro 220 R z funkcją chłodzenia,
- zamrażarka niskotemperaturowa Panasonic Healthcare Co. Ltd., model MDF-U55V-PE,
- pipety automatyczne firmy HTL,
- termostaty firmy Grant, modele QBH 2 i QBD 2,
- kolby miarowe, zlewki, szpatułki ze stali nierdzewnej, naczynka wagowe, lejki, probówki typu Eppendorf, probówki polipropylenowe, bursztynowe fiołki do HPLC.

5.1.4 Warunki chromatograficzne

Badanie polegało na pomiarze stężeń różnych form redoks Hcy oraz powiązanych z nią w szlakach metabolicznych przemian niskocząsteczkowych tioli, takich jak Cys, GSH, Cys-Gly oraz γ -Glu-Cys za pomocą dostosowanej i zwalidowanej metody opartej na technice RP-HPLC-FLD. W metodzie tej zastosowano przedkolumnową modyfikację chemiczną analitów z użyciem ABD-F. Rozdzielenie chromatograficzne pochodnych analitów przeprowadzono w temperaturze 25 °C za pomocą kolumny analitycznej XBridge® C18 o długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm oraz rozmiarze cząstek wypełnienia 5 μ m (Waters, Irlandia). Jako fazę ruchomą zastosowano 0,1% TFA (składnik A) oraz MeOH (składnik B), ustawiając prędkość jej przepływu na 1 ml/min. Temperatura panująca w automatycznym podajniku próbek wynosiła 4 °C. Program elucji był następujący: 0-7 min, 15% B, 7-10 min, 15-25% B, 10-13 min, 25% B, 13-16 min, 25-75% B, 16-18 min, 75-15% B, 18-21 min, 15% B. Objętość wprowadzanej do układu chromatograficznego próbki wynosiła 10 μ l, a czas analizy nie przekraczał 21 minut. Piki były identyfikowane poprzez porównanie czasów retencji oraz widm fluorescencyjnych z danymi uzyskanymi z analizy odpowiednich standardów.

5.1.5 Materiał badany

Próbki krwi pełnej pozyskane od każdego uczestnika badania pobierane były przez wykwalifikowany personel medyczny w ramach umowy współpracy pomiędzy Uniwersytetem Łódzkim a firmą Diagnostyka Laboratoria Medyczne sp. z o.o. Krew pobierano na czczo poprzez wkłucie dożylnie do próbki zawierającej antykoagulant (EDTA), następnie umieszczano na lodzie i wirowano przy 3500 obr./min w temperaturze 4 °C przez 10 minut. Roztwór nad osadu komórkowego (osocze) przenoszony był następnie do odpowiednio oznakowanej uprzednio nadanym identyfikatorem oraz datą pobrania próbki. W celu oznaczenia tioli zredukowanych 200 μ l krwi niezwłocznie mieszano z odczynnikami niezbędnymi do przeprowadzenia chemicznej modyfikacji analitów i procedowano zgodnie ze standardową procedurą w czasie krótszym niż 20 minut od pobrania. Materiał do badań przygotowywano do transportu w sposób uniemożliwiający jego zanieczyszczenie, z zabezpieczeniem szczelności pojemników i w warunkach chłodniczych. Próbkę osocza wysyłało w dniu pobrania i transportowano bezpośrednio do Katedry Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, gdzie były poddane dalszym procedurom analitycznym lub przechowywane w temperaturze -80 °C do czasu analizy.

5.1.6 Charakterystyka badanych grup pacjentów

W związku z wykorzystaniem w niniejszej pracy materiału biologicznego pochodzącego od ludzi, przed rozpoczęciem eksperymentu medycznego uzyskano niezbędne zgody od właściwych komisji bioetycznych, zgodnie z obowiązującymi przepisami i standardami etycznymi w badaniach biomedycznych (Uchwała nr 22/KBBN-UŁ/II/2015 z dnia 19 listopada 2015 r. Komisji ds. bioetyki badań naukowych Uniwersytetu Łódzkiego, Uchwała nr 10/KBBN-UŁ/I/2020-21 z dnia 15 grudnia 2020 r. Komisji ds. bioetyki badań naukowych Uniwersytetu Łódzkiego, Uchwała nr 34/2022 z dnia 12 kwietnia 2022 r. Komisji Bioetycznej przy Instytucie „Centrum Zdrowia Matki Polki”). Każdy ochotnik został szczegółowo poinformowany o jego celu, metodologii, potencjalnych konsekwencjach oraz warunkach ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej na rzecz uczestnika badania i osób, których skutki eksperymentu mogły bezpośrednio dotknąć, a następnie dobrowolnie wyraził zgodę na oddanie próbek krwi poprzez podpisanie formularza świadomej zgody. Personel medyczny zaangażowany w realizację projektu zobowiązany był do stosowania sterylnych technik i jednorazowych przyborów, które minimalizowały ryzyko infekcji. Ochotnicy biorący udział w eksperymencie nie otrzymywali wynagrodzenia i nie byli poddani procedurom, które mogłyby być dla nich szkodliwe w skutkach. Pobieranie próbek krwi mogło być jednak niekomfortowe lub bolesne dla niektórych osób. Proces wkłucia igły mógł powodować krótkotrwały dyskomfort lub ból. Ponadto istniało ryzyko minimalnego krwawienia z miejsca wkłucia igły. Zazwyczaj było ono niewielkie i samoistnie ustępowało po zastosowaniu opatrunku lub nacisku. W rzadkich przypadkach mogło wystąpić podbiegnięcie krwawe lub krwiak w miejscu wkłucia.

5.1.6.1 Kategoria badanych osób oraz warunki włączenia uczestnika do badania

Próbki krwi pozyskane zostały od 60 osób płci męskiej i żeńskiej w zróżnicowanym wieku 18 – 80 lat zamieszkujących na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, którzy spełniali poniższe warunki wynikające z podziału na następujące grupy eksperymentalne i grupę kontrolną:

- Grupa badana I (n = 15) – ozdrowieńcy, u których pierwotnie zdiagnozowano zakażenie wirusem SARS-CoV-2 za pomocą testu wykorzystującego reakcję łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) i którzy po upływie objawów chorobowych lub izolacji nie zostali zaszczepieni przeciwko COVID-19 w trakcie prowadzenia doświadczenia badawczego;

- Grupa badana II (n = 15) – ozdrowieńcy, u których pierwotnie zdiagnozowano zakażenie wirusem SARS-CoV-2 za pomocą testu RT-PCR i którzy po upływie objawów chorobowych lub izolacji zostali zaszczepieni przeciwko COVID-19 przed udziałem w badaniu;
- Grupa badana III (n = 15) – osoby zaszczepione przeciwko COVID-19, u których nigdy nie zdiagnozowano zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2, i u których nie wystąpiły typowe objawy chorobowe przed przystąpieniem do badania;
- Grupa kontrolna (n = 15) – ochotnicy niezaszczepieni przeciwko COVID-19, u których nigdy nie stwierdzono zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 i którym materiał do badań pobrano przed wybuchem pandemii.

Ochotnicy byli osobami nienadużywającymi alkoholu, niepalącymi i deklarującymi niestosowanie żadnych witamin, kortykosteroidów ani suplementów antyoksydacyjnych.

5.1.6.2 Warunki wykluczenia uczestnika z badania

Ze względu na towarzyszącą hiperhomocysteinemię, z badania wykluczone zostały kobiety, które urodziły dzieci z defektem cewy nerwowej, a także osoby ze zdiagnozowanymi chorobami sercowo-naczyniowymi i mózgowo-naczyniowymi oraz takimi schorzeniami jak: cukrzyca, nowotwory, niewydolność nerek, niedoczynność tarczycy, AIDS oraz upośledzenie poznawcze.

5.1.6.3 Rekrutacja uczestników badania

Ochotnicy z grup badanych I – III rekrutowani byli na zasadach doboru ochotniczego przy udziale lekarzy współpracujących poprzez rozmowę i przeprowadzenie wywiadu medycznego z potencjalnymi uczestnikami (zapoznanie się pacjenta z informacjami o badaniu, określenie stanu zdrowia pacjenta, zapoznanie z historią medyczną, określenie, czy pacjent spełnia kryteria włączenia i wyłączenia, omówienie z pacjentem celu, charakteru, ryzyka i korzyści płynących z udziału w badaniu, wyrażenie świadomej zgody pacjenta na udział w badaniu). Ochotnicy z grupy kontrolnej rekrutowani byli na zasadach doboru ochotniczego oraz kuli śnieżnej, przy pomocy upublicznionych ogłoszeń z informacją o badaniu, w ramach którego uzyskano zgodę na wykorzystanie zgromadzonego materiału biologicznego do przyszłych badań naukowych.

5.1.7 Walidacja metody

Walidacja metody została przeprowadzona zgodnie z wytycznymi ICH [147,174], a sam proces miał na celu ocenę kluczowych parametrów, takich jak selektywność, liniowość, precyzja, dokładność, LOD, LOQ, odporność metody, przeniesienie próbki, wpływ matrycy, test zgodności systemu analitycznego oraz stabilność badanych analitów w matrycy. Porównanie uzyskanych danych z kryteriami akceptacji miało na celu zapewnienie wysokiej wiarygodności i powtarzalności wyników analitycznych, co jest kluczowe dla zgodności z międzynarodowymi standardami jakości.

5.1.7.1 Przygotowanie wzorców kalibracyjnych oraz próbek kontroli jakości

Standardy kalibracyjne służące do oznaczania wybranych form redoks tioli (tioli całkowite, związane z białkami oraz wolne) w próbkach osocza przygotowano przy założeniu 100% redukcji wiązań disiarczkowych poprzez dodanie 10 µl odpowiednio przygotowanej mieszaniny roztworów wzorcowych analizowanych związków oraz IS, którym była NAC, do 100 µl osocza i przeprowadzenie dalszej procedury zgodnie z opisami zawartymi w podrozdziale 5.1.9. W przypadku tioli całkowitych, egzogenne stężenia analitów wynosiły: 3,49, 10,0, 15,0, 30,0, 50,0, 100,0, 200,0, 300,0 nmol/ml osocza dla Cys, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 1,54, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0, 50,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,73, 1,5, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 30,0, 50,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,39, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Dla tioli wolnych, stężenia te były następujące: 3,2, 5,0, 10,0, 30,0, 50,0, 100,0, 150,0, 200,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,35, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,14, 0,5, 1,0, 1,5, 3,0, 5,0, 7,5, 10,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,06, 0,1, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 7,5, 10,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,1, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. W przypadku tioli związanych z białkami, stężenia egzogenne oznaczanych związków wynosiły: 6,54, 10,0, 25,0, 50,0, 100,0, 150,0, 200,0, 300,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,57, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 35,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,29, 0,7, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0, 20,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,07, 0,25, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,09, 0,25, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Wzorce kalibracyjne dla tioli zredukowanych przygotowano w sposób umożliwiający uzyskanie następujących stężeń analitów: 1,68, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,13, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0, 20,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,28, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 3,0, 5,0, 10,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,1, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 30,0

nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,14, 0,25, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Stężenie IS było stałe i wynosiło 30,0 nmol/ml osocza dla tioli całkowitych, 3,0 nmol/ml osocza dla tioli związanych z białkami oraz 10,0 nmol/ml osocza dla tioli zredukowanych i wolnych.

QCs przygotowano z oddzielnych roztworów podstawowych w trzech powtórzeniach dla każdego z czterech poziomów stężeń w zakresie krzywej kalibracyjnej, tj. LOQ, trzykrotność LOQ (niskie QC), 40% ULOQ (średnie QC) oraz 80% ULOQ (wysokie QC). W tym celu do próbki zawierającej 100 μ l osocza (lub 200 μ l krwi w przypadku tioli zredukowanych) dodano 10 μ l (lub 20 μ l) mieszaniny IS i roztworów wzorcowych badanych związków, a następnie próbki przygotowano zgodnie z procedurami opisanymi w podrozdziale 5.1.9. Egzogenne stężenia końcowe analitów w przypadku oznaczania tioli całkowitych wynosiły: 3,49, 10,5, 120,0, 240,0 nmol/ml osocza dla Cys, 2,0, 6,0, 20,0, 40,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 1,54, 4,5, 20,0, 40,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,73, 2,2, 20,0, 40,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,39, 1,2, 12,0, 24,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. W przypadku tioli związanych z białkami, QCs przygotowano na następujących poziomach stężeń analitów: 6,54, 19,62, 120,0, 240,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,57, 1,71, 14,0, 28,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,29, 0,87, 8,0, 16,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,07, 0,21, 1,2, 2,4 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,09, 0,27, 1,2, 2,4 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Dla tioli wolnych, stężenia te wynosiły odpowiednio: 3,2, 9,6, 80,0, 160,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,35, 1,05, 12,0, 24,0 nmol/ml osocza Cys-Gly, 0,14, 0,42, 4,0, 8,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,06, 0,18, 4,0, 8,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,1, 0,3, 6,0, 12,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. W przypadku tioli zredukowanych, egzogenne stężenia analitów były następujące: 1,68, 5,04, 12,0, 24,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,13, 0,39, 8,0, 16,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,28, 0,84, 4,0, 8,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,1, 0,3, 12,0, 24,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,14, 0,42, 4,0 i 8,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Podobnie jak w przypadku wzorców kalibracyjnych, stężenie NAC (IS) było stałe i wynosiło: 30,0 nmol/ml osocza dla tioli całkowitych, 3,0 nmol/ml osocza dla tioli związanych z białkami oraz 10,0 nmol/ml osocza dla tioli zredukowanych i wolnych.

5.1.7.2 Selektywność metody

Ocena selektywności metody została przeprowadzona poprzez dodanie znanych ilości roztworów standardowych analizowanych związków do próbek osocza (lub krwi) i porównanie sygnału analitu egzogenego z sygnałem endogennym. Celem było

jednoznaczne odróżnienie wprowadzonego analitu od jego naturalnej zawartości w matrycy. Ponadto przeanalizowano osocze od sześciu różnych dawców o zróżnicowanym poziomie endogennych tioli, które zostało wzbogacone o niskie, średnie i wysokie poziomy QCs w celu oceny możliwości separacji analitów od potencjalnych interferencji matrycowych. Dodatkowo przeprowadzono analizę próbek hemolizowanych i lipemicznych w celu oceny wpływu trójglicerydów oraz hemolizy na wyniki oznaczeń. Wstępna ocena selektywności opierała się na analizie uzyskanych chromatogramów. Sprawdzono, czy w czasach retencji oznaczanych tioli nie występują nieoczekiwane piki oraz czy kształty i rozdzielczość pików pozostają stabilne w próbkach pochodzących z różnych źródeł. W przypadku próbek wzbogaconych zweryfikowano, czy sygnał oznaczanego analitu wzrósł proporcjonalnie, a także czy kształt i czas retencji pików pozostały niezmiennione oraz czy w jego sąsiedztwie nie pojawiły się dodatkowe piki.

5.1.7.3 Zakres liniowości

Liniowość metody oceniono na podstawie ośmiopunktowych krzywych kalibracyjnych, przygotowanych z wykorzystaniem metody wzorca wewnętrznego. Każdą krzywą wygenerowano przy użyciu próbki ślepej, próbki zerowej (próbka ślepa wzbogacona IS) oraz standardów kalibracyjnych na 8 poziomach stężeń. Pomiarów wykonano w trzech powtórzeniach przez kolejne trzy dni robocze. Krzywą wzorcową skonstruowano wykreślając zależność stosunku sygnału analitu do sygnału IS względem znanych stężeń badanego związku. Do wyznaczenia równania krzywej kalibracyjnej zastosowano model regresji liniowej oparty na metodzie najmniejszych kwadratów. Próbki ślepe oraz zerowe nie zostały uwzględnione przy określaniu równania regresji. Do oceny precyzji dopasowania modelu wykorzystano współczynnik determinacji (R^2), który musiał być wyższy niż 0,99. Zgodnie z wytycznymi, oceniono precyzję i dokładność punktów kalibracyjnych na każdym poziomie stężenia. Przyjęto, iż dla precyzji akceptowalne wartości RSD musiały być niższe niż 15%, z wyjątkiem LOQ, gdzie wartość ta nie powinna przekraczać 20%. Akceptowalna dokładność dla każdego punktu musiała mieścić się w zakresie 85 – 115%, z wyjątkiem LOQ, gdzie przedział ten wynosił 80 – 120%. Co więcej, przynajmniej 75% standardów kalibracyjnych musiało spełnić powyższe kryteria. W przypadku tioli całkowitych zakres liniowości dla poszczególnych analitów był następujący: 3,49 – 300,0 nmol/ml osocza dla Cys, 2,0 – 50,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 1,54 – 50,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,73 – 50,0

nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,39 – 30,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Dla tioli zredukowanych liniowość oceniano w zakresie: 1,68 – 30,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,13 – 20,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,28 – 10,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,1 – 30,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,14 – 10,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Zakres liniowości dla tioli wolnych wynosił odpowiednio: 3,2 – 200,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,35 – 30,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,14 – 10,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,06 – 10,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,1 – 15,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. W przypadku tioli związanych z białkami liniowość metody badano w zakresie: 6,54 – 300,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,57 – 35,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,29 – 20,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,07 – 3,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,09 – 3,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys.

5.1.7.4 Wyznaczenie granic wykrywalności i oznaczalności

Aby określić wartości LOD i LOQ dla każdego z analizowanych związków, sporządzono specjalnie przygotowane do tego celu ośmiopunktowe krzywe kalibracyjne, wykonując uprzednio pomiary dla próbek osocza wzbogaconych roztworami wzorcowymi analitów. W zależności od analizowanej formy redoks tioli, procedury przygotowania próbek do analizy były analogiczne jak opisano w podrozdziałach 5.1.7.1 oraz 5.1.9. Stężenia egzogenne badanych związków w przypadku tioli całkowitych wynosiły: 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 30,0, 50,0, 75,0, 100,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,5, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0, 50,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,5, 0,7, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Punkty kalibracyjne dla tioli zredukowanych były następujące: 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 7,0, 10,0, 13,0, 15,0 nmol/ml osocza dla Cys oraz 0,1, 0,25, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 3,0, 5,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, Hcy, GSH i γ -Glu-Cys. W przypadku tioli wolnych, pomiary wykonywano na następujących poziomach stężeń analitów: 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 75,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,1, 0,3, 0,75, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 nmol/ml osocza dla Hcy oraz 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0 nmol/ml osocza dla GSH i γ -Glu-Cys. Stężenia egzogenne badanych związków w przypadku tioli związanych z białkami były z kolei następujące: 1,0, 10,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 165,0 nmol/ml osocza dla Cys, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 17,0, 20,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,1, 0,5, 0,7, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0 nmol/ml osocza dla Hcy oraz 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0 nmol/ml osocza dla GSH i γ -Glu-

Cys. Wszystkie pomiary przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wartości LOD i LOQ określono na podstawie odchylenia standardowego wyrazu wolnego oraz nachylenia krzywej kalibracyjnej, zgodnie ze wzorami przedstawionymi w podrozdziale 4.1.6.4.

5.1.7.5 Ocena precyzji i dokładności

Precyzja i dokładność metody analitycznej zostały określone poprzez analizę QCs, których przygotowanie opisano w podrozdziale 5.1.7.1. niniejszej rozprawy doktorskiej. W celu oceny precyzji i dokładności wewnątrzseryjnej, próbki QCs analizowano w pięciu powtórzeniach dla czterech poziomów stężeń w ramach jednego przebiegu analitycznego, co pozwoliło na określenie odchylenia od poziomów nominalnych oraz zmienności wyników w pojedynczym cyklu analitycznym. Precyzja i dokładność międzyseryjna zostały ocenione poprzez analizę QCs na każdym poziomie stężenia w trzech niezależnych cyklach analitycznych, przeprowadzonych w ciągu trzech kolejnych dni roboczych, co pozwoliło na określenie trendów zmienności wyników w czasie. Do oceny precyzji i dokładności metody wykorzystano krzywe kalibracyjne sporządzone z użyciem świeżo przygotowanych standardów kalibracyjnych. Ponadto dla każdego analitu określono jego stężenie endogenne w próbce ślepej, które następnie odjęto od całkowitego stężenia obserwowanego w próbkach wzbogaconych. Zgodnie z zaleceniami ^[174], dokładność była obliczana na podstawie wzoru przedstawionego w podrozdziale 3.2.3.2. Za kryteria akceptacji przyjęto, iż % odzysku dla każdego poziomu stężenia powinien mieścić się w zakresie $\pm 15\%$ wartości nominalnej, z wyjątkiem LOQ, gdzie dopuszczalne odchylenie wynosi $\pm 20\%$. Precyzja natomiast, wyrażona jako %RSD, nie powinna przekraczać 15%, z wyjątkiem LOQ, gdzie limit wynosił 20%.

5.1.7.6 Testowanie odporności metody

Odporność opracowanej metody analitycznej została oszacowana dla tioli całkowitych poprzez celowe zmiany parametrów analitycznych, w tym prędkości przepływu eluentu ($1,0 \pm 0,1$ ml/min), temperatury rozdzielania chromatograficznego ($25,0 \pm 0,5$ °C) oraz stężenia TFA ($0,1 \pm 0,01\%$) w fazie ruchomej. Odpowiedzi brane pod uwagę podczas testu obejmowały czasy retencji, rozdzielczości oraz wysokości pików. Do oceny odporności metody wykorzystano wzbogaconą próbkę osocza o stężeniu egzogennym każdego z analitu wynoszącym 3,49 nmol/ml osocza dla Cys, 2,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 1,54 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,73 nmol/ml osocza dla

GSH, 0,39 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys oraz 30 nmol/ml osocza dla NAC. Próbkę analizowano trzykrotnie dla każdego badanego parametru.

5.1.7.7 Ocena występowania zjawiska przeniesienia próbki

Procedura oceny występowania zjawiska przeniesienia próbki była analogiczna jak opisano w podrozdziale 4.1.6.7.

5.1.7.8 Ocena wpływu matrycy

Ocenę wpływu matrycy dokonano poprzez analizę trzech powtórzeń QCs na dwóch poziomach stężeń, tj. niskim oraz wysokim dla każdego analitu. Stężenia egzogenne analitów w przypadku tioli całkowitych wynosiły: 10,5 i 240,0 nmol/ml osocza dla Cys, 6,0 i 40,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 4,5 i 40,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 2,2 i 40,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 1,2 i 24,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. W przypadku tioli związanych z białkami, stężenia te były następujące: 19,62 i 240,0 nmol/ml osocza dla Cys, 1,71 i 28,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,87 i 16,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,21 i 2,4 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,27 i 2,4 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Dla tioli wolnych, stężenia egzogenne wynosiły odpowiednio: 9,6 i 160,0 nmol/ml osocza dla Cys, 1,05 i 24,0 nmol/ml osocza Cys-Gly, 0,42 i 8,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,18 i 8,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,3 i 12,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. W przypadku tioli zredukowanych, egzogenne stężenia analitów były następujące: 5,04 i 24,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,39 i 16,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,84 i 8,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,3 i 24,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,42 i 8,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Do badań wykorzystano matryce pochodzące od sześciu różnych dawców, a także próbki lipemiczne i hemolizowane, gdyż istniało wysokie prawdopodobieństwo ich występowania w badaniu. Wszystkie próbki analizowano trzykrotnie zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 5.1.4, a uzyskane wyniki uśredniono. Jako kryterium akceptacji przyjęto, iż %RSD (precyzja) dla każdego stężenia nie powinien być większy niż 15%, natomiast dokładność, wyrażona jako % odzysku, dla każdego ze stężeń powinna mieścić się w przedziale 85 – 115%.

5.1.7.9 Przeprowadzenie testów stabilności

Do przeprowadzenia testów stabilności analitów w matrycy wykorzystano QCs na dwóch poziomach stężeń (niskim oraz wysokim). Stężenia egzogenne analitów w przypadku tioli całkowitych wynosiły: 10,5 i 240,0 nmol/ml osocza dla Cys, 6,0 i 40,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 4,5 i 40,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 2,2 i 40,0 nmol/ml

osocza dla GSH oraz 1,2 i 24,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Dla tioli związanych z białkami, stężenia te były następujące: 19,62 i 240,0 nmol/ml osocza dla Cys, 1,71 i 28,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,87 i 16,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,21 i 2,4 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,27 i 2,4 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Dla tioli wolnych, stężenia egzogenne wynosiły: 9,6 i 160,0 nmol/ml osocza dla Cys, 1,05 i 24,0 nmol/ml osocza Cys-Gly, 0,42 i 8,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,18 i 8,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,3 i 12,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. W przypadku tioli zredukowanych, dla których badano wyłącznie stabilność pochodnych w automatycznym podajniku próbek, egzogenne stężenia analitów były następujące: 5,04 i 24,0 nmol/ml osocza dla Cys, 0,39 i 16,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 0,84 i 8,0 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,3 i 24,0 nmol/ml osocza dla GSH oraz 0,42 i 8,0 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys. Wszystkie analizy przeprowadzono w czasie zero oraz po zastosowaniu warunków poddanych ocenie. Każdą próbkę QCs podzielono na trzy równe części, które następnie przechowywano, poddawano działaniu testowanych czynników i analizowano. Wszystkie analizy przeprowadzono względem krzywych wzorcowych przygotowanych z zastosowaniem świeżych standardów kalibracyjnych. Aby ocenić wpływ wielokrotnego wyjmowania próbek z zamrażarki, stabilność analizowanych związków została oceniona po trzech cyklach zamrażania i rozmrażania, przy czym czas przechowywania próbek w zamrażarce pomiędzy cyklami wynosił co najmniej 12 godzin. Stabilność krótkoterminową oceniono poprzez rozmrażanie próbek QCs na niskim i wysokim poziomie stężeń w temperaturze pokojowej oraz przechowywanie ich na stole laboratoryjnym przez czas odpowiadający czasowi przechowywania próbek osocza w badaniu. Długoterminowa stabilność tioli w próbkach osocza przechowywanych w zamrażarce w temperaturze -80°C została określona dla okresu odpowiadającego czasowi przechowywania próbek w badaniu (dwa lata), z wyjątkiem tioli w postaci zredukowanej, które analizowano natychmiast po pobraniu krwi od ochotników. Dodatkowo zbadano stabilność pochodnych analitów w próbkach osocza przechowywanych w automatycznym podajniku próbek w temperaturze 4°C w czasie 20 godzin. Stabilność roztworów podstawowych i roboczych analizowanych tioli, disiarczaków i IS oceniono w warunkach przechowywania stosowanych podczas analizy próbek badawczych. Ocenę przeprowadzono dla najniższego i najwyższego stężenia tych roztworów w czasie jednego miesiąca.

5.1.7.10 Przeprowadzenie testu zgodności systemu

Ocenę zgodności systemu analitycznego przeprowadzono w oparciu o analizę sześciu powtórzeń QCs o stężeniu egzogennym każdego z analitu wynoszącym: 3,49 nmol/ml osocza dla Cys, 2,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 1,54 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,73 nmol/ml osocza dla GSH, 0,39 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys oraz 30 nmol/ml osocza dla NAC. Parametrami ocenianymi w trakcie przeprowadzania testu zgodności były: N , R_s , T_f , k' oraz t_r . Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SD (%RSD) i porównano z kryteriami akceptacji.

5.1.8 Zielona chemia analityczna – oceny ekologiczności etapu przygotowania próbki w procedurze analitycznej oraz opracowanej metody chromatograficznej

Do oceny ekologiczności procesu przygotowania próbki do analizy chromatograficznej wykorzystano oprogramowanie AGREEprep (wersja 0.91) ^[195], natomiast zieloność opracowanej metody chromatograficznej oceniono za pomocą narzędzia AGREE – Analytical GREENness Calculator (wersja 0.5 beta) ^[196]. Pierwsze z tych narzędzi bazuje na 10 kategoriach oceny, przeliczając wyniki na skalę od 0 do 1. Z kolei drugie opiera swoją ocenę na 12 zasadach zielonej chemii analitycznej, które również przekształcane są na ujednoliconą skalę 0-1. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie piktogramów, które ilustrują końcowy rezultat, efektywność procedury analitycznej dla poszczególnych kryteriów oraz wagi przypisane przez użytkownika. W przeprowadzonych analizach zastosowano domyślne wagi dla wszystkich ocenianych zasad.

5.1.9 Zastosowanie metody do analizy próbek osocza pochodzących od uczestników eksperymentu badawczego

Doświadczenie badawcze oparte było na pomiarze stężenia różnych form redoks wybranych tioli niskocząsteczkowych w próbkach osocza pobranych po upływie kolejno dwóch tygodni, trzech oraz sześciu miesięcy od przyjęcia ostatniej (przypominającej) dawki szczepionki lub uzyskania pozytywnego wyniku testu diagnostycznego w kierunku SARS-CoV-2. Oznaczenia wykonywane były w oparciu o metodę HPLC-FLD po uprzedniej modyfikacji chemicznej analitów za pomocą ABD-F, zgodnie z poniższymi procedurami.

5.1.9.1 Oznaczenie tioli całkowitych

W celu oznaczenia tioli całkowitych, do 100 μl osocza dodano 10 μl roztworu IS (30 nmol/ml osocza NAC) oraz taką samą objętość n-oktanolu. Następnie przeprowadzono redukcję wiązań disiarczkowych z użyciem 20 μl mieszaniny złożonej z 6 mol/l NaBH_4 w 0,1 mol/l NaOH i DMSO (zmieszanych w stosunku objętościowym 2:1) oraz 12 μl 3 mol/l HCl. Po dokładnym wymieszaniu, do próbki dodano 68 μl buforu wg Sörensena-Valbuma o pH 9,5, po czym niezwłocznie przeprowadzono reakcję chemicznej modyfikacji analitów poprzez grupę $-\text{SH}$ z użyciem 50 μl 0,01 mol/l ABD-F. Po 10-minutowej inkubacji w temperaturze 60 $^{\circ}\text{C}$ bez dostępu światła, reakcję przerwano poprzez umieszczenie próbki na lodzie. Próbkę następnie odbiałczano za pomocą 30 μl 3 mol/l PCA i wirowano przy 14000 obr./min przez 10 minut w temperaturze 4 $^{\circ}\text{C}$. Uzyskany roztwór znad osadu przenoszono ostatecznie do bursztynowej fiolki stożkowej do HPLC i poddawano analizie.

5.1.9.2 Oznaczenie tioli związanych z białkami

W celu wytrącenia białek, do próbki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml zawierającej 100 μl osocza dodano 30 μl 3 mol/l PCA, a następnie przeprowadzono wirowanie przy 14000 obr./min przez 10 minut w temperaturze 4 $^{\circ}\text{C}$. Roztwór znad osadu zdekantowano, a pozostały osad białkowy dwukrotnie przemyto używając każdorazowo 25 μl wody dejonizowanej. Po przemyciu osad białkowy zawieszono w 100 μl roztworu wodnego zawierającego 3 nmol/ml osocza NAC, a następnie dodano 10 μl n-oktanolu, 22 μl odczynnika redukującego oraz 15 μl 3 mol/l HCl. Po uwolnieniu całego wodoru, roztwór zmieszano ze 108 μl buforu wg Sörensena-Valbuma o pH 9,5. W kolejnym etapie przeprowadzono chemiczną modyfikację oznaczanych tioli z użyciem 25 μl 0,01 mol/l ABD-F. Próbkę ze znakowanymi analitami inkubowano przez 10 minut w temperaturze 60 $^{\circ}\text{C}$ bez dostępu światła. Po upływie ustalonego czasu reakcji, próbkę przenoszono na lód i zakwaszano za pomocą 20 μl 3 mol/l PCA, po czym wirowano przy 14000 obr./min przez 10 minut w temperaturze 4 $^{\circ}\text{C}$. Ostatecznie, 10 μl roztworu znad osadu poddano analizie HPLC.

5.1.9.3 Oznaczenie tioli wolnych

Zdekantowany roztwór znad osadu pochodzący z zakwaszonej próbki przeznaczonej do oznaczenia tioli związanych z białkami oraz woda z przemywań,

zostały zebrane do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Następnie do próbki dodano 10 μ l IS (10 nmol/ml osocza NAC), 10 μ l n-oktanolu i 22 μ l odczynnika redukującego. W celu neutralizacji kwasowego odczynu roztworu, do mieszaniny dodano 30 μ l 1 mol/l NaOH, a następnie 40 μ l buforu wg Sörensena-Valbuma uzyskując pH 9,5. Chemiczną modyfikację analitów przeprowadzono poprzez dodanie 25 μ l 0,01 mol/l ABD-F i inkubację próbki w temperaturze 60 °C bez dostępu światła. Po upływie 10 minut i ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej na lodzie, próbkę zakwaszano za pomocą 13 μ l 3 mol/l PCA, a następnie poddawano analizie chromatograficznej.

5.1.9.4 Oznaczenie tioli zredukowanych

Do 200 μ l świeżo pobranej krwi niezwłocznie dodano 20 μ l IS w celu uzyskania stężenia końcowego wynoszącego 10 nmol/ml osocza NAC, 70 μ l buforu wg Sörensena-Valbuma (pH 9,5) oraz 50 μ l 0,01 mol/l ABD-F. Próbkę inkubowano w ciemności przez 10 minut w temperaturze 60 °C, a następnie wirowano przy 3500 obr./min w temperaturze 4 °C przez 10 minut. Po rozdzieleniu składników morfotycznych krwi, 170 μ l osocza przeniesiono do nowej probówki typu Eppendorf, a następnie dodano 30 μ l 3 mol/l PCA. Wytrącone białko oddzielono poprzez wirowanie przy 14000 obr./min przez 10 minut w temperaturze 4 °C. Roztwór znad osadu przeniesiono do bursztynowej fiołki stożkowej, po czym 10 μ l próbki wstrzyknięto do systemu HPLC.

5.1.10 Analiza statystyczna

Wszystkie obliczenia, wykresy i analizy statystyczne zostały przeprowadzone za pomocą programu Microsoft Excel 16.0 (Microsoft Corporation) oraz platformy Statistics Kingdom. O ile nie zaznaczono inaczej, wykresy przedstawiają reprezentatywny zestaw wyników uzyskanych dla próbki osocza pochodzącej od jednej, potencjalnie zdrowej osoby. Wszystkie wyniki z etapu walidacji metody przedstawiono jako średnią $\pm$ SD z co najmniej trzech, niezależnych analiz chromatograficznych. Przed przystąpieniem do analiz porównawczych, w pierwszej kolejności oceniono rozkład danych za pomocą testu Shapiro-Wilka. Homogeniczność wariancji pomiędzy grupami oceniono za pomocą testu Levene'a, natomiast sferyczność danych dla powtarzanych pomiarów zweryfikowano testem Mauchly'ego. Porównania pomiędzy grupami badanymi i grupą kontrolną przeprowadzono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji dla powtarzanych pomiarów (*repeated measures ANOVA*). W analizie uwzględniono dwa czynniki: grupę badaną oraz czas. W przypadku wykrycia istotnych różnic zastosowano test post-hoc, tj.

test Bonferroniego w celu identyfikacji grup statystycznie różniących się pod względem analizowanych parametrów. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SD. Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$. Do wyznaczenia równania każdej krzywej kalibracyjnej zastosowano model regresji liniowej oparty o metodę najmniejszych kwadratów.

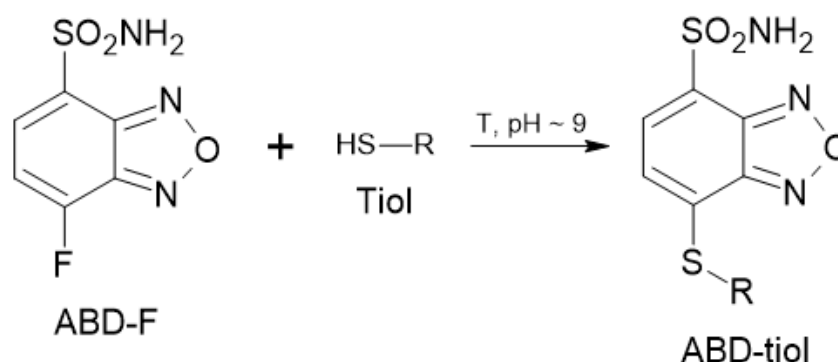
5.2 Wyniki i dyskusja

W niniejszym podrozdziale rozprawy doktorskiej szczegółowo omówiono wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonego eksperymentu medycznego, a także dokonano ich analizy w kontekście dotychczasowej wiedzy naukowej. W pierwszej kolejności zaprezentowano dane otrzymane na podstawie przeprowadzonych prac laboratoryjnych, uwzględniając zarówno wyniki ilościowe, jak i jakościowe, a następnie porównano je z wynikami dostępnymi w literaturze przedmiotu. Ponadto zwrócono uwagę na ewentualne rozbieżności pomiędzy wynikami badań własnych a wcześniejszymi eksperymentami realizowanymi przez innych badaczy. W analizie uwzględniono zarówno statystyczne opracowanie wyników, jak i potencjalne czynniki wpływające na uzyskane rezultaty. Sprawdzone również wpływ zmienności biologicznej oraz ograniczeń metodycznych na uzyskane wyniki końcowych oznaczeń badanych analitów w próbkach rzeczywistych. Omówiono także znaczenie uzyskanych danych w kontekście ich potencjalnych zastosowań klinicznych i diagnostycznych. Dokonano także krytycznej analizy ograniczeń przeprowadzonego eksperymentu oraz przedstawiono sugestie dotyczące dalszych kierunków badań, które mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia badanego zagadnienia.

5.2.1 Opracowanie procedury przygotowania próbek biologicznych do analizy

Proces przygotowania próbki do analizy odgrywa kluczową rolę w uzyskaniu wiarygodnych wyników. Jego głównym celem jest skuteczne rozdzielenie analitów, ich identyfikacja w badanym materiale biologicznym oraz precyzyjne oznaczenie ilościowe przy jednoczesnym selektywnym oddzieleniu ich od pozostałych składników próbki. Odpowiednio zoptymalizowana metoda przygotowania próbki pozwala także na zmniejszenie wpływu matrycy i zanieczyszczeń na układ chromatograficzny. Oznaczanie związków tiolowych w materiale biologicznym stanowi duże wyzwanie ze względu na ich wysoką reaktywność oksydoredukcyjną oraz znaczne różnice w stężeniach metabolicznie spokrewnionych tioli, co może skutkować maskowaniem substancji

śladowych przez dominujące związki. Utrudnieniem jest także brak odpowiednich cech strukturalnych, które pozwalałyby na generowanie sygnałów kompatybilnych z popularnymi detektorami, takimi jak UV-Vis czy FLD, co wymusza konieczność przeprowadzenia chemicznej modyfikacji analitów. Co więcej, związki tiolowe charakteryzują się niską odpornością na wysoką temperaturę, co dodatkowo komplikuje ich analizę. W niniejszym badaniu optymalizowano zarówno warunki redukcji wiązań disiarczkowych, jak i chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F. Schemat równania reakcji ABD-F ze związkiem tiolowym przedstawia Rysunek 45.



Rysunek 45. Ogólny schemat reakcji chemicznej modyfikacji tioli za pomocą ABD-F

5.2.1.1 Optymalizacja redukcji wiązań disiarczkowych

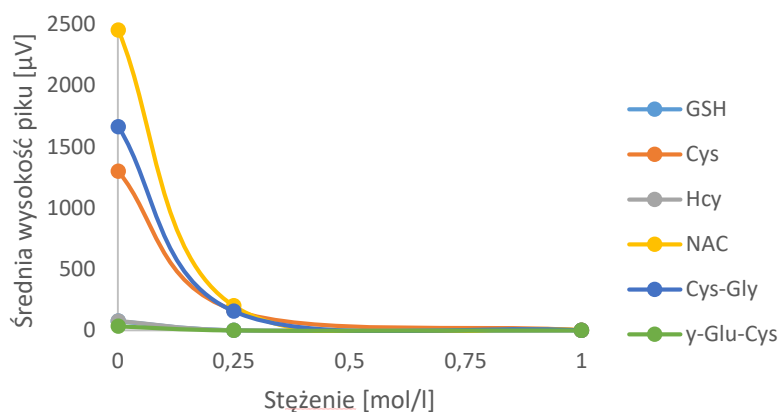
Wybór odpowiedniego reduktora ma kluczowe znaczenie w procesie analizy związków tiolowych. Istnieje wiele grup chemicznych reduktorów, a decyzja o zastosowaniu konkretnego odczynnika redukującego jest ściśle uzależniona od zastosowanej procedury analitycznej, zwłaszcza od rodzaju odczynnika derywatyzującego oraz metody detekcji. Niektóre reduktory mogą reagować z odczynnikami derywatyzującymi, co prowadzi do błędów analitycznych. Jako przykłady wymienić można:

- reduktory zawierające grupę –SH, np. DTT, DTE czy 2-ME, których nadmiar może prowadzić do zaniżenia wyników poprzez tworzenie mieszaniny disiarczków z badanymi tiolami i pochodne z odczynnikiem derywatyzującym;
- trialkilofosfiny, np. tris(hydroksypropylo)fosfina (THP), TCEP czy trifenylofosfina (TPP), które mogą konsumować część odczynników derywatyzujących. Ponadto są drażniące dla oczu i skóry analityka, i choć

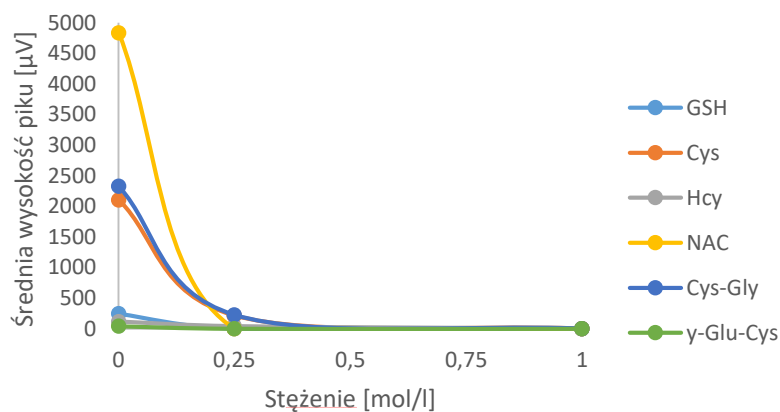
działają w niskich stężeniach, to w przypadku niektórych z nich wymagane jest prowadzenie reakcji w podwyższonej temperaturze;

- borowodorek sodu lub potasu – są silnymi i bardzo reaktywnymi reduktorami. Ze względu na ich niską trwałość roztwory należy przygotowywać bezpośrednio przed użyciem. Mogą powodować trudności w kontrolowaniu pH oraz wykazują tendencję do tworzenia aerozoli. Ich zaletą jest krótki czas redukcji przy wysokich stężeniach.

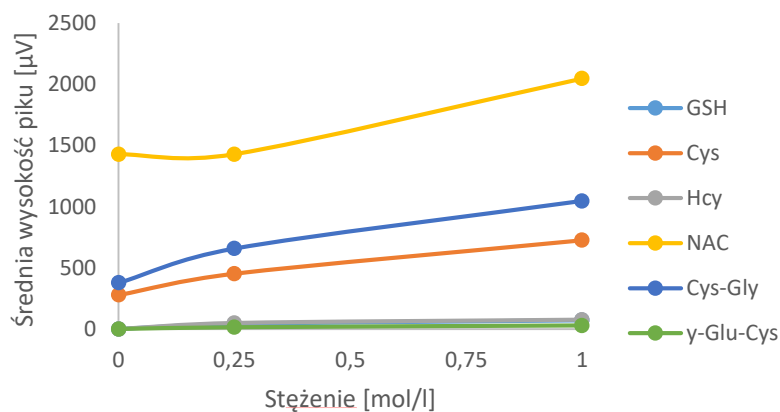
Celem weryfikacji wpływu stężenia reduktora na wyniki analizy, przeprowadzono badania z użyciem trzech różnych stężeń (0,001 mol/l, 0,25 mol/l oraz 1 mol/l) sześciu najczęściej stosowanych reduktorów, tj. DTT, 2-ME, TPP, TCEP, NaBH₄ oraz THP. Jak wynika z przedstawionych wykresów (Rysunki 46 – 51), w większości przypadków wzrost stężenia reduktora powoduje spadek średniej wysokości pików dla wszystkich analizowanych substancji. Wyjątek stanowią TPP oraz NaBH₄, dla których wzrost stężenia prowadzi do zwiększenia wysokości pików tioli. Sugeruje to, że mechanizm redukcji w przypadku tych dwóch substancji może być inny niż w przypadku pozostałych reduktorów lub że dodatkowe czynniki, takie jak szybkość reakcji czy wpływ na równowagę redoks, odgrywają istotną rolę w procesie rozrywania wiązań disiarczkowych. Jak można zaobserwować na chromatogramach (Rysunki 52 i 53), stosowanie wysokich stężeń reduktora powoduje zanik sygnałów analitów lub zakłócenie ich separacji. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że nadmiar środka redukującego zaburza przebieg reakcji chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F. Jedynie bardzo niskie stężenie reduktora (na poziomie 0,001 mol/l) umożliwia skuteczne rozdzielenie i oznaczenie wszystkich tioli w próbce osocza przy użyciu HPLC.



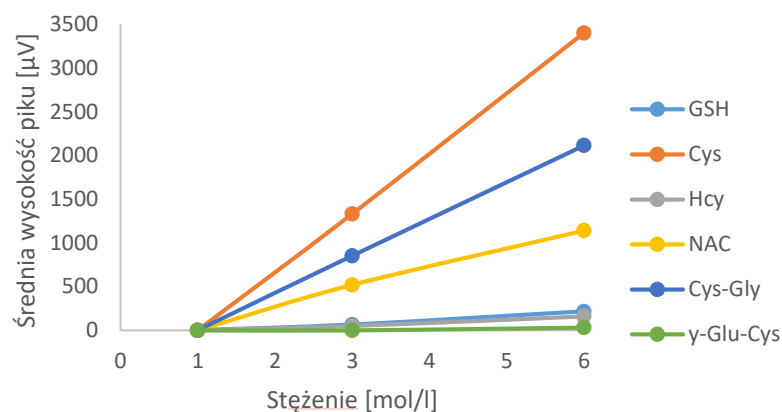
Rysunek 46. Wykres zależności średniej wysokości pików pochodnej tiolu z ABD-F od stężenia DTT użytego do redukcji wiązań disiarczkowych, $n = 3$



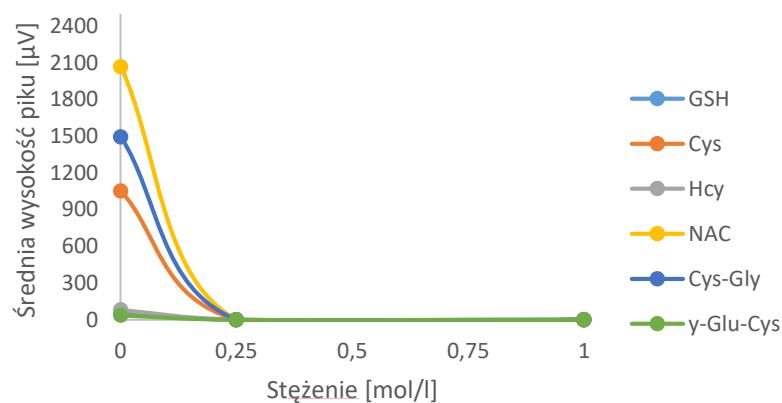
Rysunek 47. Wykres zależności średniej wysokości pików pochodnej tiolu z ABD-F od stężenia 2-ME użytego do redukcji wiązań disiarczkowych, $n = 3$



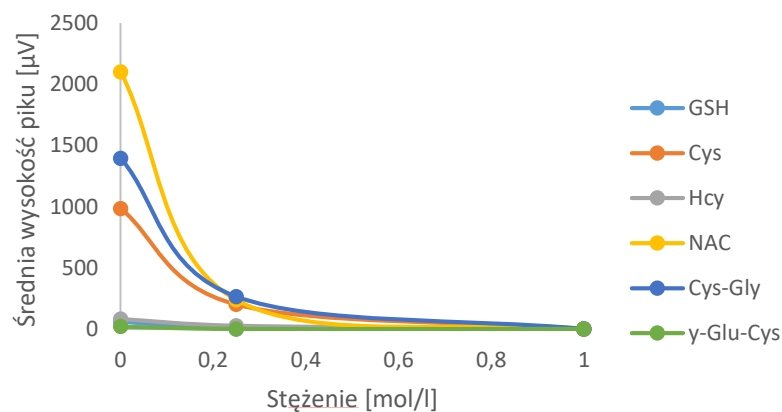
Rysunek 48. Wykres zależności średniej wysokości pików pochodnej tiolu z ABD-F od stężenia TPP użytej do redukcji wiązań disiarczkowych, $n = 3$



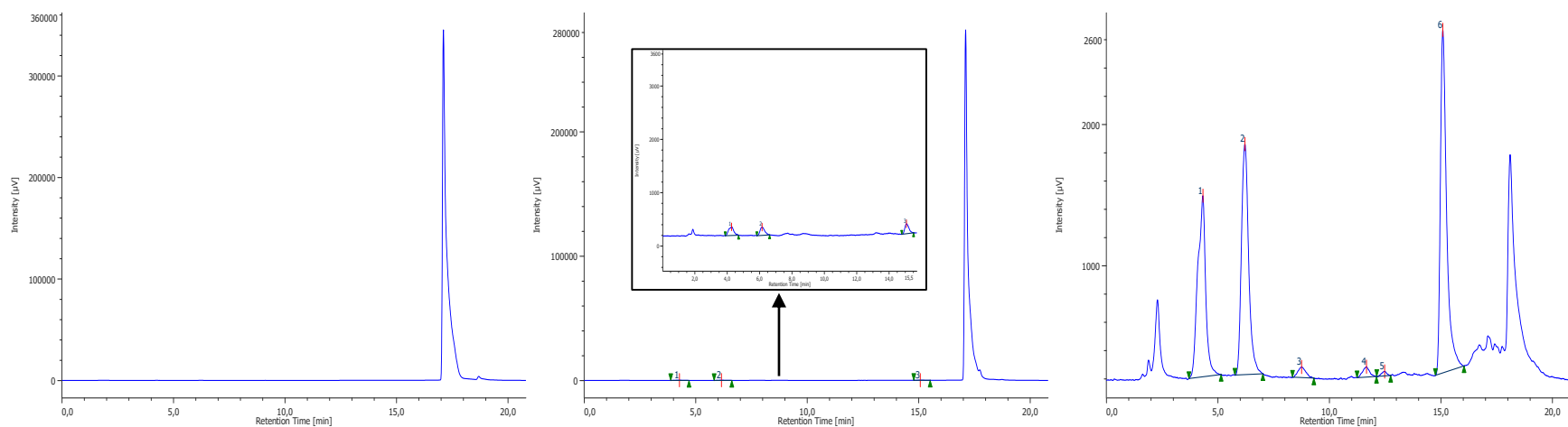
Rysunek 49. Wykres zależności średniej wysokości pików pochodnej tiolu z ABD-F od stężenia NaBH_4 użytego do redukcji wiązań disiarczkowych, $n = 3$



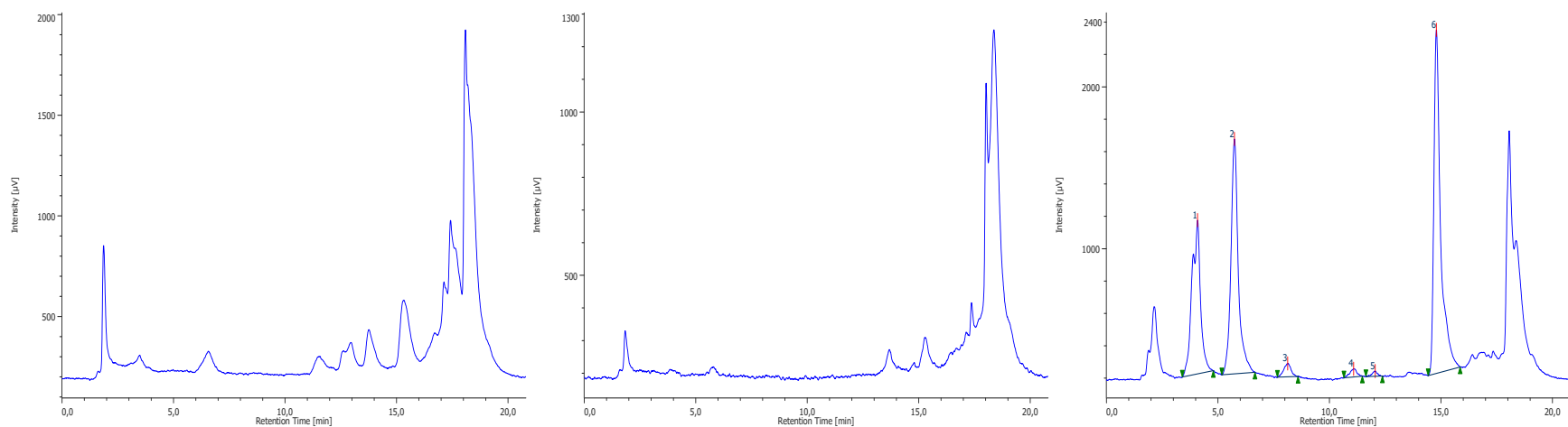
Rysunek 50. Wykres zależności średniej wysokości pików pochodnej tiolu z ABD-F od stężenia THP użytej do redukcji wiązań disiarczkowych, $n = 3$



Rysunek 51. Wykres zależności średniej wysokości pików pochodnej tiolu z ABD-F od stężenia TCEP użytej do redukcji wiązań disiarczkowych, $n = 3$

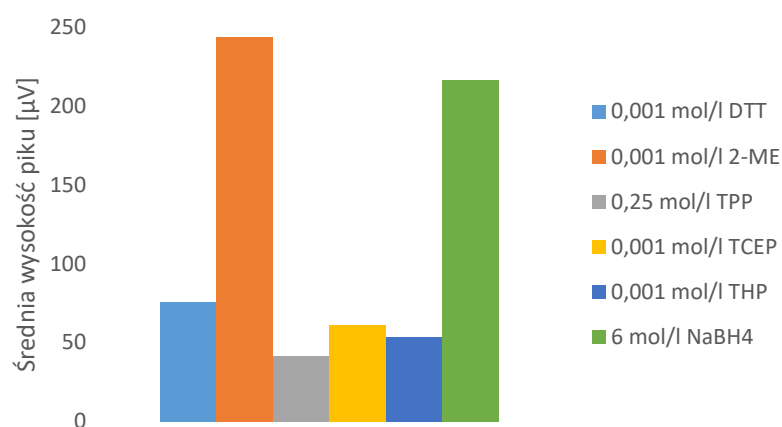


Rysunek 52. Chromatogramy uzyskane dla próbek osocza po redukcji analizowanych tioli za pomocą DTT o stężeniu odpowiednio (od lewej do prawej): 1 mol/l, 0,25 mol/l oraz 0,001 mol/l i derywatywacji z ABD-F

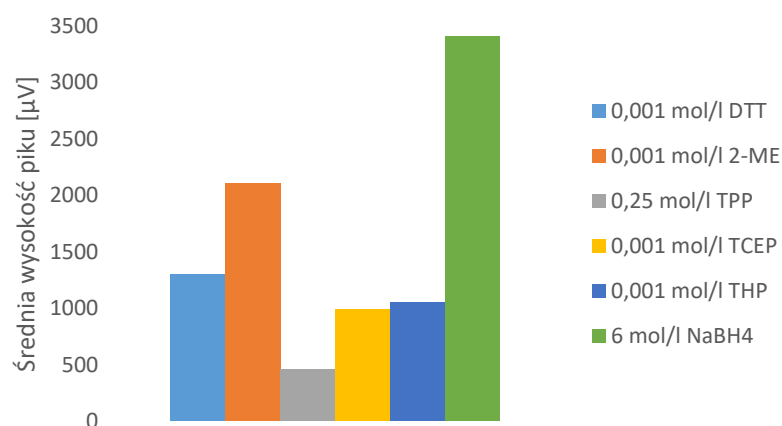


Rysunek 53. Chromatogramy uzyskane dla próbek osocza po redukcji analizowanych tioli za pomocą THP o stężeniu odpowiednio (od lewej do prawej): 1 mol/l, 0,25 mol/l oraz 0,001 mol/l i derywatywacji z ABD-F

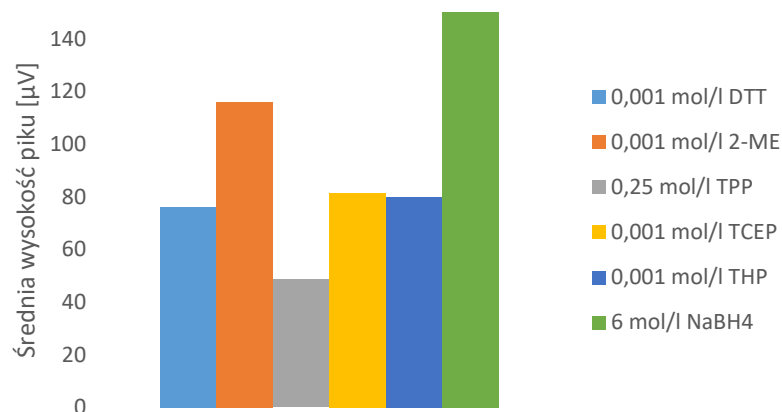
Po sprawdzeniu optymalnych stężeń najczęściej stosowanych odczynników do redukcji wiązań disiarczkowych, ocenie poddano wpływ rodzaju zastosowanego reduktora na wysokość pików poszczególnych analitów. Jak wynika z analizy danych (Rysunki 54 – 59), w przypadku Cys i Hcy, najwyższe piki uzyskano przy zastosowaniu 6 mol/l NaBH₄. Niemniej jednak, dla pozostałych tioli najlepszą wydajność redukcji osiągnięto z użyciem 0,001 mol/l 2-ME, choć w przypadku GSH i Cys-Gly różnice pomiędzy sygnałami uzyskanymi przy redukcji 2-ME i NaBH₄ wynosiły tylko 11 i 9%. Mając na uwadze fakt, że 2-ME wchodzi w reakcje krzyżowe z ABD-F, do dalszych badań wybrano 6 mol/l NaBH₄, a dokładniej jego mieszaninę z DMSO w stosunku objętościowym 2:1.



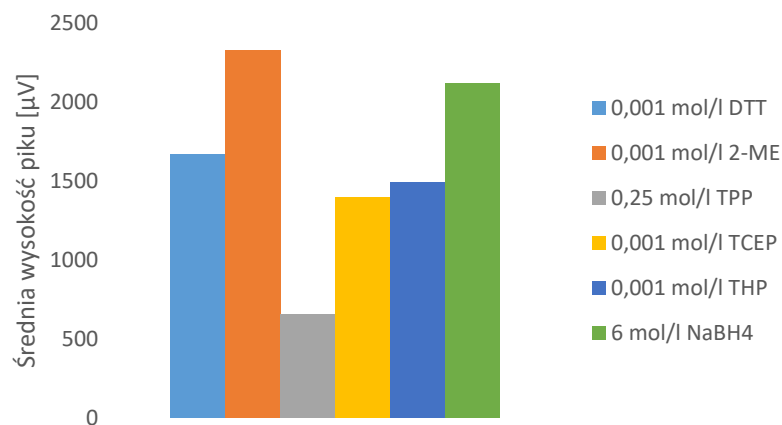
Rysunek 54. Wykres przedstawiający wpływ zastosowanego reduktora na średnią wysokość pików GSH po derywatyzacji z ABD-F, $n = 3$



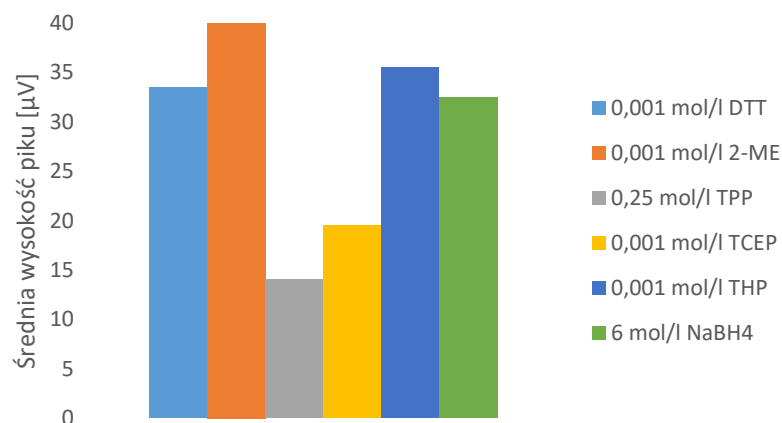
Rysunek 55. Wykres przedstawiający wpływ zastosowanego reduktora na średnią wysokość pików Cys po derywatyzacji z ABD-F, $n = 3$



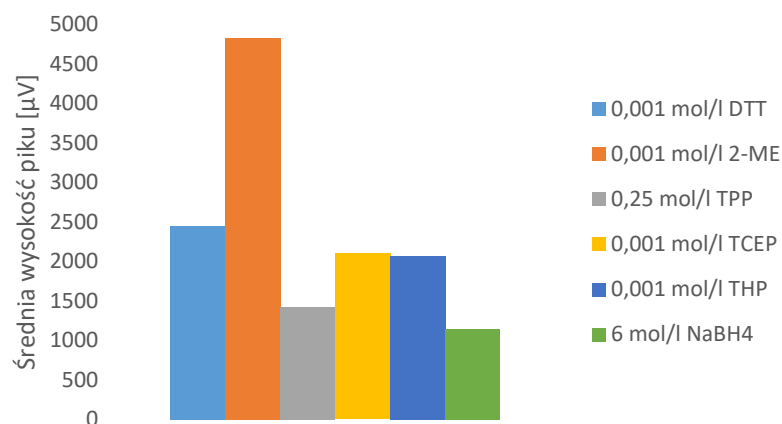
Rysunek 56. Wykres przedstawiający wpływ zastosowanego reduktora na średnią wysokość pików Hcy po derywatywacji z ABD-F, $n = 3$



Rysunek 57. Wykres przedstawiający wpływ zastosowanego reduktora na średnią wysokość pików Cys-Gly po derywatywacji z ABD-F, $n = 3$

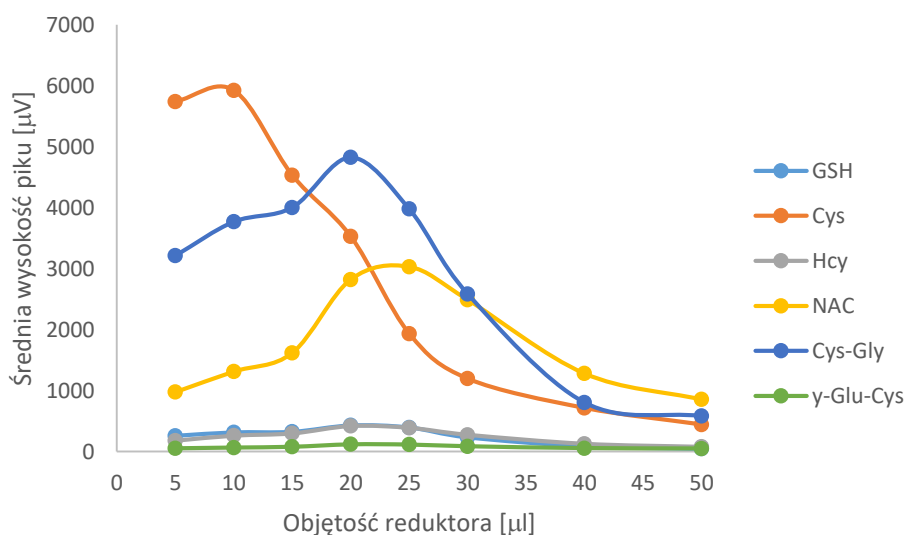


Rysunek 58. Wykres przedstawiający wpływ zastosowanego reduktora na średnią wysokość pików γ -Glu-Cys po derywatywacji z ABD-F, $n = 3$

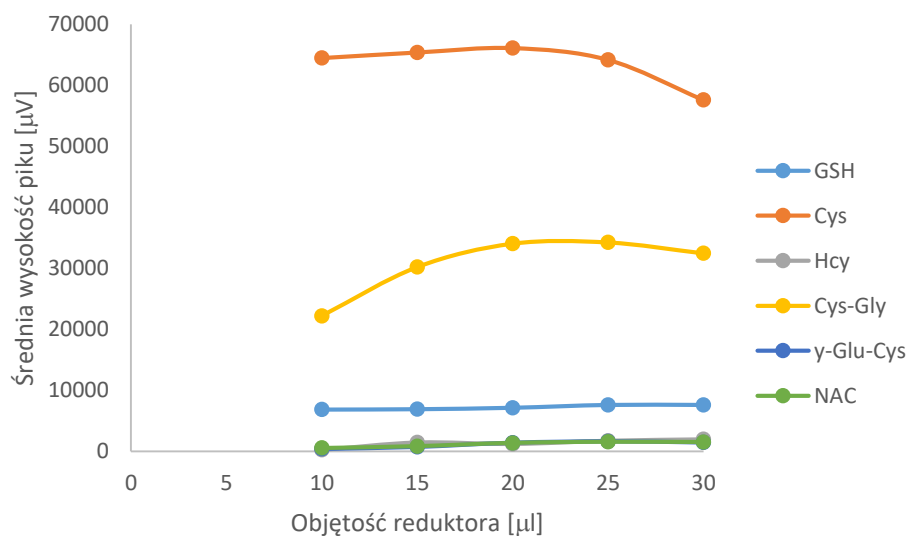


Rysunek 59. Wykres przedstawiający wpływ zastosowanego reduktora na średnią wysokość pików NAC (IS) po derywatywacji z ABD-F, $n = 3$

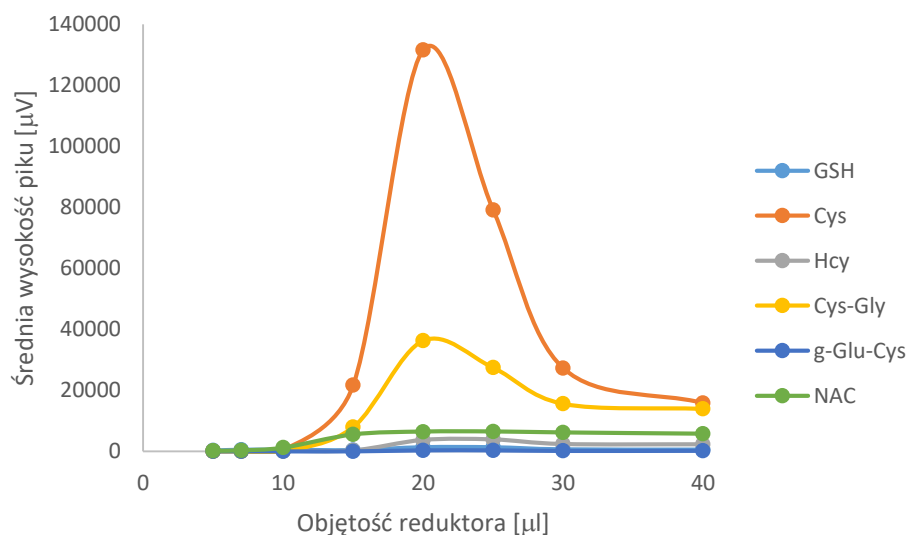
Aby zbadać wpływ objętości mieszaniny redukującej na intensywność uzyskiwanych sygnałów, przeprowadzono eksperyment, w którym do próbki dodawano reduktor w zakresie 5 – 50 μl , w zależności od badanej formy redoks, a następnie analizowano zgodnie z opracowaną procedurą. W przypadku tioli całkowitych, dla większości analizowanych związków, maksymalną wydajność redukcji wiązań disiarczkowych zaobserwowano przy użyciu 20 μl odczynnika redukującego (Rysunek 60), w związku z czym objętość tę przyjęto jako optymalną do dalszych badań. Zarówno dla tioli wolnych (Rysunek 61), jak i związanych z białkami (Rysunek 62), wysokości pików wzrastały wraz z rosnącą objętością dodawanego reduktora, osiągając maksimum dla wartości 22 μl , którą wybrano do dalszych eksperymentów.



Rysunek 60. Wykres zależności średniej wysokości pików analitów od nadmiaru reduktora dla tioli całkowitych, $n = 3$



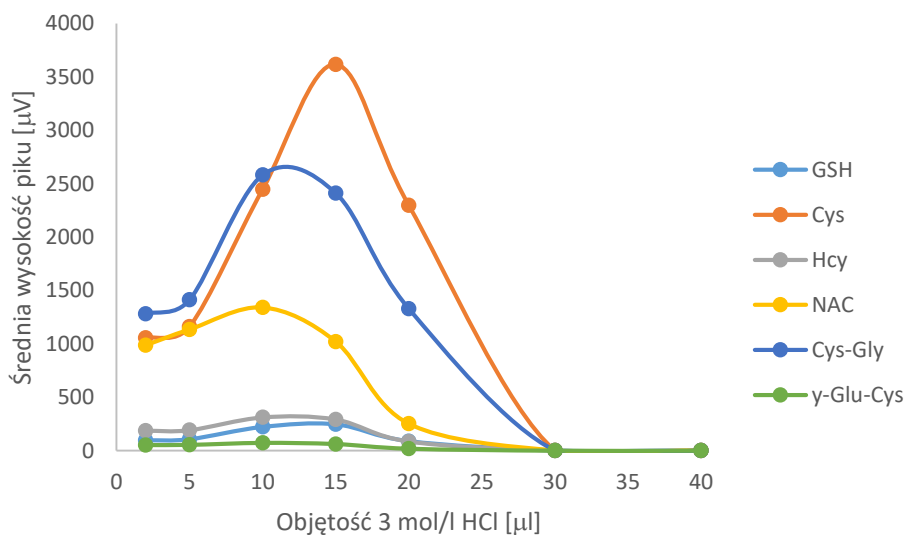
Rysunek 61. Wykres zależności średniej wysokości pików analitów od nadmiaru reduktora dla tioli wolnych, $n = 3$



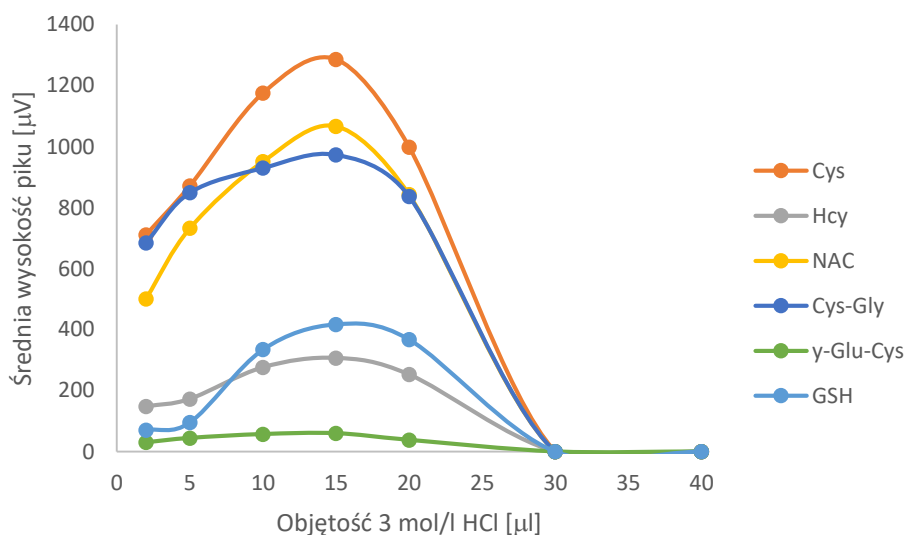
Rysunek 62. Wykres zależności średniej wysokości pików analitów od nadmiaru reduktora dla tioli związanych z białkami, $n = 3$

Dodatkowo przeanalizowano wpływ objętości zastosowanego 3 mol/l HCl w przedziale 2 – 40 µl na wyniki oznaczeń. Jest to istotny aspekt, ponieważ kwas ten służy do usuwania nadmiaru borowodoru sodu, jednak jego zastosowanie prowadzi do znacznego zakwaszenia próbki, co może zakłócać reakcję derywatyzacji, która zachodzi w środowisku zasadowym. W takich warunkach istnieje ryzyko, że użyty bufor nie będzie w stanie skutecznie utrzymać odpowiedniego pH, niezbędnego do chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F. Przeprowadzone badania wykazały, że optymalnym rozwiązaniem jest zastosowanie 12 µl 3 mol/l HCl w przypadku tioli

całkowitych (Rysunek 63) oraz 15 μl – w przypadku tioli związanych z białkami (Rysunek 64), co pozwala na całkowite usunięcie nadmiaru borowodorku sodu, przy jednoczesnym uzyskaniu najwyższego sygnału badanych tioli. Na pierwszym z wykresów można również zaobserwować brak sygnału dla wszystkich analitów przy zastosowaniu objętości 3 mol/l HCl $\geq 30 \mu\text{l}$, co świadczy o zbyt kwaśnym środowisku reakcji, uniemożliwiającym przeprowadzenie badanych tioli w pochodne.

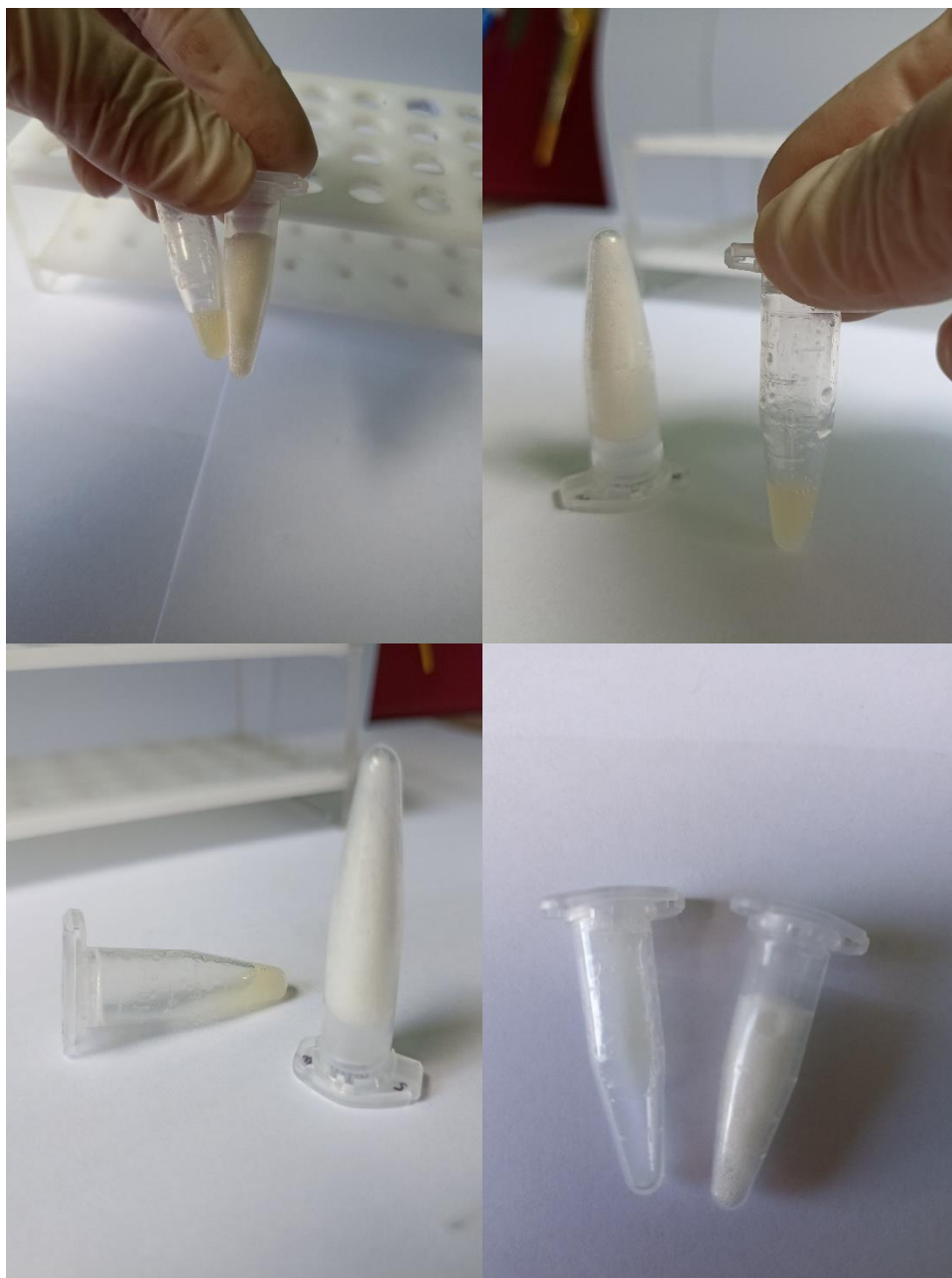


Rysunek 63. Wykres zależności średniej wysokości pików analitów od objętości 3 mol/l HCl dla tioli całkowitych, $n = 3$



Rysunek 64. Wykres zależności średniej wysokości pików analitów od objętości 3 mol/l HCl dla tioli związanych z białkami, $n = 3$

Główną wadą stosowania NaBH_4 jest jego tendencja do tworzenia aerozoli podczas reakcji, w wyniku intensywnego uwalniania wodoru. Zjawisko to można jednak wyeliminować poprzez dodanie środków powierzchniowo-czynnych, takich jak na przykład n-oktanol. W opracowanych procedurach każdorazowo objętość n-oktanolu wynosiła 10 μl , co pozwoliło na eliminację efektu tzw. „ubitej piany” (Rysunek 65).

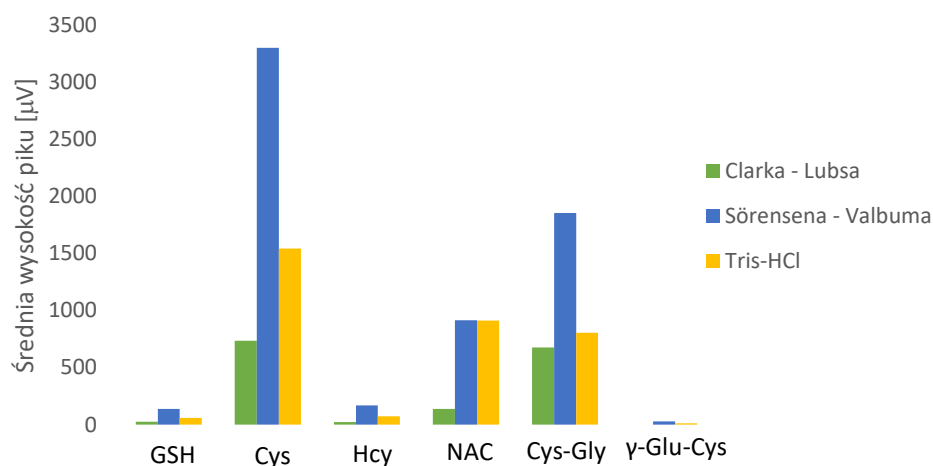


Rysunek 65. Wpływ dodatku środka powierzchniowo-czynnego na reakcję redukcji tioli osocza za pomocą borowodorku sodu

5.2.1.2 Optymalizacja warunków chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F

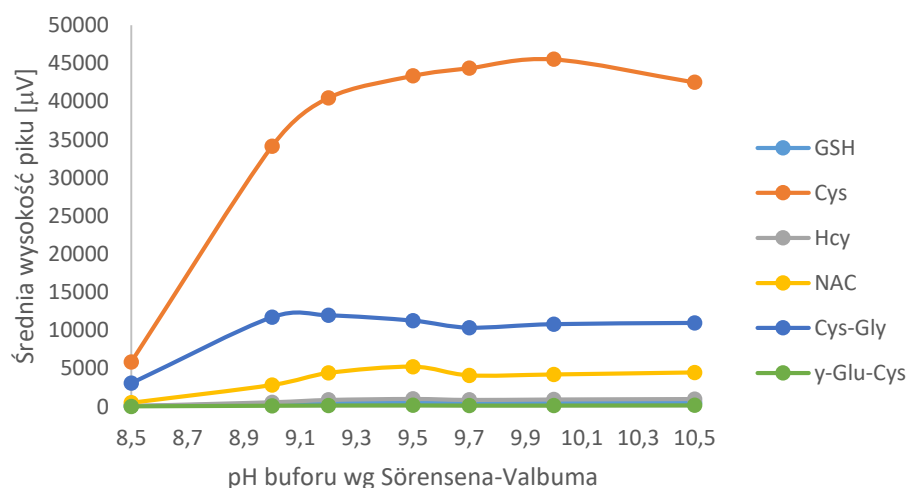
ABD-F jest związkiem chemicznym wykorzystywanym do reakcji z różnymi nukleofilami, takimi jak tiole, aminy, fenole i alkohole ^[252,253]. Jego reaktywność plasuje się między 4-(N,N-dimetyloaminosulfonylo)-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolem (DBD-F) a 4-sulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolem (SBD-F), innymi odczynnikami fluorescencyjnymi z grupy fluorosulfonylobenzofurazanów, co wynika z siły efektu elektronoakceptorowego podstawników w pozycji 7 pierścienia benzofurazanowego. ABD-F wykazuje wysoką selektywność w reakcjach z tiolami, co pozwala na ich czułą i precyzyjną detekcję. Reakcja ABD-F z tiolami przebiega ilościowo już w temperaturze 50 °C i pH 8,0 w ciągu 10 minut, a produkty tej reakcji charakteryzują się intensywną fluorescencją o emisji w zakresie 510 – 520 nm (przy wzbudzeniu 380 – 395 nm). Zaletą ABD-F jest to, że zarówno w formie nieaktywnej, jak i po hydrolizie, nie emituje fluorescencji. Jego zastosowanie obejmuje analizę biologicznych tioli i disiarczków, np. Cys, GSH i Hcy, w próbkach krwi i tkanek. Dzięki wysokiej czułości i selektywności ABD-F pozwala na precyzyjne oznaczanie tych związków metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją fluorescencyjną. Ponadto ABD-F znajduje zastosowanie w oznaczaniu amin, jednak jego reakcja z nimi jest wolniejsza w porównaniu do DBD-F. W niniejszym podrozdziale rozprawy doktorskiej przedstawiono wyniki uzyskane w ramach optymalizacji warunków chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F. Analizowano wpływ różnych buforów, pH środowiska reakcji, a także stężenia i nadmiaru ABD-F na wydajność chemicznej modyfikacji analitów. Ponadto oceniono, jak czas oraz temperatura wpływają na efektywność i wydajność procesu.

W pierwszej kolejności przetestowano trzy bufor, w tym bufor Clarka-Lubsa o pH 9,5, bufor wg Sörensena-Valbuma o pH 9,5 oraz 0,2 mol/l Tris-HCl o pH 9,5. Ocenie poddano ich wpływ na przebieg modyfikacji analitów oraz intensywność uzyskanej fluorescencji, co pozwoliło na wybór optymalnego układu reakcyjnego. Rysunek 66 ilustruje średnią wysokość pików uzyskaną dla każdego analitu w zależności od zastosowanego buforu. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że bufor Sörensena-Valbuma zapewniał największą intensywność fluorescencji, co przekładało się na najwyższe sygnały oznaczanych analitów. W związku z tym został on wybrany jako optymalny i wykorzystany w dalszych etapach badań.



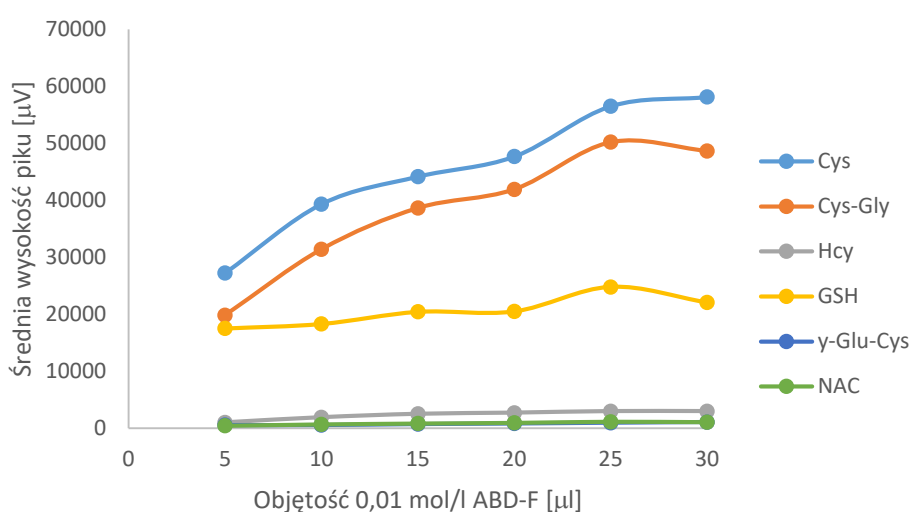
Rysunek 66. Wpływ rodzaju zastosowanego buforu alkalinizującego na wydajność reakcji derywatyzacji, $n = 3$

W kolejnym etapie badań oceniono wpływ pH buforu Sörensena-Valbuma na efektywność upochodnienia tioli za pomocą ABD-F. W tym celu przeprowadzono analizy w trzech powtórzeniach przy wartościach pH: 8,5, 9,0, 9,2, 9,5, 9,7, 10,0 oraz 10,5. Celem było określenie optymalnego pH zapewniającego najwyższą wydajność reakcji oraz intensywność sygnału, co miało kluczowe znaczenie dla czułości i precyzji oznaczeń analitów. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu przedstawiono na Rysunku 67. Optymalne pH buforu alkalinizującego określono na 9,5.

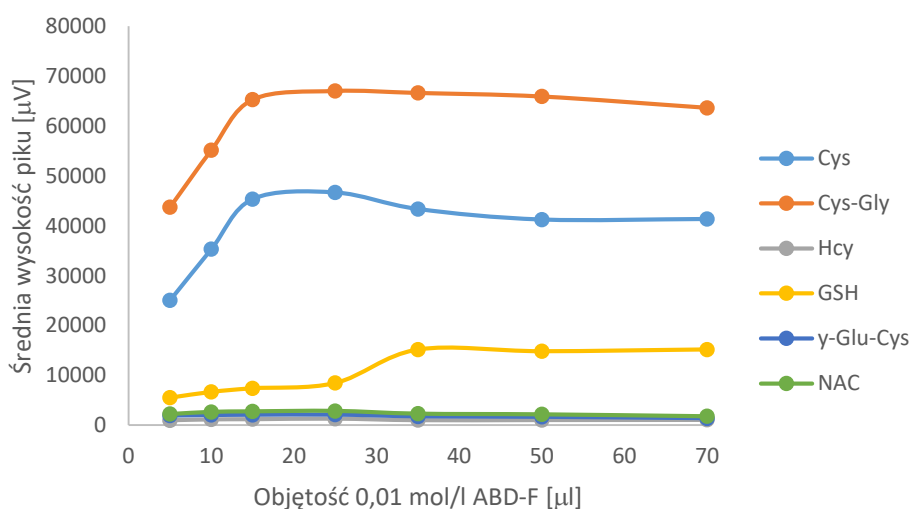


Rysunek 67. Wpływ pH buforu alkalinizującego na wydajność reakcji derywatyzacji, $n = 3$

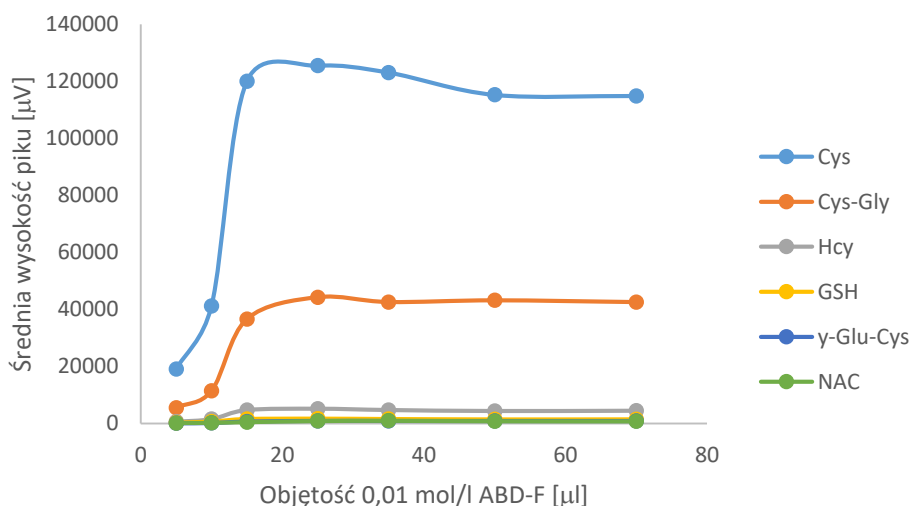
Następnie optymalizowano wydajność reakcji derywatyzacji, uwzględniając stężenie i nadmiar reagenta, a także temperaturę i czas reakcji. Stwierdzono, że efektywność derywatyzacji wzrasta wraz ze zwiększeniem stężenia ABD-F, jednakże mając na uwadze jego rozpuszczalność zdecydowano o wykorzystaniu do badań stężenia 0,01 mol/l. W przypadku tioli zredukowanych, wpływ objętości dodanego ABD-F na intensywność sygnału analitów badano w zakresie 5 – 30 μl , natomiast w przypadku tioli wolnych oraz związanych z białkami w przedziale 5 – 70 μl . Na podstawie uzyskanych wyników (Rysunki 68 – 70), stwierdzono, że optymalna objętość odczynnika derywatyzującego we wszystkich przypadkach wynosiła 25 μl .



Rysunek 68. Wpływ objętości 0,01 mol/l ABD-F na wydajność reakcji derywatyzacji dla tioli zredukowanych, $n = 3$

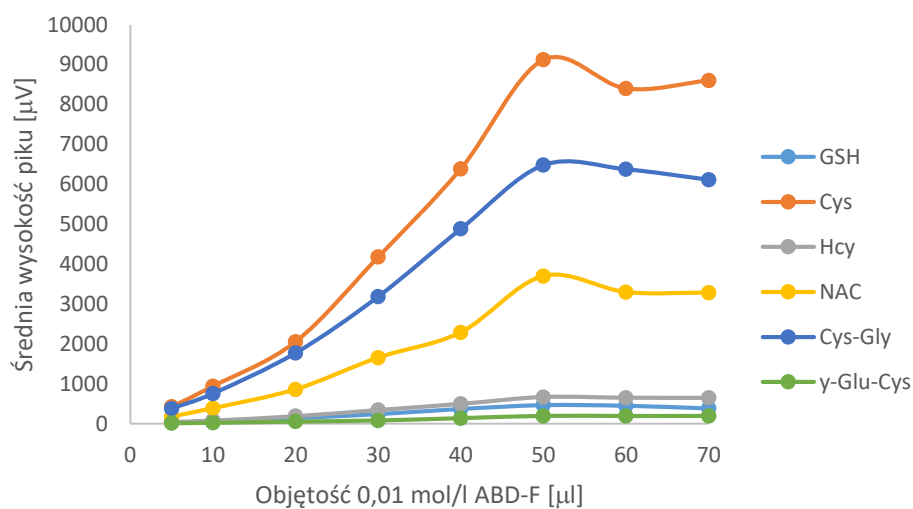


Rysunek 69. Wpływ objętości 0,01 mol/l ABD-F na wydajność reakcji derywatyzacji dla tioli wolnych, $n = 3$



Rysunek 70. Wpływ objętości 0,01 mol/l ABD-F na wydajność reakcji derywatywacji dla tioli związanych z białkami, $n = 3$

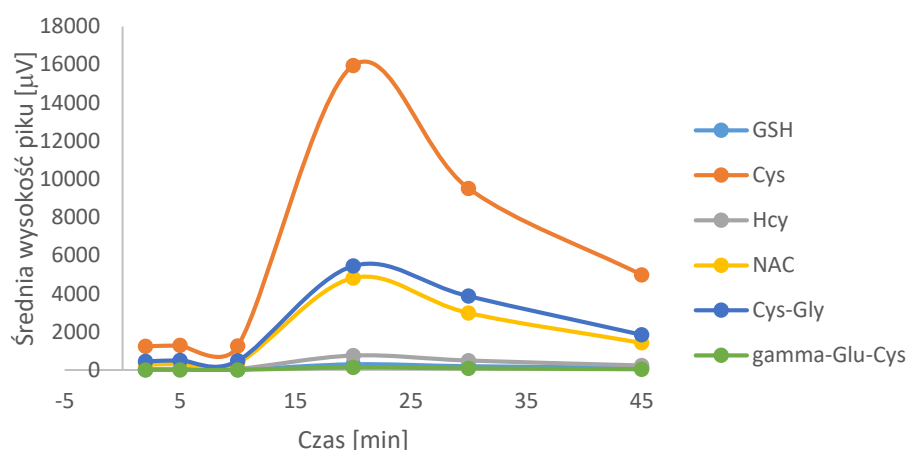
Gdy analizie poddano ten sam parametr w odniesieniu do tioli całkowitych, optymalny wynik uzyskano z zastosowaniem 50 μl 0,01 mol/l ABD-F.



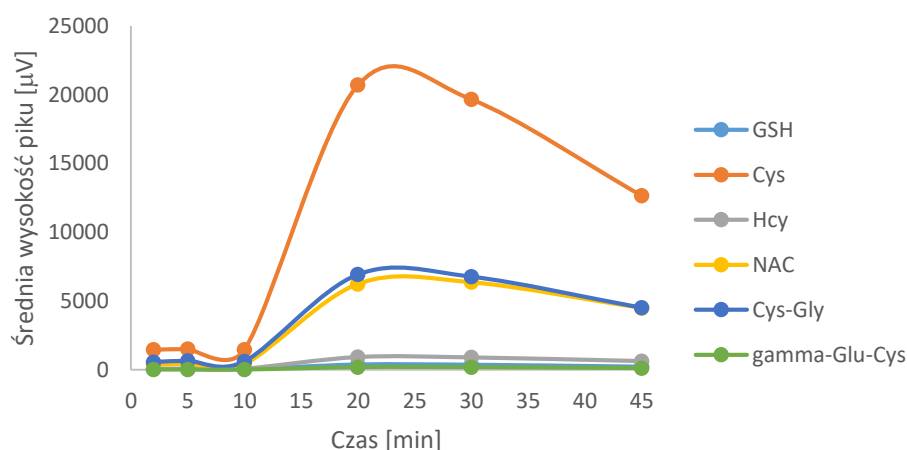
Rysunek 71. Wpływ objętości 0,01 mol/l ABD-F na wydajność reakcji derywatywacji dla tioli całkowitych, $n = 3$

Wpływ czasu reakcji derywatywacji na wysokość pików chromatograficznych pochodzących od analizowanych tioli oceniono, prowadząc proces przez 2 do 45 minut w różnych temperaturach, tj. 4, 25, 40, 60 i 80 °C (Rysunki 72 – 76). W celu natychmiastowego zatrzymania reakcji po upływie określonego czasu, próbki kładziono na lodzie oraz niezwłocznie zakwaszano 3 mol/l PCA. Dla większości temperatur optymalny czas chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F wynosił 10 minut,

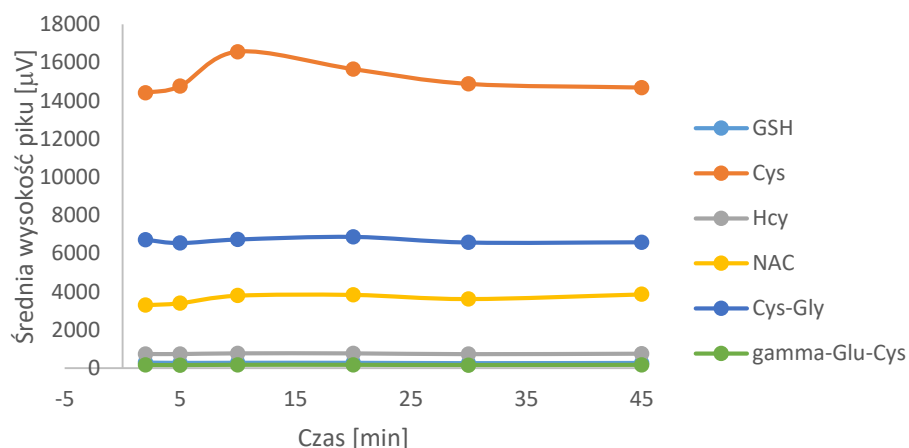
natomiast optymalna temperatura, w której prowadzono reakcję wynosiła 60 °C. Warto zauważyć, że w niższych temperaturach reakcja przebiegała wolniej, co umożliwiało jej przeprowadzenie bez konieczności stosowania dodatkowego sprzętu. Natomiast w podwyższonych temperaturach dłuższy czas derywatywacji prowadził do degradacji pochodnej Cys.



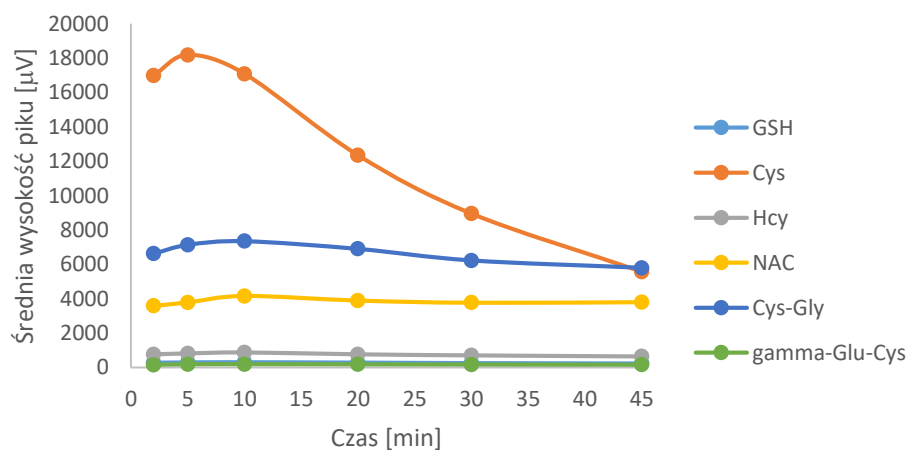
Rysunek 72. Kinetyka chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F w temperaturze 4 °C



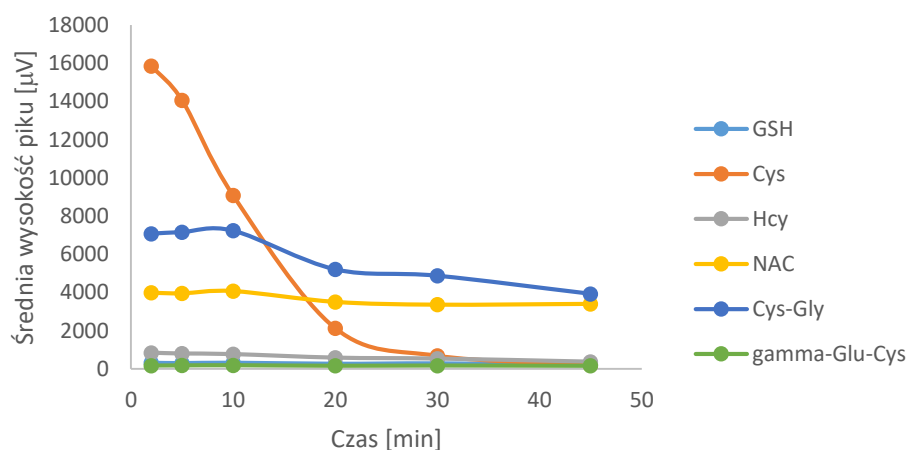
Rysunek 73. Kinetyka chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F w temperaturze 25 °C



Rysunek 74. Kinetyka chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F w temperaturze 40 °C

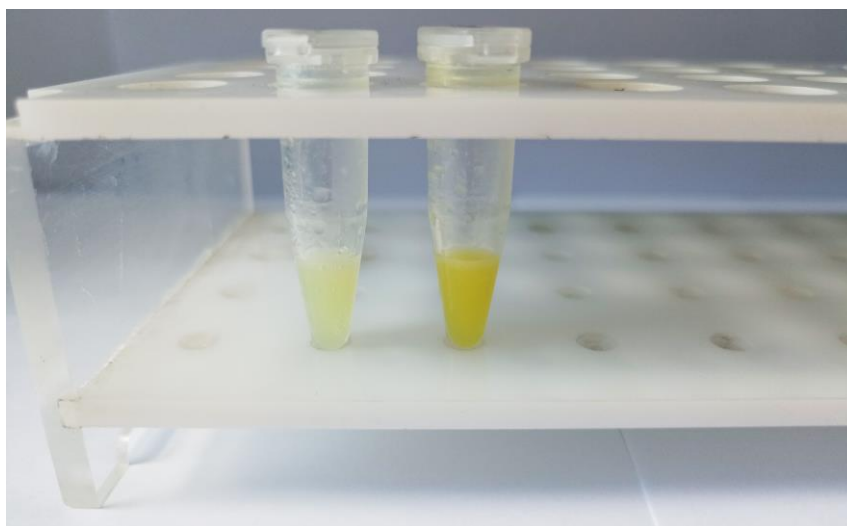


Rysunek 75. Kinetyka chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F w temperaturze 60 °C



Rysunek 76. Kinetyka chemicznej modyfikacji analitów za pomocą ABD-F w temperaturze 80 °C

W zoptymalizowanych warunkach derywatyzacji reakcja przebiegała z najwyższą wydajnością. Zmiany zabarwienia próbki, które stanowią wskaźnik postępu reakcji, są widoczne na Rysunku 77. Dzięki zastosowaniu odpowiednich parametrów, proces derywatyzacji osiągnął maksymalną efektywność, co potwierdzają wyniki eksperymentalne.



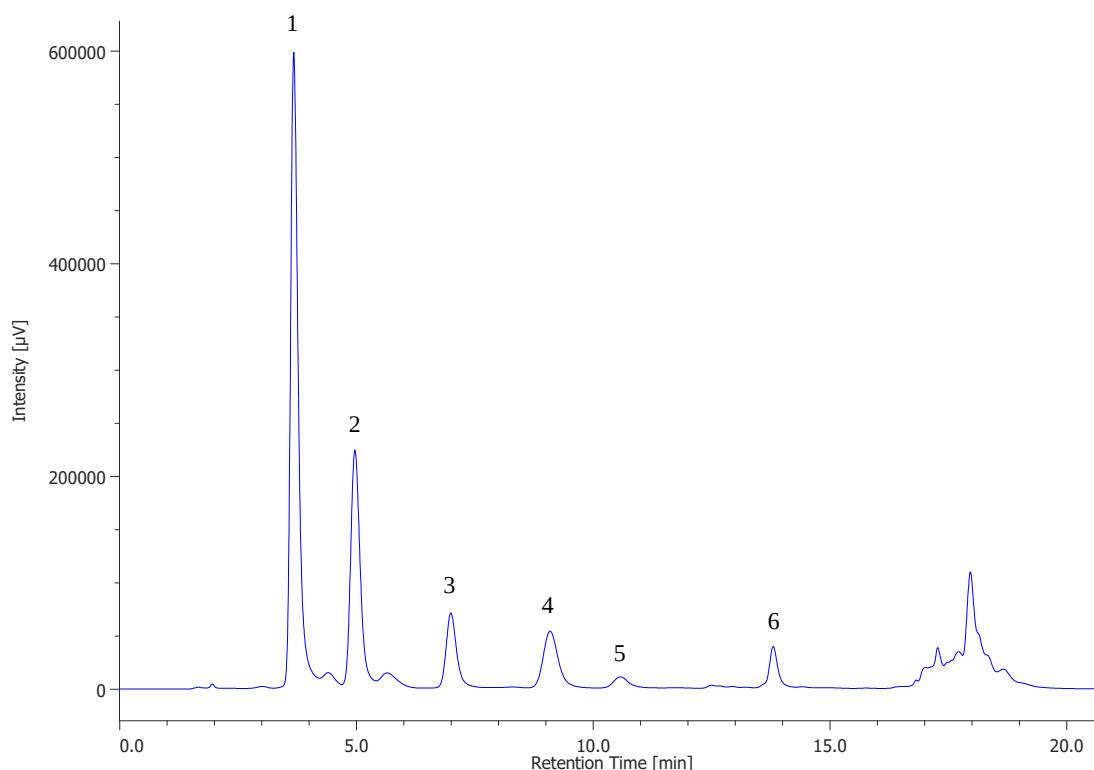
Rysunek 77. Zabarwienie próbki osocza przed i po modyfikacji chemicznej analitów za pomocą ABD-F

Podczas analizy materiału biologicznego należy pamiętać o usunięciu białek z próbki, ponieważ ich obecność w systemie HPLC powoduje utratę wydajności kolumny, nieprzystosowanej do analizy białek, oraz wzrost ciśnienia układu, co może z kolei prowadzić do awarii urządzenia. W przeprowadzonych testach białka zostały oddzielone od analitów poprzez ich wytrącenie za pomocą 3 mol/l PCA. Zakwaszenie roztworu poniżej punktu izoelektrycznego powoduje nadanie białkom ładunku dodatniego i tworzenie nierozpuszczalnych soli z kwasem. Po wytrąceniu białek, próbki poddano wirowaniu przez 10 minut przy 14000 obr./min w temperaturze 4 °C, a uzyskane roztwory z nad osadu zostały poddane analizie. Optymalna objętość 3 mol/l PCA wynosiła 30 µl.

5.2.2 Optymalizacja warunków chromatograficznych

W celu optymalizacji warunków chromatograficznego rozdzielania otrzymanych pochodnych tioli, przeprowadzono wstępne eksperymenty obejmujące testowanie różnych faz stacjonarnych, składów fazy ruchomej, prędkości jej przepływu oraz temperatury separacji. Kolumna XBridge® C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) firmy Waters zapewniła lepsze rozdzielanie analitów niż kolumny Zorbax SB-C18 (4,6 × 150 mm, 5 µm) firmy Agilent oraz ReproShell Biphenyl (4,6 × 150 mm, 5 µm) firmy Dr. Maisch. Podczas etapu optymalizacji metody zastosowano najczęściej wykorzystywane w RP-HPLC rozpuszczalniki organiczne, takie jak MeOH, ACN i tetrahydrofuran (THF) [151,155,157,158,178,254–257]. Dodatkowo przetestowano kwas octowy, kwas cytrynowy, TFA oraz TCA w różnych stężeniach i wartościach pH, stosując zarówno elucję gradientową, jak i izokratyczną. Zastosowanie ACN lub THF skutkowało niezadowalającym rozdzieleniem analitów ze względu na niewystarczającą retencję pochodnych na kolumnie. Większość aminotiole została skutecznie rozdzielona przy użyciu fazy ruchomej zawierającej 0,1% TFA i MeOH. Zaobserwowano ponadto znaczną wrażliwość czasów retencji na zmiany pH fazy ruchomej, co podkreślało znaczenie precyzyjnej i powtarzalnej procedury jej przygotowania. Ocenie poddano także wpływ prędkości przepływu eluentu badanej w zakresie 0,5 – 1,5 ml/min na separację analitów oraz kształt pików. Za optymalną wartość wybrano 1 ml/min ze względu na dobrą rozdzielczość, stosunkowo krótki czas analizy oraz optymalną szerokość pików wszystkich badanych analitów. W przypadku RP-HPLC retencja związków zazwyczaj maleje wraz ze wzrostem temperatury, w związku z czym w niektórych przypadkach wskazane jest określenie optymalnej temperatury separacji. W ramach przeprowadzonych badań sprawdzono wpływ temperatury kolumny w zakresie 20 – 40 °C na rozdzielczość pików oraz czasy retencji wszystkich analitów, a uzyskane zmiany zarejestrowano na chromatogramach. Uzyskane wyniki pozwoliły wysunąć wniosek, że temperatura separacji wynosząca 25 °C była optymalna i zapewniała najkrótszy czas analizy przy zachowaniu dobrej rozdzielczości. Ustalone eksperymentalnie warunki chromatograficzne zostały szczegółowo opisane w podrozdziale 5.1.4. Reprezentatywny chromatogram uzyskany dla tioli całkowitych analizowanych w próbce osocza krwi ludzkiej pobranej od zdrowego ochotnika przedstawiono na Rysunku 78. W opracowanych warunkach pochodne Cys, Cys-Gly, Hcy, GSH, γ-Glu-Cys oraz IS eluowały po odpowiednio: 3,67, 4,97, 6,99, 9,08 i 10,57 min. Czas analizy wynosił 21

minut, co w porównaniu z metodą opracowaną przykładowo przez Tokgöz i in. [258], skutkuje mniejszą oszczędnością czasu i większym zużyciem fazy ruchomej, jednak fakt ten wynika z oznaczenia w niniejszej metodzie większej liczby analitów w jednym cyklu analitycznym (większa przepustowość opracowanej metody) i zastosowaniu NAC jako IS. Podobny czas analizy uzyskali jednak Santa i in. [259] oraz Steele i in. [260], co daje porównywalne wyniki z opracowaną metodologią.



Rysunek 78. Reprezentatywny chromatogram uzyskany dla aminotioili znakowanych ABD-F w próbce osocza ludzkiego: 1 – Cys, 2 – Cys-Gly, 3 – Hcy, 4 – GSH, 5 – γ -Glu-Cys, 6 – IS; sposób przygotowania próbki do analizy opisano w podrozdziale 5.1.9.1, natomiast warunki chromatograficzne w podrozdziale 5.1.4

5.2.3 Walidacja metody

Walidację metody analitycznej przeprowadzono zgodnie z wytycznymi ICH [147,174], co umożliwiło ocenę jej kluczowych parametrów pod kątem zgodności z wymaganymi kryteriami akceptacji. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie selektywności, liniowości, precyzji, dokładności oraz LOD i LOQ metody, a także jej odporności na zmienne warunki analityczne. Dodatkowo, oceniono wpływ matrycy, przeniesienie próbki oraz stabilność analitów, co miało kluczowe znaczenie dla zapewnienia powtarzalności i wiarygodności analiz. W niniejszej części rozprawy

doktorskiej szczegółowo przedstawiono uzyskane wyniki oraz dokonano ich interpretacji.

5.2.3.1 Selektywność

Analiza chromatogramów uzyskanych dla niewzbogaconych próbek osocza pobranych od sześciu różnych dawców wykazała brak istotnych sygnałów pochodzących od substancji zakłócających w czasach retencji oznaczanych tioli oraz IS. W żadnym przypadku odpowiedź sygnału przypisanego substancji interferującej nie przekroczyła 20% odpowiedzi analitu na poziomie LOQ oraz 5% sygnału IS, co potwierdza spełnienie kryteriów akceptacji stawianym metodom bioanalitycznym ^[174]. Ponadto zaobserwowano proporcjonalny wzrost sygnałów analitów w próbkach osocza wzbogaconych w porównaniu do odpowiedzi w próbkach o endogennej zawartości badanych związków, przy jednoczesnym zachowaniu stabilnych czasów retencji i kształtu pików chromatograficznych. W większości przypadków nie zaobserwowano dodatkowych pików w sąsiedztwie analitów, co potwierdza brak interferencji matrycowych. Analiza selektywności w próbkach lipemicznych wykazała brak wpływu podwyższonego poziomu trójglicerydów na jakość rozdzielania chromatograficznego. Kształt i czasy retencji pików pozostały niezmienione, a poziom szumów był zgodny z obserwacjami w próbkach kontrolnych. Fakt ten niewątpliwie stanowi zaletę metody, która z powodzeniem może być stosowana do analizy próbek pochodzących od pacjentów z wysokim profilem lipidowym. W przypadku próbek hemolizowanych także nie zaobserwowano istotnych różnic w czasach retencji i kształcie pików analitów oraz IS, co wskazuje na brak wpływu interferencji wynikających z procesu rozpadu erytrocytów na rozdzielanie chromatograficzne. Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdzają wysoką selektywność opracowanej metody HPLC-FLD. Brak istotnych interferencji w chromatogramach analizowanych próbek wskazuje na zdolność metody do jednoznacznego różnicowania analitów tiolowych od składników matrycy biologicznej.

5.2.3.2 Zakres liniowości, granice wykrywalności i oznaczalności

Analizę regresji liniowej dla badanych aminotiolu osocza przeprowadzono metodą wzorca wewnętrznego. Krzywe kalibracyjne skonstruowano na podstawie stosunku sygnału analitu do sygnału IS w odniesieniu do znanych stężeń badanych związków. Do wyznaczenia równań krzywych kalibracyjnych zastosowano model regresji liniowej

oparty na metodzie najmniejszych kwadratów, przy czym próbki ślepe i zerowe nie były uwzględniane w analizie regresji. Precyzję dopasowania modelu oceniano na podstawie współczynnika determinacji oraz kryteriów precyzji i dokładności dla każdego poziomu stężenia. Każde równanie krzywej wzorcowej oraz odpowiadający jej współczynnik R^2 zostały przedstawione w Tabeli 10, wraz z zakresem liniowości dla wszystkich badanych analitów. We wszystkich przypadkach zaobserwowano dobrą liniowość, przy współczynnikach R^2 przekraczających 0,99, co wskazuje na silną korelację między stężeniem analitu a odpowiedzią detektora FLD. Ponadto otrzymane zakresy liniowości dla poszczególnych form tioli obejmowały szeroki przedział stężeń, co pozwala na precyzyjne oznaczanie zarówno niskich, jak i wysokich stężeń tych związków w próbkach osocza oraz świadczy o wysokiej przydatności metody do analizy matryc o dużej zmienności biologicznej. Odzysk wstecznie obliczonych stężeń każdego standardu kalibracyjnego mieścił się w zakresie 85,61 – 110,09%, co wskazuje na wysoką dokładność metody. To samo dotyczy wartości %RSD, które mieściły się w akceptowalnym przedziale $\pm 15\%$ stężenia nominalnego, potwierdzając precyzję oznaczeń. Podczas procesu walidacji wyznaczono również LOD i LOQ dla każdego analitu z uwzględnieniem ich form występowania. Limity detekcji i oznaczalności określono na podstawie odchylenia standardowego wyrazu wolnego oraz nachylenia wygenerowanych krzywych kalibracyjnych. LOD dla różnych form redoks tioli była niższa niż 2,2 nmol/ml, natomiast LOQ mieściły się w zakresie od 0,07 do 6,54 nmol/ml (Tabela 10). Granice wykrywalności dla adduktów ABD-tiol wyznaczone przez zespół Yoyo'oka^[261] jako $S/N = 2$ dla Cys, Hcy, GSH oraz NAC wynosiły odpowiednio: 0,90, 0,22, 0,19, 0,26 pmol. Wartości te zostały jednak wyznaczone z użyciem wzorców, a nie próbek rzeczywistych. Z kolei, Megan L. Steele^[260] uzyskiwała wartości LLOQ dla wszystkich analizowanych tioli całkowitych wynoszące: 6,3 nmol/ml dla Cys oraz 3,1 nmol/ml dla Cys-Gly, Hcy i GSH, które są gorsze w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla metody opracowanej w ramach niniejszej pracy. W metodzie opartej na pomiarze Hcy oraz innych tioli w osoczu za pomocą elektroforezy kapilarnej CE z zastosowaniem ABD-F, otrzymane wartości LOD ($S/N = 3$) wynosiły: 0,5 nmol/ml dla Hcy, 1,0 nmol/ml dla GSH oraz 2,0 nmol/ml dla Cys^[262], co w porównaniu z opracowaną metodą daje porównywalny wynik dla Hcy oraz wskazuje na dużo gorszą granicę detekcji metody CE dla GSH oraz Cys. Opracowana metoda umożliwia wykrycie i oznaczenie tioli po derywatyzacji z ABD-F w próbkach osocza na niskich poziomach stężeńowych,

o czym świadczą wartości LOD i LOQ porównywalne lub lepsze niż te przedstawione w literaturze ^[260–263].

Tabela 10. Dane walidacyjne dla metody oznaczania wybranych form redoks niskocząsteczkowych tioli osocza z zastosowaniem przedkolumnowej modyfikacji chemicznej analitów ABD-F

Analit	Równanie regresji	R ²	Zakres liniowości (nmol/ml)	RSD (%)		Odzysk (%)		LOD (nmol/ml)	LOQ (nmol/ml)
				Min.	Max.	Min.	Max.		
Tiole całkowite									
Cys	y = 0,0611x + 9,2283	0,9999	3,49 – 300,0	1,34	14,48	90,20	102,60	1,15	3,49
Cys-Gly	y = 0,3002x + 8,3957	0,9989	2,00 – 50,0	2,07	12,04	94,02	106,65	0,66	2,00
Hcy	y = 0,0964x + 0,454	0,9994	1,54 – 50,0	0,86	8,24	88,16	105,99	0,51	1,54
GSH	y = 0,0628x + 0,0585	0,9988	0,73 – 50,0	1,99	10,49	88,11	100,31	0,24	0,73
γ-Glu-Cys	y = 0,0307x + 0,0959	0,9957	0,39 – 30,0	87,69	104,19	87,69	104,19	0,13	0,39
Tiole zredukowane									
Cys	y = 0,1239x + 0,0043	0,9991	1,68 – 30,0	2,35	7,14	87,85	99,37	0,56	1,68
Cys-Gly	y = 0,5569x + 0,2138	0,999	0,13 – 20,0	3,34	12,97	85,61	102,26	0,04	0,13
Hcy	y = 0,0765x + 0,0133	0,9998	0,28 – 10,0	3,06	7,12	88,19	103,44	0,09	0,28
GSH	y = 0,121x + 0,1315	0,9997	0,10 – 30,0	2,04	8,72	91,31	109,98	0,03	0,10
γ-Glu-Cys	y = 0,0721x + 0,0031	0,9987	0,14 – 10,0	0,91	8,62	86,85	110,09	0,04	0,14
Tiole wolne									
Cys	y = 0,0235x + 1,5754	0,9999	3,20 – 200,0	0,60	8,41	91,82	102,24	1,06	3,20
Cys-Gly	y = 0,6215x + 1,875	0,9999	0,35 – 30,0	1,05	11,57	87,53	102,60	0,12	0,35
Hcy	y = 0,0373x + 0,0571	0,9996	0,14 – 10,0	0,65	5,13	92,85	106,75	0,05	0,14
GSH	y = 0,0609x + 0,1142	0,9999	0,06 – 10,0	0,77	9,37	95,11	107,35	0,02	0,06
γ-Glu-Cys	y = 0,113x + 0,0871	0,9999	0,10 – 15,0	3,29	12,69	96,71	103,95	0,03	0,10
Tiole związane z białkami									
Cys	y = 6,2408x + 242,95	0,9999	6,54 – 300,0	1,63	7,84	95,49	106,16	2,16	6,54
Cys-Gly	y = 9,8064x + 96,242	0,9999	0,57 – 35,0	1,61	13,36	94,13	101,66	0,19	0,57
Hcy	y = 4,986x + 5,6764	0,9998	0,29 – 20,0	1,17	10,42	92,73	103,22	0,09	0,29
GSH	y = 7,5318x + 5,8303	0,9997	0,07 – 3,0	1,70	9,32	96,83	107,08	0,02	0,07
γ-Glu-Cys	y = 2,4302x + 3,0612	0,9999	0,09 – 3,0	1,27	12,78	90,40	102,05	0,03	0,09

5.2.3.3 Precyzja i dokładność metody

Precyzja i dokładność metody analitycznej (Tabela 11) zostały ocenione na podstawie wyników analiz próbek QC na czterech poziomach stężeń w zakresie krzywej kalibracyjnej, których sposób przygotowania opisano w podrozdziale 5.1.7.1. W celu określenia precyzji i dokładności wewnątrzseryjnej, każdą próbkę analizowano pięciokrotnie w jednym cyklu analitycznym. Precyzję i dokładność międzyseryjną oceniono na podstawie analiz wykonanych w trzech niezależnych cyklach analitycznych przeprowadzonych w ciągu trzech kolejnych dni roboczych. Ze względu na fakt, iż tiole są związkami endogennymi, ich stężenia wyznaczono w próbkach ślepych, a uzyskane wartości odjęto od obliczonych stężeń analitów wykrytych w próbkach wzbogaconych. W celu zapewnienia wysokiej jakości wyników, analizy prowadzono względem krzywych wzorcowych przygotowanych przy użyciu świeżych standardów kalibracyjnych. Precyzję wyrażono jako %RSD, natomiast dokładność jako % odzysku analitu. W przypadku tioli całkowitych precyzja wewnątrzseryjna mieściła się w zakresie od 1,11% do 15,51%, natomiast precyzja międzyseryjna wynosiła od 0,66% do 15,18%. Dokładność w tych próbkach wahała się od 86,47% do 103,44% dla pomiarów wewnątrzseryjnych oraz od 83,50% do 102,17% dla pomiarów międzyseryjnych. Dla tioli zredukowanych precyzja wewnątrzseryjna wynosiła od 1,10% do 11,99%, a międzyseryjna od 0,25% do 11,40%. Dokładność w tych próbkach zawierała się w przedziale 82,19% – 104,92% dla pomiarów wewnątrzseryjnych oraz 90,59% – 119,43% dla pomiarów międzyseryjnych. W przypadku tioli wolnych precyzja wewnątrzseryjna wynosiła od 0,43% do 10,65%, a międzyseryjna od 0,66% do 11,26%. Dokładność mieściła się w zakresie 81,67% – 100,78% dla pomiarów wewnątrzseryjnych oraz 86,11% – 104,70% dla międzyseryjnych. Analiza tioli związanych z białkami wykazała, że precyzja wewnątrzseryjna wynosiła od 0,57% do 15,99%, a międzyseryjna od 0,11% do 11,58%. Dokładność wahała się od 86,09% do 107,74% w pomiarach wewnątrzseryjnych oraz od 85,56% do 118,20% w pomiarach międzyseryjnych. Uzyskane wyniki spełniały kryteria akceptacji ^[174], co wskazuje na wysoką powtarzalność i niezawodność metody. W porównaniu do innych metod oznaczania tioli niskocząsteczkowych w płynach biologicznych, opracowana metoda charakteryzuje się wysoką dokładnością i precyzją ^[146,151–153,156–158,163,164,168,170,171,255,256,259–263]. Jej zastosowanie w analizie klinicznej może umożliwić skuteczne monitorowanie zmian stężeń tioli w różnych stanach fizjologicznych

i patologicznych, co podkreśla jej potencjał do zastosowań w badaniach biochemicznych i diagnostyce medycznej.

Tabela 11. Wyznaczone wartości precyzji i dokładności wewnątrzseryjnej ($n = 5$) oraz międzyseryjnej ($n = 3$) dla różnych form redoks tioli oznaczanych w próbkach osocza z zastosowaniem przedkolumnowej modyfikacji chemicznej analitów z użyciem ABD-F za pomocą opracowanej metody HPLC-FLD

Analit	Stężenie (nmol/ml)	Precyzja (%)		Dokładność (%)	
		Wewnątrz serii	Pomiędzy seriami	Wewnątrz serii	Pomiędzy seriami
Tiole całkowite					
Cys	3,49	8,51	9,77	103,44	92,51
	10,47	4,94	3,72	93,17	97,10
	120,00	4,84	11,82	96,78	99,53
	240,00	4,98	3,00	99,72	99,41
Cys-Gly	2,00	15,51	15,18	95,86	84,91
	6,00	8,68	13,40	94,04	96,42
	20,00	4,86	8,01	100,53	100,18
	40,00	7,93	0,66	99,84	99,86
Hcy	1,54	1,11	10,25	101,06	87,35
	4,62	2,78	6,95	102,50	91,70
	20,00	3,70	8,81	97,14	97,12
	40,00	2,19	2,05	100,38	99,49
GSH	0,73	7,41	6,60	100,60	98,22
	2,19	4,91	3,62	103,10	102,17
	20,00	3,49	2,78	99,16	99,69
	40,00	2,20	1,09	100,05	100,04
γ-Glu-Cys	0,39	8,82	3,76	86,47	83,50
	1,17	3,41	6,40	99,40	96,61
	12,00	2,60	7,03	100,96	100,06
	24,00	2,70	1,21	99,84	99,68
Tiole zredukowane					
Cys	1,68	7,04	2,38	92,13	95,20
	5,04	5,93	4,44	100,34	97,18
	12,00	6,21	3,58	99,91	98,65
	24,00	1,16	1,39	99,67	99,58
Cys-Gly	0,13	5,90	0,57	82,19	119,43
	0,39	9,97	5,73	102,32	90,59
	8,00	5,49	3,37	98,84	98,78
	16,00	1,10	3,05	100,05	100,08
Hcy	0,28	5,30	11,40	87,83	111,64
	0,84	8,40	4,24	103,71	93,32
	4,00	7,21	4,65	99,66	98,60
	8,00	5,68	4,86	99,93	99,95
GSH	0,10	11,99	7,55	104,92	94,08
	0,30	6,62	10,65	97,90	96,36

	12,00	2,97	3,38	99,31	99,40
	24,00	4,17	0,25	100,06	100,02
γ -Glu-Cys	0,14	2,94	0,63	88,58	96,03
	0,42	6,54	1,85	85,89	92,54
	4,00	3,31	2,90	101,67	98,18
	8,00	6,02	0,44	99,35	99,88
<u>Tiole wolne</u>					
Cys	3,20	3,32	0,73	95,05	99,73
	9,60	0,80	0,66	97,65	97,56
	80,00	1,19	2,68	100,61	99,96
	160,00	1,35	1,32	100,24	99,98
Cys-Gly	0,35	6,17	11,26	90,46	90,79
	1,05	10,65	5,88	99,55	99,80
	12,00	2,84	3,49	99,62	100,03
	24,00	1,44	1,13	99,95	99,93
Hcy	0,14	5,17	5,28	83,42	86,11
	0,42	6,99	3,72	97,08	94,93
	4,00	2,69	3,03	100,33	100,68
	8,00	0,76	2,23	99,73	99,65
GSH	0,06	4,10	3,65	97,90	87,30
	0,18	2,29	6,23	87,82	104,70
	4,00	4,45	2,03	100,78	99,67
	8,00	0,43	0,87	99,57	100,11
γ -Glu-Cys	0,10	8,00	4,34	81,67	96,54
	0,30	4,58	5,21	94,24	102,41
	6,00	2,79	5,16	100,32	99,96
	12,00	1,31	1,85	99,96	100,31
<u>Tiole związane z białkami</u>					
Cys	6,54	5,41	1,62	94,35	89,32
	19,62	2,08	3,50	98,50	101,14
	120,00	1,56	2,10	100,34	100,01
	240,00	1,81	1,90	99,79	99,87
Cys-Gly	0,57	15,99	4,12	89,20	85,56
	1,71	0,57	4,27	99,31	95,98
	14	2,16	0,90	99,14	101,05
	28	0,90	0,29	99,91	99,59
Hcy	0,29	7,28	9,29	87,76	92,30
	0,87	7,55	3,39	103,77	96,35
	8,00	3,57	1,75	98,80	99,75
	16,00	4,53	0,55	100,07	99,73
GSH	0,07	4,79	11,58	90,74	118,20
	0,21	6,55	1,62	107,74	94,70
	1,20	3,97	0,97	97,84	98,79
	2,40	1,49	0,11	100,38	100,19
γ -Glu-Cys	0,09	9,32	4,71	86,09	99,65
	0,27	5,70	2,81	96,18	102,83

	1,20	5,07	0,89	98,53	97,94
	2,40	5,01	0,38	99,53	100,33

5.2.3.4 Odporność metody

Odporność metody analitycznej jest ważnym parametrem walidacyjnym, który pozwala ocenić zdolność metody do generowania spójnych, powtarzalnych i wiarygodnych wyników w zmieniających się warunkach. Badanie odporności umożliwia określenie, czy metoda jest wystarczająco stabilna, aby tolerować niewielkie zmiany krytycznych parametrów bez istotnego wpływu na dokładność i precyzję oznaczeń, co zwiększa jej przydatność do rutynowego stosowania w analizie klinicznej. W ramach przeprowadzonych testów oceniono wpływ celowo wprowadzonych zmian w parametrach analitycznych obejmujących prędkość przepływu fazy ruchomej ($1,0 \pm 0,1$ ml/min), temperaturę separacji ($25,0 \pm 0,5$ °C) oraz stężenie TFA w fazie ruchomej ($0,1 \pm 0,01\%$). Odchylenia reprezentują realne wartości, jakie mogą wystąpić w trakcie rutynowych analiz prowadzonych w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Ocenie poddano takie parametry chromatograficzne jak czasy retencji, wysokości pików oraz rozdzielczości. Do oceny odporności wykorzystano wzbogacone próbki osocza, zawierające egzogenne stężenia analitów wynoszące: 3,49 nmol/ml osocza dla Cys, 2,0 nmol/ml osocza dla Cys-Gly, 1,54 nmol/ml osocza dla Hcy, 0,73 nmol/ml osocza dla GSH, 0,39 nmol/ml osocza dla γ -Glu-Cys oraz 30 nmol/ml osocza dla NAC. Każdą próbkę analizowano trzykrotnie. Zgodnie z wytycznymi, metoda jest odporna, jeśli niewielkie zmiany parametrów analitycznych nie prowadzą do znaczących zmian w odpowiedziach systemowych. Jako kryteria akceptacji przyjęto zmienność t_r nie większą niż $\pm 2\%$ w porównaniu do warunków referencyjnych, odchylenia w wysokości pików w granicach $\pm 5\%$ oraz utrzymanie $R_s \geq 1,5$ dla sąsiadujących pików. Analiza uzyskanych wyników (Tabela 12) wskazuje, że metoda jest najbardziej wrażliwa na zmiany stężenia TFA w fazie ruchomej. Wzrost stężenia TFA skutkował zmianami w czasach retencji analitów (RSD do 4,09%), a także większymi wahaniami rozdzielczości wynoszącymi od 2,93 do 6,82%, co wskazuje na istotny wpływ tego parametru na separację analitów. Wysokości pików dla różnych analitów również wykazywały większe zmienności przy zmianach stężenia TFA (RSD od 2,12 do 6,48%), co sugeruje wpływ na czułość detekcji. W przypadku zmian prędkości przepływu eluentu, czasy retencji zmieniały się w większym stopniu (RSD od 3,62 do 5,43%) i nie mieściły się w założonych granicach akceptacji. Zmiany prędkości przepływu fazy ruchomej nie

powodowały jednak znaczących zmian w rozdzielczości, która dla wszystkich analitów przyjmowała wartości powyżej 1,5. Odchylenia w wysokościach pików mieściły się w zakresie 2,80 – 5,69%, co oznacza, że wyłącznie dla GSH i γ -Glu-Cys, wartości RSD nieznacznie odbiegały od kryterium akceptacji. Najmniejsze zmiany zaobserwowano przy zmianach temperatury rozdzielania chromatograficznego. Czasy retencji wykazywały najniższe wartości RSD (maksymalnie 0,93%), a rozdzielczość oraz wysokości pików pozostawały stabilne i spełniały założone kryteria akceptacji, co wskazuje na dobrą odporność metody na zmiany temperatury kolumny. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, iż opracowana metoda HPLC-FLD charakteryzuje się umiarkowaną odpornością na wybrane parametry i może być stosowana w rutynowej analizie klinicznej, pod warunkiem ścisłej kontroli stężenia TFA w fazie ruchomej oraz prędkości jej przepływu, co pozwoli na uzyskanie powtarzalnych i wiarygodnych wyników oznaczeń.

5.2.3.5 Przeniesienie próbki

Ocena przeniesienia próbki została przeprowadzona poprzez trzykrotną analizę próbek matrycy zastępczej zawierającej PBS o pH 7,4 umieszczonych bezpośrednio po próbkach standardów kalibracyjnych na poziomie ULOQ. Średnie wartości przeniesienia próbki dla poszczególnych analitów były następujące: 8,4% dla Cys, 5,2% dla Cys-Gly, 3,9% dla Hcy, 4,8% dla GSH, 2,0% dla γ -Glu-Cys oraz 3,1% dla NAC. Wyniki przeprowadzonej analizy wskazują, że efekt przeniesienia próbki dla badanej metody HPLC-FLD jest minimalny i mieści się w przyjętym zakresie akceptacji ^[174]. Odpowiedzi analitów w próbkach zawierających PBS (pH 7,4) analizowanych bezpośrednio po próbkach standardów kalibracyjnych na poziomie ULOQ w żadnym przypadku nie przekroczyły 20% odpowiedzi na poziomie LOQ, co potwierdza brak istotnego wpływu przeniesienia próbki na dokładność i precyzję oznaczeń. Optymalizacja procesu płukania igły i gniazda oraz zastosowanie odpowiednich parametrów chromatograficznych okazały się skuteczne w minimalizacji kontaminacji analizowanych próbek. W związku z powyższym nie ma konieczności wprowadzania dodatkowych procedur przed analizą kolejnych próbek badanych, takich jak wprowadzanie do układu próbek ślepych po próbkach o oczekiwanym wysokim stężeniu.

Tabela 12. Wyniki otrzymane podczas testów odporności metody analitycznej, $n = 3$

Badany parametr	Zmieniany parametr	Cys		Cys-Gly		Hcy		GSH		γ -Glu-Cys		NAC	
		Średnia $\pm$ SD	RSD (%)	Średnia $\pm$ SD	RSD (%)	Średnia $\pm$ SD	RSD (%)	Średnia $\pm$ SD	RSD (%)	Średnia $\pm$ SD	RSD (%)	Średnia $\pm$ SD	RSD (%)
Czas retencji (min)	Prędkość przepływu eluentu (ml/min)	4,10 $\pm$ 0,15	3,62	5,48 $\pm$ 0,30	5,43	8,19 $\pm$ 0,32	3,87	10,39 $\pm$ 0,48	4,63	11,81 $\pm$ 0,44	3,71	14,04 $\pm$ 0,65	4,60
	Temperatura kolumny (°C)	3,72 $\pm$ 0,02	0,47	4,98 $\pm$ 0,03	0,65	7,13 $\pm$ 0,05	0,71	9,12 $\pm$ 0,08	0,93	10,62 $\pm$ 0,09	0,85	13,70 $\pm$ 0,05	0,36
	Stężenie TFA (%)	3,82 $\pm$ 0,09	2,29	5,19 $\pm$ 0,12	2,22	7,42 $\pm$ 0,25	3,32	9,63 $\pm$ 0,27	2,84	11,16 $\pm$ 0,46	4,09	13,92 $\pm$ 0,07	0,53
Wysokość pików (μ V)	Prędkość przepływu eluentu (ml/min)	272667 $\pm$ 7933	2,91	90048 $\pm$ 2525	2,80	10939 $\pm$ 364	3,32	4824 $\pm$ 273	5,65	3143 $\pm$ 179	5,69	35587 $\pm$ 1177	3,31
	Temperatura kolumny (°C)	237611 $\pm$ 7767	3,27	80116 $\pm$ 2291	2,86	11051 $\pm$ 291	2,63	4416 $\pm$ 90	2,03	1946 $\pm$ 97	5,01	33672 $\pm$ 856	2,54
	Stężenie TFA (%)	252243 $\pm$ 9078	3,60	79599 $\pm$ 5155	6,48	11128 $\pm$ 670	6,02	4762 $\pm$ 101	2,12	2491 $\pm$ 100	4,02	33584 $\pm$ 1719	5,12
Rozdzielczość	Prędkość przepływu eluentu (ml/min)	4,51 $\pm$ 0,12	2,65	2,05 $\pm$ 0,04	2,02	4,68 $\pm$ 0,09	1,85	2,80 $\pm$ 0,10	3,66	2,47 $\pm$ 0,07	2,78	2,39 $\pm$ 0,07	2,92
	Temperatura kolumny (°C)	2,60 $\pm$ 0,04	1,58	1,90 $\pm$ 0,04	2,08	2,66 $\pm$ 0,07	2,51	2,82 $\pm$ 0,03	1,03	2,28 $\pm$ 0,02	1,03	2,42 $\pm$ 0,05	1,95
	Stężenie TFA (%)	2,67 $\pm$ 0,16	5,85	1,92 $\pm$ 0,06	3,17	2,71 $\pm$ 0,12	4,48	2,70 $\pm$ 0,08	2,93	2,42 $\pm$ 0,08	3,34	2,10 $\pm$ 0,14	6,82

5.2.3.6 Wpływ matrycy

Ocena efektu matrycy została przeprowadzona w oparciu o analizę QCs na dwóch poziomach stężeń (niskim oraz wysokim) w próbkach osocza pochodzących od sześciu różnych dawców, a także w próbkach hemolizowanych i lipemicznych. Każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 5.1.4. Uzyskane wartości %RSD oraz % odzysku dla poszczególnych analitów przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Wartości precyzji i dokładności dla różnych form tioli w próbkach pochodzących od sześciu różnych dawców wyznaczone podczas badania efektu matrycy

Analit	Stężenie dodane (nmol/ml)	Stężenie obliczone (nmol/ml)	RSD (%)	Odzysk (%)
<u>Tiole całkowite</u>				
Cys	10,5	11,2	4,2	106,7
	240,0	250,1	5,1	104,2
Cys-Gly	6,0	6,1	3,8	101,7
	40,0	39,2	4,5	98,0
Hcy	4,5	4,0	4,9	88,9
	40,0	38,7	5,3	96,8
GSH	2,2	2,3	4,7	104,5
	40,0	39,1	5,0	97,8
γ -Glu-Cys	1,2	1,3	4,4	108,3
	24,0	23,5	4,8	97,9
<u>Tiole zredukowane</u>				
Cys	5,04	5,7	3,6	105,6
	24,0	26,2	5,3	109,2
Cys-Gly	0,39	0,37	2,1	94,9
	16,0	15,1	3,8	94,4
Hcy	0,84	0,95	8,6	113,1
	8,0	8,7	5,8	108,7
GSH	0,3	0,26	2,5	86,7
	24,0	22,9	7,4	95,4
γ -Glu-Cys	0,42	0,41	1,7	97,6

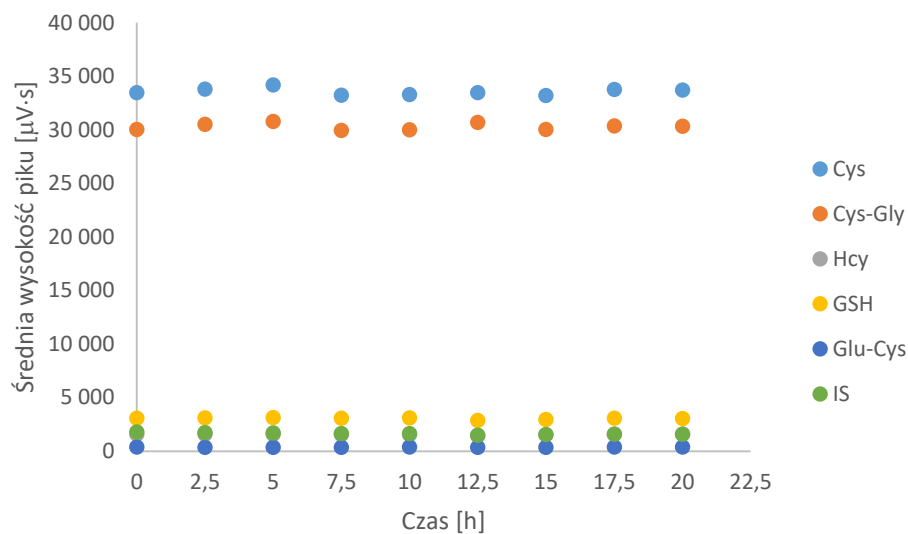
	8,0	8,5	6,3	106,25
<u>Tiole wolne</u>				
Cys	9,6	9,8	4,1	102,1
	160,0	159,2	4,7	99,5
Cys-Gly	1,05	1,09	6,6	103,8
	24,0	24,7	5,0	102,9
Hcy	0,42	0,37	4,6	88,1
	8,0	7,59	3,7	94,9
GSH	0,18	0,16	2,8	88,9
	8,0	7,84	3,4	98,0
γ -Glu-Cys	0,3	0,34	8,1	113,3
	12,0	12,9	6,3	107,5
<u>Tiole związane z białkami</u>				
Cys	19,62	20,81	5,4	106,1
	240,0	241,6	1,9	100,7
Cys-Gly	1,71	1,63	4,8	95,3
	28,0	27,2	5,6	97,1
Hcy	0,87	0,90	4,1	103,4
	16,0	16,3	2,1	101,9
GSH	0,21	0,20	4,4	95,2
	2,4	2,3	5,1	95,8
γ -Glu-Cys	0,27	0,25	3,9	92,6
	2,4	2,5	2,8	104,2

Przeprowadzony eksperyment wykazał, że dla wszystkich analizowanych tioli precyzja i odzysk mieściły się w granicach akceptacji. Wartości %RSD dla każdego poziomu stężenia QCs nie przekroczyły 15%, a odzysk mieścił się w zakresie 85 – 115%. Dane uzyskane dla sześciu różnych próbek osocza wykazały niewielkie różnice pomiędzy wynikami, co sugeruje brak istotnych efektów matrycowych. Podobne wyniki uzyskano dla próbek lipemicznych i hemolizowanych, co wskazuje na stabilność i wiarygodność metody w matrycach o różnej zmienności biologicznej.

5.2.3.7 Stabilność

Badania stabilności analitów tiolowych w matrycy przeprowadzono z wykorzystaniem próbek QCs na niskim oraz wysokim poziomie stężenia, których dokładne wartości podano w podrozdziale 5.1.7.9. QCs analizowano każdorazowo względem świeżo przygotowanych krzywych kalibracyjnych. Ocenie poddano stabilność w różnych warunkach przechowywania i obróbki próbek osocza, w tym stabilność podczas cykli zamrażania i rozmrażania, stabilność krótko- i długoterminową oraz stabilność w automatycznym podajniku próbek. Przeprowadzone badania wykazały, że po trzech cyklach zamrażania i rozmrażania, przy czasie przechowywania w zamrażarce niskotemperaturowej wynoszącym co najmniej 12 godzin pomiędzy cyklami, średnie stężenia analitów pozostawały w zakresie $\pm 15\%$ wartości nominalnej. Wskazuje to na wysoką stabilność analizowanych związków w warunkach stosowanych podczas badania. Próbkę QCs przechowywane na stole laboratoryjnym w temperaturze pokojowej przez okres odpowiadający czasowi przechowywania próbek osocza w badaniu nie wykazały istotnych strat analitów. Wartości odzysku dla każdego stężenia mieściły się w granicach $\pm 5\%$ wartości nominalnej, co potwierdza stabilność analitów w warunkach krótkoterminowego przechowywania. Próbkę osocza przechowywane w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez dwa lata wykazały dobrą stabilność, bez znaczących zmian w stężeniach analitów (straty na poziomie max. 16%), co sugeruje, że przechowywanie próbek w ultraniskich temperaturach skutecznie zapobiega degradacji związków. Stabilność pochodnych analitów w przetworzonych próbkach osocza przechowywanych w ciemności w automatycznym podajniku próbek w temperaturze $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 20 godzin została potwierdzona na podstawie wartości odzysku, które mieściły się w zakresie $\pm 9\%$ wartości nominalnej. Wyniki te pokrywają się z danymi uzyskanymi przez Nishiuchi i in. [264], którzy potwierdzili stabilność pochodnej ABD-Cys w podobnych warunkach przez 24 godziny. Wykres zależności średniej wysokości pików dla pochodnej każdego analitu (tiole zredukowane, niskie QCs) od czasu przechowywania próbek w automatycznym podajniku w warunkach opisanych powyżej przedstawiono na Rysunku 79. Stabilność roztworów podstawowych i roboczych oceniano w warunkach przechowywania stosowanych podczas analizy próbek badawczych. Roztwory podstawowe analitów były stabilne w środowisku kwaśnym w temperaturze $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez jeden miesiąc, natomiast roztwory robocze wykazywały stabilność przez tydzień. Po tym czasie niezbędne było przygotowanie świeżych roztworów. Roztwór ABD-F o stężeniu $0,01\text{ mol/l}$

przygotowany w buforze wg Sörensen-Valbuma o pH 9,5 i przechowywany w ciemności w temperaturze 4 °C pozostawał stabilny przez tydzień, co było zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [252,265].



Rysunek 79. Wykres przedstawiający stabilność pochodnych ABD-tiol w próbkach osocza przechowywanych w automatycznym podajniku próbek w temperaturze 4 °C przez 20 godzin; prezentowana zależność dotyczy badań wykonanych dla tioli zredukowanych na niskim poziomie QCs; $n = 3$; sposób przygotowania próbki opisano w podrozdziale 5.1.7.1, natomiast warunki chromatograficzne w podrozdziale 5.1.4

5.2.3.8 Test zgodności systemu

W celu zapewnienia dokładności i powtarzalności pomiarów analitycznych, w trakcie walidacji metody przeprowadzono testy zgodności systemu, których celem było potwierdzenie, że spełnia on określone standardy i dostarcza wiarygodne wyniki w czasie. Po analizie sześciu powtórzeń próbek QCs zawierających tiolowe anality, ocenie poddano kluczowe parametry wydajności chromatograficznej, w tym N , k' , R_s , T_f , a także precyzję nastrzyku wyrażoną jako %RSD. Wyznaczone wartości N wynosiły odpowiednio: $2527,83 \pm 49,27$ dla Cys, $3462,83 \pm 51,57$ dla Cys-Gly, $4643,33 \pm 89,98$ dla Hcy, $4177,67 \pm 27,16$ dla GSH oraz $6327,50 \pm 124,85$ dla γ -Glu-Cys, przy %RSD < 2,0. Wysoka liczba pól teoretycznych dla każdego analitu ($N > 2000$) stanowi potwierdzenie doskonałej separacji tioli na kolumnie XBridge® C18. Współczynniki T_f wynosiły: $1,40 \pm 0,03$ dla Cys, $1,24 \pm 0,02$ dla Cys-Gly, $1,20 \pm 0,03$ dla Hcy, $1,16 \pm 0,01$ dla GSH oraz $1,09 \pm 0,04$ dla γ -Glu-Cys, przy %RSD < 4,0. Wartości te wskazują na symetryczny kształt pików. Akceptowalne wartości T_f mieszczą się w zakresie 1,0 – 1,5, podczas gdy wartości powyżej 2,0 uznaje się za nieodpowiednie. R_s pomiędzy sąsiednimi pikami na chromatogramie została wyznaczona automatycznie przy użyciu

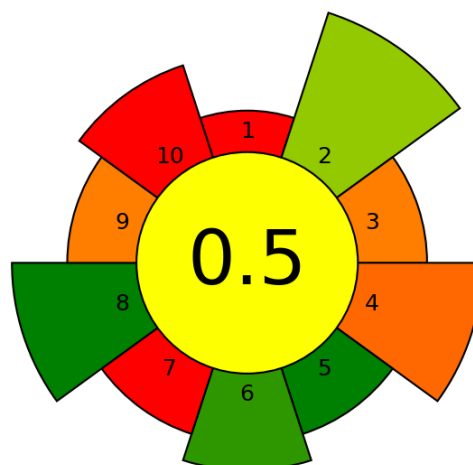
oprogramowania ChromNAV2 i była zgodna z kryteriami akceptacji, co umożliwiło precyzyjną ilościową analizę pochodnych analitów. Otrzymane wartości wynosiły $2,62 \pm 0,04$ (%RSD = 1,60) dla Cys, $1,87 \pm 0,04$ (%RSD = 1,92) dla Cys-Gly, $4,41 \pm 0,05$ (%RSD = 1,14) dla Hcy, $2,65 \pm 0,03$ (%RSD = 1,23) dla GSH oraz $1,81 \pm 0,07$ (%RSD = 4,09) dla γ -Glu-Cys. Uzyskane wartości k' wskazywały na dobrą retencję tioli na fazie stacjonarnej i wynosiły odpowiednio: $1,25 \pm 0,01$ (%RSD = 0,50) dla Cys, $2,05 \pm 0,01$ (%RSD = 0,46) dla Cys-Gly, $3,28 \pm 0,01$ (%RSD = 0,41) dla Hcy, $4,60 \pm 0,02$ (%RSD = 0,48) dla GSH oraz $5,49 \pm 0,02$ (%RSD = 0,44) dla γ -Glu-Cys. Precyzja nastrzyku, wyznaczona na podstawie t_r , wykazywała wysoką powtarzalność, z wartościami RSD poniżej 0,39% dla wszystkich analizowanych tioli, co potwierdziło dokładność i niezawodność dozowania próbek. Wszystkie analizowane parametry przydatności systemu spełniały założone kryteria akceptacji.

5.2.4 Zieloność metody

Wyniki przeprowadzonej oceny zieloności protokołu przygotowania próbek do analizy HPLC dla tioli całkowitych przedstawiono na Rysunku 80. Ze względu na pobieranie materiału do badań przez firmę zewnętrzną, a następnie transport próbek do docelowego laboratorium, w pierwszym kryterium (waga: 1) otrzymano najniższą ocenę, tj. 0 punktów, gdyż metoda przygotowania próbek *ex situ* uznawana jest za najmniej korzystną. Główną wadą jest możliwość degradacji lub zanieczyszczenia próbek podczas transportu, co może wpłynąć na dokładność analizy. Konieczność zapewnienia odpowiednich warunków przewozu dodatkowo ogranicza zastosowanie metody w analizach wymagających szybkich wyników. Niemniej jednak sposób ten jest niezbędny w przypadku, gdy do precyzyjnych pomiarów wymagane jest użycie zaawansowanej aparatury laboratoryjnej, która nie jest dostępna w miejscu poboru próbek. Zgodnie z kryterium drugim (waga: 5), ocenie poddawane jest ograniczenie zużycia toksycznych odczynników i rozpuszczalników oraz minimalizacja ich ilości. Procedury, w których ilość szkodliwych substancji przekracza 10 ml lub gramów otrzymują najniższą ocenę. W przedstawionym protokole całkowita objętość niebezpiecznych odczynników (NaBH₄ w DMSO, HCl, PCA, n-oktanol) w pojedynczej próbce nie przekracza 72 μ l, co jest znacznie poniżej wspomnianego progu i skutkowało otrzymaniem dobrej oceny wynoszącej 0,71 punktu. Kryterium trzecie (waga: 2) promuje stosowanie materiałów, które są odnawialne, zrównoważone lub nadają się do wielokrotnego użytku. Oceniana procedura nie uwzględnia tych aspektów w istotnym

stopniu, co prowadziło do niskiej oceny (0,25 punktu). Ze względu na pracę z materiałem zakaźnym, w laboratorium dominowały materiały jednorazowego użytku, takie jak plastikowe końcówki pipet, próbówki czy filtry, co generowało duże ilości odpadów. Wyjątkiem było szkło laboratoryjne, które było dokładnie myte i używane wielokrotnie. Kryterium czwarte (waga: 4) odnosi się do ilości generowanych odpadów. W procedurze przygotowania próbek do analizy, masa odpadów wynosiła ok. 14 g, w co wliczone zostały masy zużytych materiałów jednorazowego użytku (próbówki typu Eppendorf, fiołki stożkowe do HPLC, próbówki do poboru krwi, końcówki do pipet itp.), próbki osocza oraz zużytych odczynników. Uzyskana ocena to 0,2 punktu. Kryterium piąte (waga: 2) koncentruje się na miniaturyzacji próbki i jej rozmiarze, wyrażonym w jednostkach masy lub objętości. W przedstawionej procedurze, całkowita objętość próbki osocza wynosi 100 μ l, co jest wielkością zgodną z wymaganiami kryterium miniaturyzacji. Rozmiar próbki jest zdecydowanie niższy od przyjętego limitu wynoszącego 100 ml, a zatem jest akceptowalny z punktu widzenia tego kryterium, za co otrzymano 1 punkt. W kryterium szóstym (waga: 3) oceniana jest liczba próbek możliwych do przygotowania w ciągu jednej godziny. W opracowanym protokole, wydajność tego etapu ograniczona jest przez konieczność inkubacji próbek przez 10 minut celem przeprowadzenia chemicznej modyfikacji analitów, a także wirowania przez taki sam czas w celu oddzielenia wytrąconych białek od roztworu. Dostępne w laboratorium termostaty pozwalały na jednoczesną derywatyzację maksymalnie 48 próbek jednocześnie, co było tożsame z ilością próbek możliwych do wirowania w tym samym czasie, a co w połączeniu z pozostałymi etapami niezbędnymi do przygotowania próbek do analizy i związanym z tym czasem, stanowiło ostateczną liczbę próbek możliwych do przygotowania w ciągu jednej godziny. Otrzymana ocena to 0,91 punktu. Kryterium siódme (waga: 2) koncentruje się na liczbie etapów w procesie przygotowania próbki oraz na stopniu automatyzacji procedury. Z uwagi na liczbę etapów (6) oraz niepełną automatyzację (procedura wymaga bezpośredniego zaangażowania operatora w większości etapów), procedura ta otrzymała najniższą ocenę w tym kryterium. Kryterium ósme (waga: 4) odnosi się do zużycia energii podczas etapu przygotowania próbki. W procedurze wykorzystywano urządzenia o różnym czasie pracy i mocy, w tym termostaty grzewcze oraz wirówkę. Średnie obliczone zużycie energii na jedną próbkę wynosiło 5,3 Wh, co skutkowało otrzymaniem 1 punktu. Zgodnie z kryterium dziewiątym (waga 2), technika ostatecznego oznaczenia jest oceniana na podstawie rodzaju instrumentu lub systemu używanego do analizy przygotowanej próbki.

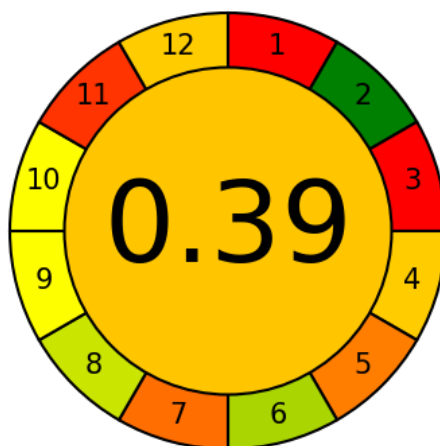
W niniejszej pracy metoda oparta była na technice HPLC, co zostało uwzględnione w ocenie i skutkowało otrzymaniem 0,25 punktu. W kryterium 10 ocenie poddawane są zagrożenia dla operatora (waga: 3). W opracowanym protokole przygotowania próbki do analizy wykorzystywane były szkodliwe substancje chemiczne, które mają działanie toksyczne, żrące, drażniące lub są niebezpieczne dla środowiska, w związku z czym otrzymano 0 punktów. Otrzymany wynik końcowy wynoszący 0,5 oznacza, że protokół charakteryzuje się pewnymi pozytywnymi aspektami, ale istnieją obszary wymagające poprawy. Sposób przygotowania próbki do analizy wiąże się z ryzykiem operacyjnym, które nie zostało w pełni zminimalizowane. Istnieje zauważalna potrzeba zmniejszenia zużycia toksycznych odczynników, zwiększenia automatyzacji procesów oraz redukcji liczby etapów, a także minimalizacji generowania odpadów, co poprawiłoby efektywność, bezpieczeństwo i wpływ na środowisko.



Rysunek 80. Wyniki oceny ekologiczności etapu przygotowania próbki do analizy przeprowadzonej za pomocą narzędzia AGREEprep; kryteria: 1 – miejsce przygotowania próbki, 2 – materiały niebezpieczne, 3 – zrównoważony rozwój, odnawialność i ponowne wykorzystanie materiałów, 4 – odpady, 5 – ekonomia wielkości próbki, 6 – przepustowość próbki, 7 – integracja i automatyzacja, 8 – zużycie energii, 9 – metoda analizy, 10 – bezpieczeństwo operatora.

Do oceny zgodności opracowanej metody z zasadami zielonej chemii analitycznej zastosowano narzędzie AGREE^[196]. Kalkulator ten ocenia metodę na podstawie 12 zasad, przydzielając jej wynik w skali od 0 do 1, gdzie wartość 1 oznacza najwyższą zgodność z ekologicznymi standardami. Uzyskany wynik wyniósł 0,39 (Rysunek 81), co wskazuje na niski poziom zieloności metody. Analiza wyników poszczególnych kryteriów ujawniła, że najsłabszymi punktami metody są: sposób przygotowania próbki

ex situ (kryterium 1, waga: 2), miejsce znajdowania się urządzenia analitycznego – *off-line* (kryterium 3, waga: 2), brak pełnej automatyzacji i miniaturyzacji procesu (kryterium 5, waga 2), generowanie dużych ilości odpadów (kryterium 7, waga: 2) oraz obecność toksycznych odczynników (kryterium 11, waga: 2). Duża ilość etapów przygotowania próbki (kryterium 4, waga: 2) oraz zagrożenia dla operatora (kryterium 12, waga: 2) również stanowią obszar do poprawy. Ilość zużytej energii (kryterium 9, waga: 2) oraz wykorzystywanych odczynników pochodzących ze źródeł odnawialnych (kryterium 10, waga: 2) charakteryzuje się średnią szkodliwością dla środowiska. Do kluczowych zalet metody należą: minimalizacja próbki (kryterium 2, waga: 2), stosowanie ABD-F jako odczynnika derywatyzującego (kryterium 6, waga: 2) oraz przepustowość analizy (kryterium 8, waga: 2).



Rysunek 81. Wyniki oceny zieloności metody analitycznej przeprowadzonej za pomocą narzędzia AGREE uzyskane dla opracowanej metody chromatograficznej służącej do oznaczania wybranych związków tiolowych w próbkach osocza; kryteria: 1 – przygotowanie próbki, 2 – rozmiar próbki, 3 – miejsce urządzeń analitycznych, 4 – ilość etapów przygotowania próbki, 5 – automatyzacja i miniaturyzacja, 6 – derywatyzacja, 7 – odpady, 8 – przepustowość analizy, 9 – konsumpcja energii, 10 – źródło reagentów, 11 – toksyczność, 12 – bezpieczeństwo operatora

5.2.5 Zastosowanie metody do analizy próbek rzeczywistych

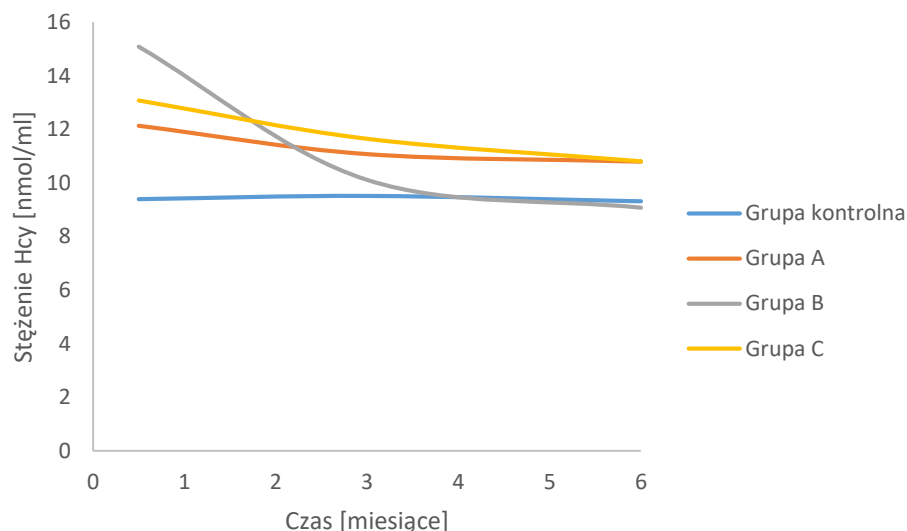
Zaproponowana metoda została zastosowana do oznaczania różnych form redoks wybranych związków tiolowych w 60 próbkach osocza (Tabela 14) pobranych od pozornie zdrowych osób ($n = 15$), osób zaszczepionych przeciwko COVID-19, u których nigdy nie stwierdzono zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 (grupa A, $n = 15$), ozdrowieńców zaszczepionych przeciwko COVID-19 (grupa B, $n = 15$) oraz

ozdrowieńców, którzy nie zostali zaszczepieni przeciwko COVID-19 (grupa C, n = 15). Badania przeprowadzono dwa tygodnie, trzy i sześć miesięcy po przyjęciu ostatniej (przypominającej) dawki szczepionki lub uzyskaniu pozytywnego wyniku testu diagnostycznego wobec SARS-CoV-2. Przed przystąpieniem do analiz porównawczych oceniono rozkład danych za pomocą testu Shapiro-Wilka oraz homogeniczność wariancji z użyciem testu Levene'a. Sferyczność danych dla powtarzanych pomiarów zweryfikowano testem Mauchly'ego. Uzyskane dane spełniały założenia normalności, sferyczności i homogeniczności wariancji, wobec czego zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji dla powtarzanych pomiarów (*repeated measures ANOVA*) z czynnikami: grupa badana (kontrolna, A, B lub C) i czas (2 tygodnie, 3 miesiące, 6 miesięcy), a w przypadku istotnych różnic przeprowadzono test post-hoc (Bonferroniego). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SD.

Wyniki badań dla tioli całkowitych pokazują, że w grupach A, B i C stężenia analitów wzrosły w ciągu pierwszych dwóch tygodni w porównaniu do grupy kontrolnej. Największy wzrost zaobserwowano w grupie ozdrowieńców zaszczepionych przeciwko COVID-19. Po 3 i 6 miesiącach stężenia tioli powróciły do poziomów zbliżonych do tych w grupie kontrolnej, co może wskazywać na proces stabilizacji. Stężenie tioli zredukowanych było wyższe w grupach A, B i C po 2 tygodniach w porównaniu do grupy kontrolnej, przy czym największy wzrost odnotowano w grupie ozdrowieńców zaszczepionych przeciwko COVID-19 (grupa B). Po 6 miesiącach stężenia w tych grupach zbliżyły się do wartości w grupie kontrolnej. Stężenie tioli wolnych również było wyższe w grupie B po 2 tygodniach w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupach A i C także zaobserwowano wzrost, choć mniej wyraźny. Podobnie jak w przypadku innych form redoks tioli, po 6 miesiącach wartości wróciły do poziomu kontrolnego. Największy wzrost stężenia tioli związanych z białkami odnotowano w grupie B po 2 tygodniach w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Po 6 miesiącach we wszystkich grupach badanych stężenia tioli związanych z białkami osiągnęły wartości na poziomie podobnym do grupy kontrolnej. Cys jest jednym z głównych aminokwasów tiolowych występujących w organizmie. Wzrost jej stężenia w grupach A, B i C po 2 tygodniach sugeruje zwiększoną syntezę lub zmniejszony katabolizm w odpowiedzi na stres. Wzrost stężenia Cys-Gly może być związany z degradacją GSH, co wskazuje na intensyfikację procesów antyoksydacyjnych. GSH jest kluczowym antyoksydantem – jego wzrost po 2 tygodniach sugeruje aktywację mechanizmów obronnych organizmu przeciwko stresowi oksydacyjnemu. Wzrost stężenia γ -Glu-Cys może wskazywać na zwiększoną

syntezę GSH jako odpowiedź na zintensyfikowane zapotrzebowanie na antyoksydanty. Podwyższone stężenie Hcy jest markerem stresu oksydacyjnego i zwiększonego ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Rysunek 82 przedstawia zmiany stężenia Hcy w czasie w różnych grupach badanych w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie B po 2 tygodniach średnie stężenie Hcy wynosiło 15,09 nmol/ml, natomiast w grupie kontrolnej 9,40 nmol/ml. Wysoki poziom Hcy u zaszczepionych ozdrowieńców może wskazywać na zwiększone ryzyko hiperhomocysteinemii, związanej z rozwojem chorób sercowo-naczyniowych, w tym miażdżycy i zakrzepicy. Po 3 miesiącach poziom Hcy spadł do 10,12 nmol/ml, ale nadal pozostawał powyżej wartości kontrolnej, co może sugerować, że organizm nie powrócił jeszcze do pełnej równowagi metabolicznej. Po 6 miesiącach poziom Hcy wynosił już 9,08 nmol/ml i był zbliżony do wartości kontrolnych, które mogą się jednak różnić w zależności od indywidualnych predyspozycji. W grupie ozdrowieńców, którzy nie zostali zaszczepieni przeciwko COVID-19 (grupa C) po 2 tygodniach poziom Hcy wynosił 13,08 nmol/ml i również był wyższy niż w grupie kontrolnej, choć niższy niż w grupie ozdrowieńców zaszczepionych przeciwko chorobie. Wynik ten wskazuje na zwiększone ryzyko hiperhomocysteinemii w krótkim okresie po infekcji. Po 3 miesiącach poziom Hcy wynosił 11,65 nmol/ml, a po 6 miesiącach 10,81 nmol/ml, co nadal wskazywało na utrzymujące się podwyższone wartości w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, choć zauważalny był wyraźny trend spadkowy. W grupie osób zaszczepionych przeciwko COVID-19, u których nigdy nie stwierdzono zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 (grupa A) poziom Hcy również wzrósł po 2 tygodniach (12,14 nmol/ml), osiągając wartość wyższą niż w grupie kontrolnej, ale niższą niż w grupach B i C. Po 3 i 6 miesiącach poziom Hcy stopniowo spadał (11,08 nmol/ml i 10,80 nmol/ml), choć nadal pozostawał nieco wyższy niż w grupie kontrolnej. Ryzyko hiperhomocysteinemii w tej grupie było niższe niż w grupach B i C, ale wymagało dalszego monitorowania. W grupie ozdrowieńców zaszczepionych przeciwko COVID-19 (grupa B) zaobserwowano najwyższe stężenia tioli we wszystkich formach po 2 tygodniach, co sugeruje silniejszy stres oksydacyjny u pacjentów z tej grupy. Po 6 miesiącach poziomy te nadal były wyższe niż w grupie kontrolnej, co może wskazywać na dłuższy proces regeneracji organizmu. Wzrost stężenia tioli po szczepieniu był zauważalny, ale mniej intensywny niż w grupie B. Po 6 miesiącach poziomy aminotioili w grupie A niemal całkowicie powróciły do wartości kontrolnych, co sugeruje krótszy czas regeneracji i mniejsze obciążenie układu sercowo-naczyniowego w wyniku szczepienia. Reakcja organizmu w grupie C plasowała się

pomiędzy grupami A i B. Wzrost stężenia tioli po 2 tygodniach był mniejszy niż w grupie B, ale większy niż w grupie A. Proces adaptacji po 6 miesiącach był także wolniejszy niż w grupie A.



Rysunek 82. Zmiana stężenia Hcy w czasie w różnych grupach badanych w porównaniu do grupy kontrolnej

Początkowy wzrost stężenia tioli w grupach A, B i C po 2 tygodniach sugeruje reakcję organizmu na czynnik stresowy lub interwencję. Stopniowy spadek stężeń w kolejnych miesiącach może wskazywać na adaptację organizmu lub skuteczność podjętych działań redukujących stres oksydacyjny. Największe odchylenia obserwuje się w grupie B, prawdopodobnie z powodu większej ekspozycji na stres i intensywniejszej interwencji. Wyniki badań pozwalają stwierdzić, że szczepienie powoduje mniejszy i krótkotrwały stres oksydacyjny, a organizm regeneruje się szybciej, co wskazuje na korzystniejszy wpływ na układ sercowo-naczyniowy w porównaniu do infekcji. Niskie wartości %RSD w większości pomiarów świadczą o dobrej precyzji i powtarzalności wyników. Wyższe %RSD w niektórych pomiarach, zwłaszcza w grupach B i C, mogą wskazywać na większą heterogeniczność w tych grupach.

W przeprowadzonych analizach statystycznych oceniono wpływ czasu oraz przynależności do konkretnej grupy badanej na zmiany stężeń różnych form redoks badanych tioli. W niniejszej części przedstawiono wyniki uzyskane dla tioli całkowitych. W przypadku Cys, test Mauchly'ego wykazał naruszenie założenia sferyczności ($\chi^2(2) = 6,063$, $p = 0,048$), w związku z czym w dalszych analizach zastosowano korekcję Greenhouse-Geissera ($\epsilon = 0,512$), celem uzyskania wiarygodnych wyników analizy

wariancji dla powtarzanych pomiarów. Analiza ta wykazała brak istotnych różnic w poziomie Cys pomiędzy grupami badanymi ($F(3,6) = 1,47$, $p = 0,315$). Zmiany w czasie także nie osiągnęły istotności statystycznej ($F(2,6) = 5,00$, $p = 0,0527$), choć wyniki wskazują na trend spadkowy w kolejnych punktach pomiarowych. Może on jednak wynikać z losowych fluktuacji, a nie rzeczywistego efektu biologicznego. Pomimo wartości p bliskiej progu istotności, formalnie nie można odrzucić hipotezy zerowej o braku zmian w czasie. Ponadto analiza interakcji między badanymi czynnikami (grupa i czas) nie wykazała istotnego efektu, co oznacza, że zmiany w poziomie Cys w czasie przebiegały podobnie we wszystkich grupach badanych. Jednym z możliwych wyjaśnień braku istotnych różnic jest niewielka liczebność próby, co mogło ograniczyć moc testu i zdolność wykrycia subtelnych zmian. W przypadku Cys-Gly, założenie sferyczności zostało spełnione ($\chi^2(2) = 3,329$, $p = 0,189$), w związku z czym analizę przeprowadzono bez zastosowania korekcji. Analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnych różnic w stężeniu Cys-Gly między grupami badanymi ($F(3,6) = 0,62$, $p = 0,627$), co oznacza, że niezależnie od przynależności do danej grupy, poziom tego aminotiolu nie różnił się istotnie pomiędzy uczestnikami badania. Efekt czasu również nie osiągnął istotności statystycznej ($F(2,6) = 1,30$, $p = 0,341$), mimo że średnie wartości wskazują na niewielki trend spadkowy w kolejnych punktach czasowych, co sugeruje, że zmiany wynikają raczej z naturalnej zmienności biologicznej, a nie badanego czynnika. Analiza interakcji między grupą a czasem wykazała, że zmiany poziomu Cys-Gly w czasie przebiegały w sposób podobny we wszystkich grupach badanych. W przypadku Hcy, test Mauchly'ego wykazał naruszenie sferyczności ($\chi^2(2) = 7,755$, $p = 0,021$), w związku z czym zastosowano korekcję Greenhouse-Geissera ($\epsilon = 0,505$). Analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów nie wykazała istotnych różnic zarówno w czasie ($F(1,01, 3,03) = 3,34$, $p = 0,164$), jak i między grupami ($F(3,6) = 1,85$, $p = 0,240$), co oznacza brak jednoznacznych dowodów na wpływ szczepienia lub przebytej infekcji na długoterminowe zmiany w poziomie Hcy w osoczu. Średnie wartości wynosiły 12,43 nmol/ml osocza (2 tygodnie), 10,59 nmol/ml osocza (3 miesiące) oraz 10,00 nmol/ml osocza (6 miesięcy), wskazując na ogólny trend spadkowy, lecz bez istotnych różnic statystycznych. Wzrost stężenia Hcy po przebytej infekcji lub szczepieniu może wskazywać na przejściowe zaburzenia w cyklu metioniny i metylacji, związane z odpowiedzią zapalną organizmu. W badanych grupach zauważono tendencję spadkową Hcy w kolejnych miesiącach, co może sugerować stopniową normalizację metabolizmu siarkowego. Brak istotnych różnic między grupami może wynikać z dużej

heterogeniczności odpowiedzi organizmu na stres oksydacyjny oraz z mechanizmów kompensacyjnych regulujących metabolizm Hcy. Choć brak istotności statystycznej wskazuje na ograniczony wpływ czynników badanych na długoterminowe zmiany w poziomie Hcy, wyniki sugerują potencjalne krótkoterminowe zaburzenia metaboliczne w pierwszych tygodniach po szczepieniu przeciwko COVID-19 lub przebytej infekcji. Warto zauważyć, że poziom Hcy w grupach B i C były wyższe niż w grupie kontrolnej po 2 tygodniach, co może wskazywać na przejściowe zwiększenie ryzyka hiperhomocysteinemii, potencjalnie związane z nasilonym stresem oksydacyjnym i procesami zapalnymi. Brak statystycznie istotnych różnic może być również efektem niewielkiej liczebności próby oraz indywidualnych różnic w metabolizmie uczestników. Dla GSH, założenie sferyczności nie zostało naruszone ($\chi^2(2) = 2,268$, $p = 0,322$), co pozwoliło na zastosowanie klasycznej ANOVY dla powtarzanych pomiarów, bez konieczności korygowania danych. Wyniki analizy wariancji wykazały istotny efekt czasu ($F(2,6) = 6,22$, $p = 0,034$), co wskazywało, że stężenie GSH znacząco zmieniał się w czasie. Efekt grupy nie był istotny ($F(3,6) = 0,770$), $p = 0,551$), co oznacza, że pomimo różnic w średnich stężeniach GSH w próbkach osocza pomiędzy grupami, to nie były one wystarczająco duże, aby uznać je za istotne statystycznie. W celu dokładnego oszacowania różnic między poszczególnymi punktami czasowymi, przeprowadzono test Bonferroniego (test post-hoc). Korekcja ta obniżyła poziom istotności do 0,01667, co znacznie zwiększyło restrykcyjność testu. Mimo że pierwotna analiza ANOVA wskazywała na istotny efekt czasu, analiza porównań wielokrotnych nie potwierdziła istotnych różnic między poszczególnymi punktami czasowymi (2 tygodnie vs 3 miesiące: $p = 0,1313$; 2 tygodnie vs 6 miesięcy: $p = 0,06698$; 3 miesiące vs 6 miesięcy: $p = 0,08548$), co może wynikać z niewielkiej liczebności próby. W przypadku γ -Glu-Cys, wyniki testu Mauchly'ego ($\chi^2(2) = 2,875$, $p = 0,238$) wskazują, że założenie sferyczności nie zostało odrzucone, co oznacza, że wariancje różnic między powtórzonymi pomiarami są podobne i nie ma potrzeby stosowania korekcji. ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ czasu na poziom γ -Glu-Cys w osoczu ($F(2,6) = 5,88$, $p = 0,039$), co oznacza, że stężenie tego aminotiolu ulegało istotnej zmianie w czasie. Nie wykryto natomiast istotnego wpływu przynależności do danej grupy badanej ($F(3,6) = 3,83$, $p = 0,076$), co oznacza, że różnice w stężeniu γ -Glu-Cys nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej pomiędzy uczestnikami. Po uwzględnieniu korekcji Bonferroniego (skorygowane $\alpha = 0,01667$), analiza porównań wielokrotnych nie wykazała istotnych

statystycznie różnic pomiędzy punktami czasowymi (2 tygodnie vs 3 miesiące: $p = 0,096$; 2 tygodnie vs 6 miesięcy: $p = 0,087$; 3 miesiące vs 6 miesięcy: $p = 0,166$).

W dalszej części podrozdziału przedstawiono wyniki analiz statystycznych uzyskanych dla tioli zredukowanych. W przypadku Cys, test Mauchly'ego wykazał naruszenie założenia sferyczności ($\chi^2(2) = 15,087$, $p < 0,001$), w związku z czym, celem korekcy błędu I rodzaju, zastosowano poprawkę Greenhouse-Geissera ($\epsilon = 0,5$), co dostosowało stopnie swobody w analizie wariancji. Wyniki ANOVA dla powtarzanych pomiarów sugerują tendencję do zmniejszania się poziomu Cys w czasie ($F(1,3) = 6,997$, $p = 0,077$), jednak efekt ten nie osiągnął poziomu istotności statystycznej. Analiza różnic między grupami także nie wykazała istotnego wpływu tego czynnika ($F(3,6) = 2,93$, $p = 0,122$), co oznacza, że wartości zredukowanej Cys nie różnią się istotnie między badanymi grupami. Dalsza analiza porównań wielokrotnych wskazuje na możliwe różnice pomiędzy poszczególnymi przedziałami czasowymi, ale jedynie porównanie 3 miesięcy z 6 miesiącami osiągnęło poziom bliski istotności ($p = 0,019$). Po zastosowaniu korekty Bonferroniego (skorygowane $\alpha = 0,01667$), różnica ta przestała być istotna, co sugeruje, że obserwowane zmiany mogą wynikać z naturalnej zmienności danych lub niewystarczającej liczebności próby. W przypadku zredukowanej Cys-Gly, test Mauchly'ego nie wykazał naruszenia założenia sferyczności ($\chi^2(2) = 3,621$, $p = 0,164$), co oznacza, że można było zastosować standardową analizę wariancji dla powtarzanych pomiarów bez konieczności stosowania korekcy. Wyniki ANOVA dla powtarzanych pomiarów ujawniły istotny wpływ czasu na poziom Cys-Gly ($F(2,6) = 5,69$, $p = 0,041$), wskazując na spadek stężenia tego związku w kolejnych punktach czasowych. Z kolei analiza różnic między grupami nie wykazała istotnego wpływu tego czynnika na poziom Cys-Gly w osoczu ($F(3,6) = 2,164$, $p = 0,193$), co oznacza, że zmiany w stężeniu zredukowanej formy tego aminotiolu są raczej konsekwencją efektu czasowego niż przynależności do określonej grupy badanej. Dalsza analiza porównań wielokrotnych wykazała, że największe różnice obserwowano pomiędzy 2. tygodniem a 6. miesiącem ($\Delta = 0,9525$, $F = 6,8254$, $p = 0,079$) oraz pomiędzy 3. a 6. miesiącem ($\Delta = 0,4475$, $F = 20,2834$, $p = 0,020$). Po zastosowaniu korekcy Bonferroniego (skorygowane $\alpha = 0,01667$) żadna z tych różnic nie osiągnęła progu istotności statystycznej. W przypadku Hcy zredukowanej, test Mauchly'ego wykazał, że założenie sferyczności nie zostało naruszone ($\chi^2(2) = 4,402$, $p = 0,111$). Przeprowadzona analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wskazała na istotny wpływ czasu na zmiany poziomu Hcy ($F(2,6) = 7,44$, $p = 0,024$), choć jednocześnie nie odnotowano istotnych

różnic między badanymi grupami ($F(3,6) = 2,27$, $p = 0,181$). Może to oznaczać, że obserwowane zmiany są w większym stopniu związane z upływem czasu niż z przynależnością do konkretnej grupy eksperymentalnej. Analiza porównań post-hoc wykazała, że największa różnica w poziomie Hcy zredukowanej wystąpiła między 2. tygodniem a 6. miesiącem ($\Delta = 0,375$, $F = 7,6809$, $p = 0,069$), chociaż różnica między 2. tygodniem a 3. miesiącem również była zauważalna ($\Delta = 0,2675$, $F = 7,2846$, $p = 0,074$). Niemniej jednak po uwzględnieniu korekcji Bonferroniego ($\alpha = 0,01667$) żadna z tych różnic nie osiągnęła progu istotności statystycznej, co sugeruje potrzebę dalszych badań na większej próbie w celu jednoznacznego potwierdzenia trendu spadkowego. W przypadku GSH zredukowanego, test Mauchly'ego wykazał, że założenie sferyczności nie zostało naruszone ($\chi^2(2) = 1,307$, $p = 0,520$), co pozwala na bezpośrednią interpretację wyników analizy wariancji bez konieczności stosowania korekcji stopni swobody. Analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny efekt czasu na zmiany stężenia GSH w osoczu ($F(2,6) = 5,28$, $p = 0,048$). Zaobserwowano systematyczny spadek jego poziomu w kolejnych punktach czasowych, od 5,58 po 2 tygodniach, przez 4,92 po 3 miesiącach, aż do 4,35 po 6 miesiącach. Efekt różnic pomiędzy grupami nie osiągnął progu istotności statystycznej ($F(3,6) = 1,992$, $p = 0,217$), co sugeruje, że zmiany w poziomie zredukowanego GSH są przede wszystkim konsekwencją upływu czasu, a nie czynnika grupowego. Analiza porównań post-hoc ujawniła, że największa różnica występuje między 2. tygodniem a 6. miesiącem ($\Delta = 1,23$, $F = 6,7175$, $p = 0,081$), co potwierdza wyraźny trend spadkowy. Różnica między 3. a 6. miesiącem również była zauważalna ($\Delta = 0,57$, $F = 6,0153$, $p = 0,091$), choć po zastosowaniu korekcji Bonferroniego (skorygowane $\alpha = 0,01667$) żadna z par porównań nie osiągnęła istotności statystycznej. W przypadku γ -Glu-Cys, nie wykazano naruszenia założenia sferyczności ($\chi^2(2) = 1,307$, $p = 0,520$), co oznacza, że standardowa analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów jest odpowiednia do interpretacji wyników. Przeprowadzona analiza wykazała istotny wpływ czasu na zmianę poziomu zredukowanej γ -Glu-Cys w osoczu, co potwierdzono wynikiem $F(2,6) = 5,28$, $p = 0,048$. Uzyskane rezultaty wskazują zatem na statystycznie istotny trend spadkowy w ciągu analizowanego okresu. Czynniki grupowy nie wpłynął istotnie na poziom analitu ($F(3,6) = 1,992$, $p = 0,217$), co sugeruje, że obserwowane zmiany są związane przede wszystkim z efektem czasu, a nie z różnicami między grupami badanymi. Analiza porównań wielokrotnych wskazała, że największa różnica w stężeniu γ -Glu-Cys występuje pomiędzy 2. tygodniem a 6. miesiącem ($\Delta = 1,23$, $F = 6,7175$, $p = 0,081$), co sugeruje istotną dynamikę spadku tego związku w czasie.

Spadek zawartości aminotiolu w osoczu między 3. a 6. miesiącem również był wyraźny ($\Delta = 0,57$, $F = 6,0153$, $p = 0,091$), choć w obu przypadkach po zastosowaniu korekcji Bonferroniego ($\alpha = 0,01667$) wartości te nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej.

Poniżej zaprezentowano wyniki dla tioli wolnych. Test sferyczności Mauchly'ego nie wykazał naruszenia założeń ($\chi^2(2) = 4,283$, $p = 0,117$), co pozwala na zastosowanie standardowej analizy wariancji dla pomiarów powtarzanych. Test ANOVA dla pomiarów powtarzanych wykazał istotny wpływ czasu na poziom wolnej Cys ($F(2,6) = 7,05$, $p = 0,027$), co wskazuje na stopniowy spadek jej stężenia w czasie. Analiza składników wariancji wykazała brak istotnych różnic między badanymi grupami ($F(3,6) = 1,68$, $p = 0,268$). Analiza porównań wielokrotnych nie wykazała istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi po zastosowaniu korekty Bonferroniego ($\alpha = 0,01667$). Najniższą wartość p zaobserwowano dla różnicy między 3. a 6. miesiącem ($F = 9,93$, $p = 0,051$), co sugeruje trend spadkowy, choć nie osiąga on poziomu istotności statystycznej. Test Mauchly'ego dla wolnej Cys-Gly wykazał naruszenie założenia sferyczności, $\chi^2(2) = 8,922$, $p = 0,012$, co wymagało zastosowania korekty Greenhouse-Geissera ($\varepsilon = 0,503$) w analizie wariancji dla pomiarów powtarzanych. ANOVA dla pomiarów powtarzanych wykazała, że efekt czasu nie osiągnął istotności statystycznej, $F(1,01, 3,02) = 7,83$, $p = 0,068$, co sugeruje brak jednoznacznych dowodów na znaczącą zmianę poziomu Cys-Gly w osoczu w czasie. Średnie wartości stężenia wynosiły 11,07 nmol/ml osocza po 2 tygodniach, 9,13 nmol/ml osocza po 3 miesiącach oraz 8,76 nmol/ml osocza po 6 miesiącach. Zaobserwowano również brak istotnych różnic między grupami badanymi ($F(3,6) = 1,78$, $p = 0,251$). Porównania wielokrotne wykazały, że żadna z różnic między poszczególnymi punktami czasowymi nie była istotna statystycznie przy zastosowaniu korekty Bonferroniego ($\alpha = 0,01667$). Największe różnice zaobserwowano pomiędzy 2. tygodniem a 6. miesiącem ($F = 7,69$, $p = 0,069$), co może wskazywać na tendencję spadkową, choć wynik nie przekracza ustalonego progu istotności. Test Mauchly'ego dla wolnej Hcy wykazał naruszenie założenia sferyczności ($\chi^2(2) = 7,256$, $p = 0,027$), co uzasadniało zastosowanie korekty Greenhouse-Geissera ($\varepsilon = 0,507$). Analiza wariancji dla pomiarów powtarzanych wykazała brak istotnego wpływu czasu na zmienną zależną ($F(1,01, 3,04) = 8,50$, $p = 0,061$), co sugeruje tendencję do zmian poziomu wolnej Hcy w czasie, jednak bez osiągnięcia progu istotności statystycznej. Czynniki grupowy nie wykazał istotnego wpływu ($F(3,6) = 2,64$, $p = 0,144$), co oznacza, że zmienność między uczestnikami badania nie była istotnym źródłem różnic w osoczym poziomie Hcy w analizowanym okresie. Porównania wielokrotne

wykazały, że różnice pomiędzy poszczególnymi przedziałami czasowymi nie były istotne statystycznie przy zastosowaniu korekcji Bonferroniego ($\alpha = 0,01667$). Najbardziej zauważalny trend zaobserwowano między 2. tygodniem a 6. miesiącem badania ($F = 8,84$, $p = 0,059$) oraz między 3. a 6. miesiącem ($F = 12,15$, $p = 0,040$), jednak wartości te nie spełniały rygorystycznych kryteriów istotności po uwzględnieniu korekcji dla wielokrotnych porównań. Dla wolnego GSH, test Mauchly'ego wykazał naruszenie założenia sferyczności ($\chi^2(2) = 8,868$, $p = 0,012$), w związku z czym zdecydowano o zastosowaniu korekty Greenhouse-Geissera ($\varepsilon = 0,503$). Analiza wariancji dla czynnika grupowego nie wykazała istotnych różnic między uczestnikami eksperymentu ($F(3,6) = 1,88$, $p = 0,233$). Efekt czasu przed korektą sferyczności był istotny statystycznie ($F(2,6) = 8,24$, $p = 0,019$), co sugeruje, że poziom wolnego GSH zmieniał się w analizowanym okresie. Jednak po zastosowaniu korekcji Greenhouse-Geissera efekt ten przestał być statystycznie istotny ($F(1,01, 3,02) = 8,24$, $p = 0,064$), co oznacza, że zmiany poziomu GSH w czasie nie osiągnęły progu istotności statystycznej. Porównania parami sugerują tendencję do obniżania się poziomu wolnego GSH w czasie, przy czym różnice między 2. tygodniem a 3. miesiącem ($p = 0,079$) oraz między 2. tygodniem a 6. miesiącem ($p = 0,060$) znajdują się blisko granicy istotności statystycznej. Natomiast różnica między 3. a 6. miesiącem była bardziej wyraźna ($p = 0,025$), choć po zastosowaniu korekcji Bonferroniego nie osiągnęła istotności (α skorygowane = $0,01667$). W przypadku wolnej γ -Glu-Cys, test Mauchly'ego wykazał spełnienie założenia sferyczności ($\chi^2(2) = 5,221$, $p = 0,073$). Analiza wariancji nie wykazała istotnego wpływu przynależności do grupy badanej na poziom formy wolnej tego aminotiolu w osoczu ($F(3,6) = 2,19$, $p = 0,190$). Z kolei efekt czasu był istotny statystycznie ($F(2,6) = 8,32$, $p = 0,019$), co wskazuje na zmiany stężenia γ -Glu-Cys w kolejnych pomiarach. Nie stwierdzono istotnej interakcji między czasem a grupą, co oznacza, że obserwowany spadek poziomu wolnej γ -Glu-Cys następował w podobnym stopniu we wszystkich analizowanych grupach. Różnica między 3. a 6. miesiącem była istotna statystycznie ($p = 0,049$), natomiast różnice między 2. tygodniem a 3. miesiącem ($p = 0,080$) oraz między 2. tygodniem a 6. miesiącem ($p = 0,061$) znajdowały się blisko granicy istotności.

Na koniec przeprowadzono analizę statystyczną dla tioli związanych z białkami, a wyniki zaprezentowano poniżej. Analiza wariancji nie wykazała istotnego wpływu przynależności do grupy eksperymentalnej (A, B lub C) lub kontrolnej na poziom Cys związanej z białkiem w osoczu ($F(3,6) = 2,73$, $p = 0,136$), co oznacza, że średnie poziomy w poszczególnych grupach nie różniły się w sposób istotny statystycznie. Natomiast

ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ czasu na poziom tego tiolu w osoczu ($F(2,6) = 8,69$, $p = 0,017$), sugerując, że jego stężenie zmieniało się w kolejnych punktach czasowych. Ze względu na naruszenie założenia sferyczności zastosowano korektę Greenhouse-Geissera ($\epsilon = 0,51$), po której efekt czasu pozostawał na granicy istotności, $F(1,03, 3,08) = 8,69$, $p = 0,058$. Średnie wartości Cys związanej z białkami malały w czasie, wynosząc odpowiednio 25,23 nmol/ml osocza po 2 tygodniach, 14,94 nmol/ml osocza po 3 miesiącach oraz 40,17 nmol/ml osocza po 6 miesiącach. Nie stwierdzono istotnej interakcji między czasem a grupą, co oznacza, że zmiany poziomu Cys w osoczu były podobne we wszystkich analizowanych grupach. Analiza porównań wielokrotnych wykazała istotną różnicę między 2. tygodniem a 3. miesiącem ($p = 0,047$), podczas gdy różnica między 2. tygodniem a 6. miesiącem znajdowała się blisko granicy istotności ($p = 0,060$). Natomiast różnica między 3. a 6. miesiącem nie była istotna statystycznie ($p = 0,094$). Uzyskane wyniki sugerują, że poziom Cys związanej z białkiem w osoczu zmieniał się w czasie niezależnie od przynależności do grupy badawczej, co wskazuje, że zaobserwowane spadki były bardziej związane z upływem czasu niż z zastosowaną interwencją. W przypadku Cys-Gly związanej z białkiem, wyniki testu Mauchly'ego wskazują, że założenie sferyczności nie zostało odrzucone ($\chi^2(2) = 3,768$, $p = 0,152$), co oznacza, że warunek ten nie został naruszony. Wyniki analizy wariancji dla czynnika międzyobiektowego wykazały brak istotnych statystycznie różnic między grupami badanymi ($F(3,6) = 1,86$, $p = 0,237$). Analiza wariancji dla czynnika wewnątrzobiektowego (zmiany w czasie) wykazała istotny efekt ($F(2,6) = 8,66$, $p = 0,017$). Oznacza to, że poziom Cys-Gly w osoczu istotnie zmienia się w czasie. Wskazuje to na tendencję do spadku poziomu Cys-Gly związanej z białkiem w osoczu wraz z upływem czasu. Aby dokładniej określić, które punkty czasowe różnią się od siebie, przeprowadzono testy post-hoc. Zastosowano korekcję Bonferroniego dla wielokrotnych porównań, co obniżyło poziom istotności do $\alpha = 0,01667$. Porównania wielokrotne nie wykazały istotnych różnic między poszczególnymi punktami czasowymi po korekcji Bonferroniego, choć trend spadkowy był widoczny. W przypadku Hcy związanej z białkiem, test sferyczności Mauchly'ego wykazał, że założenie zostało naruszone ($\chi^2(2) = 8,164$, $p = 0,017$). W związku z tym zastosowano korekcję Greenhouse-Geissera ($\epsilon = 0,504$) w celu dostosowania liczby stopni swobody i uzyskania bardziej rzetelnych wyników analizy wariancji. Analiza wariancji dla czynnika międzyobiektowego wykazała brak istotnych statystycznie różnic w poziomie Hcy związanej z białkami pomiędzy grupami ($F(3,6) = 3,04$, $p = 0,1144$).

Oznacza to, że przynależność do jednej z czterech grup nie miała istotnego wpływu na poziom aminotiolu w osoczu. ANOVA dla powtarzanych pomiarów dla czynnika wewnątrzobiekowego z zastosowaniem korekcji Greenhouse-Geissera również wykazała brak istotnego efektu czasu na poziom Hcy w osoczu ($F(1,01, 3,03) = 7,52$, $p = 0,071$). Mimo że widoczny jest trend spadkowy w czasie, wartości p nie osiągnęły progu istotności statystycznej ($p < 0,05$), co sugeruje, że zmiany te mogą wynikać z naturalnej zmienności lub ograniczonej liczebności próby. Aby dokładniej określić potencjalne różnice między punktami czasowymi, przeprowadzono testy post-hoc. Ze względu na wielokrotne porównania zastosowano korekcję Bonferroniego, co obniżyło poziom istotności do $\alpha = 0,01667$. Chociaż wyniki sugerują spadek poziomu Hcy związanej z białkiem w czasie, to po zastosowaniu korekcji Bonferroniego żadna z różnic między punktami czasowymi nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej. Dla GSH związanego z białkiem, test Mauchly'ego nie wykazał naruszenia założenia sferyczności ($\chi^2(2) = 5,157$, $p = 0,076$), co oznacza, że zastosowanie klasycznej analizy ANOVA było uzasadnione. Analiza wariancji dla czynnika międzyobiekowego wykazała brak istotnych różnic w poziomie GSH między grupami ($F(3,6) = 3,90$, $p = 0,074$). Z kolei, analiza wariancji dla czynnika wewnątrzobiekowego wykazała istotny wpływ czasu na poziom GSH związanego z białkiem ($F(2,6) = 7,62$, $p = 0,023$). Po korekcji Bonferroniego ($\alpha = 0,01667$) jedynie różnica między 3. a 6. miesiącem ($p = 0,038$) była bliska istotności statystycznej, lecz nie przekroczyła skorygowanego progu istotności. Test Mauchly'ego nie wykazał naruszenia założenia sferyczności w przypadku γ -Glu-Cys związanej z białkiem ($\chi^2(2) = 4,45$, $p = 0,108$), co pozwoliło na zastosowanie klasycznej analizy wariancji, bez konieczności zastosowania korekty. Analiza wariancji dla czynnika międzyobiekowego nie wykazała istotnych różnic w poziomie γ -Glu-Cys związanej z białkiem pomiędzy grupami ($F(3,6) = 2,49$, $p = 0,158$), co sugeruje, że przynależność do określonej grupy badanej nie miała istotnego wpływu na poziom analizowanego tiolu. Analiza wariancji dla czynnika wewnątrzobiekowego wykazała istotny wpływ czasu na poziom γ -Glu-Cys ($F(2,6) = 5,74$, $p = 0,040$), co wskazuje na znaczącą zmianę w czasie. Średnie stężenia γ -Glu-Cys związanej z białkiem w kolejnych punktach czasowych wynosiły: 1,50 nmol/ml osocza po 2 tygodniach, 1,19 nmol/ml osocza po 3 miesiącach oraz 1,00 nmol/ml osocza po upływie 6 miesięcy. Po korekcji Bonferroniego ($\alpha = 0,01667$) jedynie różnica między 3. a 6. miesiącem ($p = 0,038$) była bliska istotności statystycznej, lecz nie przekroczyła skorygowanego progu istotności.

Według stanu wiedzy obowiązującego w trakcie trwania niniejszego badania, przeprowadzony eksperyment był pierwszym, który obejmował dłuższy okres obserwacji osób po przebytej infekcji SARS-CoV-2 oraz zaszczepionych przeciwko COVID-19, co umożliwiło ocenę potencjalnych długofalowych konsekwencji dysregulacji szlaku metabolicznego tioli oraz ich możliwej roli w patogenezie powikłań sercowo-naczyniowych. Ponadto po raz pierwszy w tak długim okresie obserwacji uwzględniono szeroki panel niskocząsteczkowych tioli, obejmujący Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly oraz γ -Glu-Cys, pozwalając na identyfikację istotnych korelacji między tymi związkami a potencjalnym ryzykiem powikłań zakrzepowo-zatorowych u ochotników z grup badanych w czasie. Uzyskane wyniki dostarczają istotnych danych na temat mechanizmów leżących u podstaw stresu oksydacyjnego indukowanego zarówno przez zakażenie SARS-CoV-2, jak i przez odpowiedź immunologiczną organizmu na podanie szczepionki. Ocena długofalowych zmian w homeostazie tioli w osoczu pozwala na lepsze zrozumienie możliwych skutków tych procesów na organizm człowieka, co może mieć znaczenie dla przyszłych badań nad profilaktyką i leczeniem powikłań związanych z chorobami zakaźnymi wywoływanymi przez koronawirusy. Ponadto analiza zmian biotiole w tak długim okresie po infekcji i szczepieniu może przyczynić się do identyfikacji wczesnych wskaźników ryzyka rozwoju późnych powikłań sercowo-naczyniowych, które do tej pory nie zostały w pełni poznane. Wyniki niniejszego badania mogą stanowić istotny punkt wyjścia do dalszych prac nad rolą biotiole jako biomarkerów stresu oksydacyjnego i ich znaczeniem w kontekście chorób sercowo-naczyniowych towarzyszących infekcjom wirusowym. Wiedza ta może również przyczynić się do opracowania nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych, pozwalających na lepsze monitorowanie i przeciwdziałanie negatywnym skutkom długotrwałych zmian w organizmie wywołanych przez SARS-CoV-2 oraz odpowiedź immunologiczną na szczepienie.

Tabela 14. Wyniki oznaczeń końcowych

<u>Tiole całkowite</u>							
Parametr		Stężenie (nmol/ml)	Cys	Cys-Gly	Hcy	GSH	γ-Glu-Cys
Grupa kontrolna	2	Średnia (SD)	245,35 (9,52)	23,85 (1,42)	9,40 (0,51)	8,46 (0,22)	4,81 (0,14)
	tygodnie	%RSD	3,89	5,95	5,43	2,60	2,91
	3	Średnia (SD)	244,62 (7,41)	24,01 (1,14)	9,52 (0,87)	8,49 (0,91)	4,79 (0,45)
	miesiące	%RSD	3,03	4,75	9,14	10,72	9,4
	6	Średnia (SD)	246,81 (5,36)	24,87 (0,82)	9,32 (1,13)	8,41 (0,55)	4,76 (0,37)
	miesiący	%RSD	2,17	3,30	12,1	6,54	7,77
Grupa A	2	Średnia (SD)	275,41 (10,31)	27,52 (1,53)	12,14 (0,61)	9,14 (0,24)	4,99 (0,09)
	tygodnie	%RSD	3,74	5,56	5,02	2,63	1,80
	3	Średnia (SD)	241,80 (9,57)	23,75 (1,43)	11,08 (0,58)	8,48 (0,23)	4,82 (0,09)
	miesiące	%RSD	3,96	6,02	5,23	2,71	1,87
	6	Średnia (SD)	238,54 (9,39)	23,32 (1,41)	10,80 (0,68)	8,07 (0,20)	4,76 (0,08)
	miesiący	%RSD	3,94	6,05	6,30	2,48	1,68
Grupa B	2	Średnia (SD)	302,06 (2,07)	28,10 (3,11)	15,09 (0,81)	9,81 (0,34)	4,83 (0,41)
	tygodnie	%RSD	0,69	11,07	5,37	3,47	8,49
		Średnia (SD)	254,32 (12,09)	24,19 (2,95)	10,12 (0,29)	8,11 (0,48)	4,26 (0,24)

	3 miesiące	%RSD	4,75	12,20	2,87	5,92	5,63
	6 miesiące	Średnia (SD)	244,89 (17,72)	23,29 (2,31)	9,08 (0,40)	7,93 (0,68)	4,20 (0,18)
Grupa C		%RSD	7,24	9,92	4,41	8,58	4,29
	2 tygodnie	Średnia (SD)	260,12 (17,06)	22,70 (2,93)	13,08 (0,75)	9,61 (0,38)	4,95 (0,19)
		%RSD	6,56	12,91	5,73	3,95	3,84
	3 miesiące	Średnia (SD)	247,37 (13,60)	24,23 (1,59)	11,65 (0,76)	8,99 (0,75)	4,48 (0,15)
		%RSD	5,50	6,56	6,52	8,34	3,35
	6 miesiące	Średnia (SD)	240,76 (10,84)	23,30 (3,63)	10,81 (0,62)	8,31 (0,78)	4,19 (0,09)
		%RSD	4,50	15,58	5,74	9,39	2,15
<u>Tiole zredukowane</u>							
Parametr		Stężenie (nmol/ml)	Cys	Cys-Gly	Hcy	GSH	γ-Glu-Cys
Grupa kontrolna	2 tygodnie	Średnia (SD)	14,95 (0,26)	3,37 (0,14)	0,09 (0,01)	4,33 (0,13)	3,23 (0,11)
		%RSD	1,74	4,15	11,11	3,00	3,41
	3 miesiące	Średnia (SD)	15,02 (0,58)	3,69 (0,18)	0,10 (0,01)	4,35 (0,09)	3,11 (0,12)
		%RSD	3,86	4,88	10,00	2,07	3,86
	6 miesiące	Średnia (SD)	14,72 (0,33)	3,41 (0,11)	0,11 (0,01)	4,28 (0,07)	3,20 (0,09)
		%RSD	2,24	3,23	9,09	1,64	2,81
Grupa A		Średnia (SD)	16,23 (0,32)	4,32 (0,15)	0,55 (0,02)	5,41 (0,29)	4,03 (0,02)

Grupa B	2	%RSD	1,97	3,47	3,64	5,36	3,11
	tygodnie						
	3	Średnia (SD)	15,47 (0,27)	3,95 (0,13)	0,29 (0,09)	5,14 (0,08)	3,73 (0,03)
	miesiące	%RSD	1,38	2,97	3,02	5,88	4,96
	6	Średnia (SD)	14,98 (0,20)	3,42 (0,15)	0,11 (0,01)	4,51 (0,34)	3,28 (0,09)
	miesiący	%RSD	1,34	4,39	9,09	7,54	2,74
	2	Średnia (SD)	18,21 (0,32)	5,19 (0,17)	0,72 (0,01)	6,47 (0,14)	4,59 (0,10)
	tygodnie	%RSD	1,76	3,28	1,39	2,16	2,18
	3	Średnia (SD)	16,02 (0,34)	4,23 (0,21)	0,30 (0,13)	4,71 (0,19)	3,78 (0,12)
	miesiące	%RSD	2,12	4,96	4,33	4,03	3,17
	6	Średnia (SD)	15,12 (0,41)	3,54 (0,26)	0,13 (0,01)	4,31 (0,08)	3,29 (0,03)
	miesiący	%RSD	2,71	7,34	7,69	1,86	0,91
Grupa C	2	Średnia (SD)	17,03 (0,22)	4,71 (0,14)	0,61 (0,08)	6,12 (0,11)	4,30 (0,12)
	tygodnie	%RSD	1,29	2,97	13,11	1,80	2,79
	3	Średnia (SD)	15,52 (0,38)	3,70 (0,19)	0,21 (0,03)	5,48 (0,27)	3,58 (0,07)
	miesiące	%RSD	2,45	5,14	14,29	4,93	1,96
	6	Średnia (SD)	14,83 (0,41)	3,41 (0,12)	0,12 (0,02)	4,31 (0,22)	3,18 (0,08)
	miesiący	%RSD	2,76	3,52	16,67	5,10	2,52
<u>Tiole wolne</u>							

Parametr		Stężenie (nmol/ml)	Cys	Cys-Gly	Hcy	GSH	γ-Glu-Cys
Grupa kontrolna	2	Średnia (SD)	73,39 (2,98)	8,70 (0,74)	2,72 (0,15)	1,51 (0,08)	0,98 (0,02)
	tygodnie	%RSD	4,06	8,51	5,51	5,30	2,04
	3	Średnia (SD)	74,02 (1,58)	8,58 (0,38)	2,80 (0,09)	1,63 (0,11)	1,01 (0,01)
	miesiące	%RSD	2,13	4,43	3,21	6,75	0,99
	6	Średnia (SD)	73,56 (3,12)	8,68 (0,54)	2,68 (0,11)	1,52 (0,07)	0,97 (0,03)
	miesiący	%RSD	4,24	6,22	4,10	4,61	3,09
Grupa A	2	Średnia (SD)	91,89 (3,45)	11,15 (0,78)	4,62 (0,23)	2,99 (0,11)	1,42 (0,09)
	tygodnie	%RSD	3,75	7,00	4,98	3,68	6,34
	3	Średnia (SD)	82,22 (3,18)	9,37 (1,12)	3,27 (0,17)	1,89 (0,10)	1,12 (0,03)
	miesiące	%RSD	3,87	11,95	5,20	5,29	2,68
	6	Średnia (SD)	72,88 (1,54)	8,88 (0,39)	2,71 (0,21)	1,48 (0,23)	0,96 (0,04)
	miesiący	%RSD	2,11	4,39	7,75	15,54	4,17
Grupa B	2	Średnia (SD)	103,48 (4,15)	12,59 (1,34)	5,31 (0,17)	3,25 (0,19)	1,62 (0,10)
	tygodnie	%RSD	4,01	10,64	3,20	5,85	6,17
	3	Średnia (SD)	80,22 (5,28)	9,33 (0,58)	3,56 (0,33)	2,02 (0,20)	1,23 (0,12)
	miesiące	%RSD	6,58	6,22	9,27	9,90	2,12
	6	Średnia (SD)	72,98 (1,39)	8,68 (0,12)	2,81 (0,16)	1,53 (0,07)	0,95 (0,05)
	miesiący	%RSD	1,90	1,38	5,69	4,58	5,26

Grupa C	2	Średnia (SD)	95,68 (2,82)	11,84 (0,54)	4,94 (0,33)	3,22 (0,15)	1,57 (0,07)
	tygodnie	%RSD	2,95	4,56	6,68	4,66	4,46
	3	Średnia (SD)	80,43 (2,48)	9,22 (0,19)	3,44 (0,15)	1,99 (0,12)	1,26 (0,09)
	miesiące	%RSD	3,08	2,06	4,36	6,03	7,14
	6	Średnia (SD)	72,86 (1,30)	8,78 (0,14)	3,02 (0,31)	1,63 (0,19)	0,95 (0,01)
	miesiące	%RSD	1,78	1,59	10,26	11,66	1,05
<u>Tiole związane z białkami</u>							
Parametr		Stężenie (nmol/ml)	Cys	Cys-Gly	Hcy	GSH	γ-Glu-Cys
Grupa kontrolna	2	Średnia (SD)	174,52 (5,13)	15,85 (0,70)	5,76 (0,25)	1,81 (0,06)	0,95 (0,03)
	tygodnie	%RSD	2,94	4,42	4,34	3,31	3,16
	3	Średnia (SD)	172,18 (2,14)	16,03 (1,12)	5,45 (0,18)	1,91 (0,11)	1,01 (0,05)
	miesiące	%RSD	1,24	6,99	3,30	5,76	4,95
	6	Średnia (SD)	173,89 (3,66)	15,42 (0,93)	5,58 (0,32)	1,72 (0,12)	0,97 (0,05)
	miesiące	%RSD	2,10	6,03	5,73	6,98	5,15
Grupa A	2	Średnia (SD)	222,38 (2,78)	19,23 (1,31)	8,44 (0,84)	3,44 (0,17)	1,45 (0,02)
	tygodnie	%RSD	1,25	6,81	9,95	4,94	1,38
	3	Średnia (SD)	193,39 (5,22)	16,55 (0,58)	6,31 (0,48)	2,28 (0,09)	1,23 (0,04)
	miesiące	%RSD	2,70	3,50	7,61	3,95	3,25
		Średnia (SD)	177,92 (3,14)	15,76 (0,62)	5,83 (0,42)	1,72 (0,02)	1,01 (0,01)

	6 miesiące	%RSD	1,76	3,93	7,20	1,16	0,99
Grupa B	2	Średnia (SD)	235,6 (5,37)	21,12 (1,14)	11,03 (0,38)	5,13 (0,97)	1,98 (0,12)
	tygodnie	%RSD	2,28	5,40	3,44	18,91	6,06
	3	Średnia (SD)	201,49 (2,65)	17,38 (0,65)	7,14 (0,89)	3,03 (0,19)	1,28 (0,06)
	miesiące	%RSD	1,32	3,74	12,46	6,27	4,69
	6	Średnia (SD)	173,56 (5,72)	14,96 (0,39)	5,55 (0,18)	2,12 (0,28)	1,08 (0,12)
	miesiące	%RSD	3,30	2,61	3,24	13,21	11,11
Grupa C	2	Średnia (SD)	224,98 (3,77)	20,56 (0,53)	10,12 (0,41)	4,33 (0,40)	1,62 (0,08)
	tygodnie	%RSD	1,68	2,58	4,05	9,24	4,94
	3	Średnia (SD)	189,50 (2,82)	17,89 (0,98)	7,33 (0,22)	3,15 (0,28)	1,22 (0,09)
	miesiące	%RSD	1,49	5,48	3,00	8,89	7,38
	6	Średnia (SD)	171,44 (5,12)	15,55 (0,51)	6,65 (0,56)	2,12 (0,22)	0,93 (0,04)
	miesiące	%RSD	2,99	3,28	8,42	10,38	4,30

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Choroby sercowo-naczyniowe stanowią istotne schorzenia współistniejące w przebiegu wielu patologii, a ich obecność może znacząco wpływać na przebieg i rokowanie chorób podstawowych. RZS to przewlekła choroba autoimmunologiczna o podłożu zapalnym, która nie tylko atakuje stawy, ale może również prowadzić do powikłań w układzie sercowo-naczyniowym ^[266,267]. Pacjenci z RZS są bardziej narażeni na rozwój miażdżycy oraz choroby niedokrwiennej serca. Często obserwuje się u nich zapalenie osierdzia, niewydolność serca, wady zastawek oraz zaburzenia rytmu i przewodzenia. Badania wykazały, że ryzyko zgonu z powodu chorób sercowo-naczyniowych u osób z RZS jest nawet o 50% wyższe niż w populacji ogólnej. Co więcej, rodzaj zastosowanej strategii terapeutycznej w RZS także wywiera znaczący wpływ na układ krążenia pacjentów ^[268]. Dla przykładu, niesteroidowe leki przeciwzapalne, zwłaszcza inhibitory COX-2, mogą zwiększać ryzyko chorób sercowo-naczyniowych. Kortykosteroidy wykazujące działanie przeciwzapalne mogą z kolei przyczyniać się do rozwoju miażdżycy. Z drugiej strony, syntetyczne leki modyfikujące przebieg choroby, takie jak metotreksat czy hydroksychlorochina, wykazują korzystny profil bezpieczeństwa sercowo-naczyniowego. Z tego powodu, wczesne rozpoznanie oraz kompleksowe monitorowanie i leczenie powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów z RZS są kluczowe dla poprawy ich rokowania oraz jakości życia. Opracowywanie nowoczesnych metod diagnostycznych, umożliwiających skuteczniejszą identyfikację kluczowych biomarkerów wskazujących na zwiększone ryzyko tych powikłań może przyczynić się do wcześniejszego wykrywania zmian patologicznych oraz bardziej spersonalizowanego podejścia terapeutycznego. Aspekt ten jest kluczowy również w przebiegu wielu chorób zakaźnych, co można było zaobserwować podczas wybuchu pandemii COVID-19, choroby wywołanej przez wirusa SARS-CoV-2. Infekcja koronawirusem może prowadzić do zapalenia mięśnia sercowego, zwiększonego zapotrzebowania na tlen, zatorowości płucnej oraz uogólnionej reakcji zapalnej w postaci burzy cytokinowej ^[269,270]. Wszystkie te czynniki mogą powodować arytmie, wstrząs kardiogeny oraz nagłą śmierć sercową. Ponadto pacjenci z istniejącymi chorobami sercowo-naczyniowymi są bardziej narażeni na ciężki przebieg COVID-19 oraz wyższe ryzyko zgonu. Zakażenie może prowadzić do dekompensacji istniejącej niewydolności serca lub rozwoju ostrej niewydolności serca *de novo*.

W badanej grupie pacjentów hospitalizowanych z powodu COVID-19, 14,3% doświadczyło powikłań sercowo-naczyniowych, z czego najczęstsze były arytmie [271]. W kontekście powyższych faktów, konieczne jest wdrażanie nowoczesnych metod analitycznych umożliwiających precyzyjną identyfikację biomarkerów ryzyka sercowo-naczyniowego. Rozwój i implementacja zaawansowanych technik separacyjnych mogą znacząco przyczynić się do wcześniejszego wykrywania zmian patologicznych oraz skuteczniejszego monitorowania pacjentów. Takie podejście pozwoli na lepszą ocenę ryzyka, optymalizację strategii terapeutycznych oraz poprawę rokowania pacjentów, co podkreśla istotność dalszych badań w tym obszarze.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej opracowano i zwalidowano trzy niezależne metody analityczne oparte na technice HPLC z różnymi sposobami detekcji, pozwalające na oznaczenie:

- sześciu niskocząsteczkowych tioli osocza, w tym cysteiny, homocysteiny, cysteinyloglicyny, glutationu, kwasu α -liponowego, N-acetylo-L-cysteiny oraz albuminy surowicy ludzkiej, z wykorzystaniem przedkolumnowej modyfikacji chemicznej analitów za pomocą monobromobimanu i detekcji fluorescencyjnej,
- wybranych analitów białkowych, w tym albuminy, insuliny, fibrynogenu, transferryny, mioglobiny oraz hemoglobiny, w płynach ustrojowych człowieka, przy użyciu detekcji rozpraszania światła przez odparowanie,
- różnych form redoks pięciu kluczowych związków tiolowych, w tym homocysteiny, cysteiny, glutationu, cysteinyloglicyny oraz γ -glutamyl-cysteiny, po derywatyzacji za pomocą 4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolu i z wykorzystaniem detekcji fluorescencyjnej.

Każda z metod została zaprojektowana w celu zapewnienia wysokiej selektywności, precyzji i czułości, umożliwiając jednoczesną analizę wielu związków endogennych o różnych właściwościach fizykochemicznych. Szczególną uwagę poświęcono związkom tiolowym oraz wybranym białkom osocza, ze względu na fakt, iż zmiany w ich stężeniu mogą dostarczać cennych informacji na temat przebiegu takich schorzeń, jak reumatoidalne zapalenie stawów czy COVID-19. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski końcowe:

1. Opracowane metody HPLC charakteryzują się wysoką czułością i selektywnością, co umożliwia precyzyjne oznaczanie zarówno niskocząsteczkowych związków tiolowych, jak i wybranych białek osocza.

Zastosowanie odpowiednich modyfikacji chemicznych oraz technik detekcji pozwoliło na efektywne rozdzielenie i identyfikację analitów w próbkach biologicznych.

2. Wykorzystanie odczynników fluorescencyjnych do znakowania niskocząsteczkowych tioli osocza, jak również albuminy, na etapie przygotowania próbek rzeczywistych do analizy, zwiększyło czułość opracowanych metod chromatograficznych, co umożliwiło wykrycie śladowych ilości tych związków w skomplikowanej matrycy biologicznej, jaką jest osocze krwi.
3. Zastosowanie detekcji rozpraszania światła przez odparowanie do oznaczenia wybranych białek endogennych pozwoliło na uproszczenie procedury przygotowania próbek płynów ustrojowych do jednego etapu, jakim było rozcieńczenie z użyciem neutralnego i przyjaznego dla środowiska rozpuszczalnika, tj. wody dejonizowanej.
4. Walidacja opracowanych metod bioanalitycznych została przeprowadzona zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi, a uzyskane wyniki potwierdziły ich wysoką jakość i przydatność do zastosowań klinicznych. Wszystkie oceniane parametry spełniały kryteria akceptacji.
5. Wyniki analizy wybranych związków tiolowych oraz białek osocza dostarczyły cennych informacji na temat ich roli w procesach patofizjologicznych, zwłaszcza w kontekście ryzyka sercowo-naczyniowego w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów oraz odpowiedzi organizmu na zakażenie SARS-CoV-2 i szczepienie przeciwko COVID-19. Uzyskane dane mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad mechanizmami tych schorzeń oraz nowymi biomarkerami diagnostycznymi.
6. Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały istotne różnice w poziomach badanych biomarkerów między grupami pacjentów a zdrową kontrolą, co może mieć znaczenie w diagnostyce i monitorowaniu chorób o podłożu zapalnym oraz sercowo-naczyniowym.
7. Zastosowanie zasad zielonej chemii analitycznej pozwoliło na częściową minimalizację wpływu prowadzonych analiz laboratoryjnych na środowisko, poprzez ograniczenie zużycia odczynników chemicznych oraz redukcję ilości odpadów. Wprowadzenie bardziej ekologicznych procedur przygotowania próbek

i metod analitycznych wpisuje się w nowoczesne standardy prowadzenia badań bioanalitycznych.

8. Uzyskane wyniki otwierają perspektywy dla dalszych badań nad wdrożeniem opracowanych metod do rutynowej diagnostyki, co może przyczynić się do poprawy wczesnego wykrywania ryzyka sercowo-naczyniowego oraz skuteczniejszej prewencji i leczenia chorób przewlekłych.

Przeprowadzone analizy statystyczne pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków klinicznych:

1. Wyniki stężeń tioli całkowitych w osoczu osób zdrowych są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, co potwierdza poprawność przeprowadzonej analizy.
2. U 64% pacjentów z RZS zaobserwowano obniżony poziom HSA, świadczący o hipoalbuminemii (<35 mg/ml), co sugeruje przewlekły stan zapalny jako główną przyczynę. Wyniki testu U Manna-Whitneya wykazały istotną różnicę pomiędzy grupami ($p = 0,027$).
3. Nie wykazano istotnych różnic w poziomie GSH pomiędzy grupą kontrolną a pacjentami z RZS ($p = 0,541$).
4. Istotnie wyższe poziomy Cys w osoczu pacjentów z RZS ($p < 0,05$) mogą wskazywać na udział tego aminokwasu w patogenezie choroby i sugerować jego potencjalne zastosowanie jako biomarkera diagnostycznego.
5. 52% pacjentów z RZS miało podwyższony poziom Hcy, świadczący o hiperhomocysteinemii (>15 nmol/ml), co wskazuje na zwiększony stres oksydacyjny i potencjalne ryzyko sercowo-naczyniowe w tej grupie ($p < 0,0001$, test t-Welcha).
6. Istotnie wyższe stężenie Cys-Gly u pacjentów z RZS ($p = 0,0099$, test t-Studenta) sugeruje związek tego związku z nasileniem stresu oksydacyjnego i potencjalną korelację z aktywnością choroby.
7. Analiza statystyczna wykazała istotnie niższe stężenie HSA w grupie pacjentów z RZS w porównaniu do grupy kontrolnej zarówno we krwi ($32,67 \pm 6,53$ mg/ml vs. $40,8 \pm 5,09$ mg/ml, $p < 0,05$, test U Manna-Whitneya), jak i w osoczu. Wynik ten jest zgodny z oczekiwanym wpływem przewlekłego stanu zapalnego na poziom HSA.
8. Średnie stężenie Hgb było istotnie niższe u pacjentów z RZS ($t(48) = 7,60$, $p < 0,05$), a 52% z nich spełniało kryteria niedokrwistości według WHO.

Wariancja wyników była większa w grupie chorych, co może sugerować indywidualne różnice w mechanizmach anemii u pacjentów z RZS.

9. W osoczu nie wykryto wolnej hemoglobiny (fHgb), co jest zgodne z zakresem referencyjnym i wskazuje, że jej stężenie w badanych próbkach było poniżej LOD zastosowanej metody.
10. Istotnie wyższe stężenie Fg w osoczu pacjentów z RZS ($t(40) = -11,865$, $p < 0,05$) wskazuje na jego rolę jako dodatniego BOF i biomarkera stanu zapalnego. Wzrost Fg może zwiększać ryzyko zakrzepicy i powikłań sercowo-naczyniowych.
11. Test t-Welcha wykazał istotnie niższe stężenie Tf u pacjentów z RZS ($t(34) = 10,23$, $p < 0,05$). Wynik ten sugeruje, że przewlekły stan zapalny może wpływać na metabolizm żelaza w tej grupie pacjentów.
12. Na podstawie przeprowadzonych analiz statystycznych można stwierdzić, że długoterminowe zmiany w poziomach różnych form redoks badanych tioli w osoczu są w większości przypadków nieistotne statystycznie. Pomimo obserwowanych trendów spadkowych w czasie, analiza wariancji nie wykazała jednoznacznych dowodów na wpływ przynależności do grupy badanej na poziomy tioli. Wyniki sugerują, że zmiany w stężeniu badanych biomarkerów mogą wynikać z naturalnej zmienności biologicznej lub efektów związanych z czasem, a nie bezpośrednio z przebytych infekcji lub szczepienia przeciwko COVID-19.
13. W przypadku Hcy, obserwowany początkowy wzrost jej poziomu po 2 tygodniach od infekcji lub szczepienia może sugerować przejściowe zaburzenia w cyklu Met i metylacji, prawdopodobnie związane z odpowiedzią zapalną organizmu. Jednakże brak istotnych różnic między grupami wskazuje na dużą heterogeniczność odpowiedzi organizmu oraz potencjalne mechanizmy kompensacyjne regulujące metabolizm Hcy. Tendencja spadkowa w kolejnych miesiącach może sugerować stopniową normalizację metabolizmu siarkowego.
14. Dla GSH oraz γ -Glu-Cys wykazano istotny efekt czasu, co oznacza, że ich poziomy zmieniały się w czasie niezależnie od przynależności do grupy badanej. Po uwzględnieniu korekcji Bonferroniego różnice między poszczególnymi punktami czasowymi przestały być istotne, co może

sugerować konieczność przeprowadzenia badań na większej populacji w celu jednoznacznego potwierdzenia obserwowanych trendów.

15. Niewielka liczebność próby mogła ograniczyć moc testu statystycznego i zdolność do wykrycia subtelnych różnic. Wyniki sugerują, że ewentualny wpływ przebytej infekcji lub szczepienia na metabolizm badanych związków jest przejściowy i nie prowadzi do długoterminowych zmian w homeostazie tioli. Z perspektywy klinicznej, brak istotnych różnic sugeruje, że poziomy badanych biomarkerów nie ulegają znaczącej zmianie w wyniku szczepienia lub infekcji w dłuższym okresie, co może wskazywać na skuteczne mechanizmy kompensacyjne organizmu.

DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA I ORGANIZACYJNA

Publikacje naukowe/monografie pokonferencyjne:

- [P1] **Kurpet K**, Głowacki R, Chwatko G. Simultaneous Determination of Human Serum Albumin and Low-Molecular-Weight Thiols after Derivatization with Monobromobimane. *Molecules*. 2021; 26(11):3321. IF = 4,2; Punkty MNiSW: 140 pkt.
- [P2] **Kurpet K**, Chwatko G. S100 Proteins as Novel Therapeutic Targets in Psoriasis and Other Autoimmune Diseases. *Molecules*. 2022; 27(19):6640. IF = 4,2; Punkty MNiSW: 140 pkt.
- [P3] **Kurpet, K.**, Chwatko, G. Development of a new chromatographic method for the determination of bakuchiol in cosmetic products. *Scientific Reports* **13**, 13893 (2023). IF = 3,8; Punkty MNiSW: 140 pkt.
- [P4] **Kurpet, K.**; Chwatko, G. Nowe substancje psychoaktywne - katynon i jego pochodne. *Wiadomości Chemiczne* **73** (7-8) 461-489 (2019). Punkty MNiSW = 20 pkt.
- [P5] **Kurpet, K.**; Chwatko, G. Porównanie właściwości antyoksydacyjnych wybranych związków siarki. *Poszerzamy Horyzonty – Tom XII*, 573-585 (2019), Wyd. Mateusz Weiland Network Solutions, Słupsk, Polska. ISBN: 978-83-63216-16-0. Punkty MNiSW = 20 pkt.

Doniesienia konferencyjne:

- [K1] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Wykład sekcyjny: *Chromatografia cieczowa w analizie składników aktywnych kosmetyków przeciwstarzeniowych*. 65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 18-22 września 2023 r., Toruń, Polska.
- [K2] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Komunikat ustny: *Opracowanie pierwszej metody chromatograficznej do kontroli jakości kosmetyków zawierających bakuchiol*. X Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 18-19 maja 2023 r., Łódź, Polska.
- [K3] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Plakat: *Wykorzystanie benzofurazanów do oznaczania statusu redoks tioli osocza techniką HPLC-FLD*. 64. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 11-16 września 2022 r., Lublin, Polska.

- [K4] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Plakat: *Oznaczanie bakuchiolu w kosmetykach techniką HPLC-FLD*. 64. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 11-16 września 2022 r., Lublin, Polska.
- [K5] Aleksandra Sarniak, **Katarzyna Kurpet**, Rafał Głowacki, Grażyna Chwatko. Plakat: *Opracowanie nowej metody oznaczania bakuchiolu w kosmetykach*. XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej, PoKoChA 2022, 19-23 czerwca 2022 r., Łódź, Polska.
- [K6] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Komunikat ustny: *Znakowanie niskocząsteczkowych tioli osocza za pomocą 4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolu – współczesne problemy przygotowania próbek biologicznych do analizy HPLC*. XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej, PoKoChA 2022, 19-23 czerwca 2022 r., Łódź, Polska.
- [K7] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Plakat: *Opracowanie metody oznaczania tioli osocza za pomocą chromatografii par jonowych*. 63. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 13-17 września 2021 r., Łódź, Polska.
- [K8] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. *Optimization of sample preparation for determination of biothiols by ion-pair chromatography after derivatization with 2-chloro-1-methylpyridinium iodide*. Flash talk: Międzynarodowa konferencja naukowa „QUO VADIS Life Sciences”, 23-27 czerwca 2021 r., Opole, Polska.
- [K9] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Plakat: *Chromatographic method development for simultaneous determination of albumin and low-molecular-weight thiols in human plasma*. Międzynarodowa konferencja naukowa „SCIENCE: POLISH PERSPECTIVES”, 7-8 maja 2021 r., Zürich, Szwajcaria.
- [K10] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Plakat: *Ocena potencjału wybranych białek S100 jako biomarkerów w przebiegu łuszczycy*. Ogólnopolska studencka konferencja naukowa „Bliżej Chemii”, 9-10 stycznia 2021 r., Kraków, Polska.
- [K11] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Plakat: *Simultaneous determination of high- and low-molecular weight thiols by HPLC-FLD*. I Ogólnopolska Konferencja Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 10-12 września 2020 r., Warszawa, Polska.
- [K12] **Katarzyna Kurpet**. Plakat: *Opracowanie metody oznaczania liponylizyny i kwasu liponowego w tkankach zwierzęcych*. X Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, 4 czerwca 2019 r., Łódź, Polska.

- [K13] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko. Komunikat ustny: *Porównanie właściwości antyutleniających wybranych związków siarki*. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa – „Młody Naukowiec Część V – Nauki interdyscyplinarne”, 4-5 kwietnia 2019 r., Kraków, Polska.
- [K14] **Katarzyna Kurpet**, Grażyna Chwatko, Aleksandra Szcześniak. Plakat: *Spektrofotometryczne oznaczanie zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów metodą redukcji rodnika DPPH*. I Konferencja z cyklu „Młodzi Zdolni”, 20 lutego 2019 r., Łódź, Polska.
- [K15] **Katarzyna Kurpet**. Plakat: *Kwas liponowy i liponylolizyna – wyzwanie dla młodego analityka*. I Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa z cyklu Badania Młodych Naukowców „Wiedza – Inspiracja – Pasja”, 22-23 czerwca 2018 r., Łódź, Polska.

Udział w projektach naukowo-badawczych:

- [G1] 18.01.2022 – 31.09.2024, **Kierownik projektu**, *Badania wpływu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 oraz szczepienia przeciwko COVID-19 na układ sercowo-naczyniowy*, Uniwersytet Łódzki, Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza, Doktoranckie Granty Badawcze, nr grantu: 6/DGB/IDUB/2022 (opiekun naukowy: dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ).
- [G2] 01.02.2022 – 31.01.2023, **Wykonawca projektu**, *Bakuchiol – nowy składnik kosmetyków. Badania chromatograficzne*, Uniwersytet Łódzki, Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza, Granty dla doświadczonych badaczy, nr grantu: 61/2021 (kierownik grantu: dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ).
- [G3] 21.05.2018 – 30.06.2018, **Kierownik projektu**, *Przygotowanie tkanek zwierzęcych do oznaczania liponylolizyny techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, Uniwersytet Łódzki, Studenckie Granty Badawcze (opiekun naukowy: dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ).

Udział w projektach z zakresu popularyzacji nauki:

- [G4] 2024, **Wykonawca projektu**, *Szkoły Doktorskie to Nasza Przyszłość!* – *popularyzacja wiedzy o systemie kształcenia doktorantów*, projekt finansowany ze środków budżetu państwa, przyznanych przez Ministra Edukacji i Nauki w ramach Programu „Społeczna odpowiedzialność nauki II”; działanie w projekcie: opracowanie artykułu popularnonaukowego pt. „Komercjalizacja

wyników badań naukowych w teorii i praktyce”; data publikacji: 5 czerwca 2024 r.; <https://prawadoktoranta.pl/wp-content/uploads/2024/06/PL-ARTYKUL-KATARZYNA-KURPET-2.pdf>

- [G5] 2024, **Wykonawca projektu**, *Szkoły Doktorskie to Nasza Przyszłość!* – popularyzacja wiedzy o systemie kształcenia doktorantów, projekt finansowany ze środków budżetu państwa, przyznanych przez Ministra Edukacji i Nauki w ramach Programu „Społeczna odpowiedzialność nauki II”; działanie w projekcie: opracowanie artykułu popularnonaukowego pt. „Stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej – informacje dla doktorantów”; data publikacji: 26 maja 2024 r.; <https://prawadoktoranta.pl/wp-content/uploads/2024/05/PL-ARTYKUL-KATARZYNA-KURPET-1.pdf>
- [G6] 2024, **Wykonawca projektu**, *Szkoły Doktorskie to Nasza Przyszłość!* – popularyzacja wiedzy o systemie kształcenia doktorantów, projekt finansowany ze środków budżetu państwa, przyznanych przez Ministra Edukacji i Nauki w ramach Programu „Społeczna odpowiedzialność nauki II”; działanie w projekcie: opracowanie artykułu popularnonaukowego pt. „Kilka słów o etyce badań naukowych”; data publikacji: 20 maja 2024 r.; <https://prawadoktoranta.pl/wp-content/uploads/2024/05/PL-ARTYKUL-KATARZYNA-KURPET.pdf>
- [G7] 2024, **Zaproszony gość – Ekspert**, *Szkoły Doktorskie to Nasza Przyszłość!* – popularyzacja wiedzy o systemie kształcenia doktorantów, projekt finansowany ze środków budżetu państwa, przyznanych przez Ministra Edukacji i Nauki w ramach Programu „Społeczna odpowiedzialność nauki II”; działanie w projekcie: pełnienie funkcji eksperta podczas webinarium pt. „Jaką rolę pełni szkoła doktorska w systemie nauki i szkolnictwa wyższego?”, organizowanego dnia 31 stycznia 2024 r.
- [G8] 2022, 2023, **Wykonawca projektu**, *Kształcenie kompetencji kluczowych poprzez zajęcia eksperymentalne z chemii dla niestandardowych odbiorców szkolnictwa wyższego*, projekt współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój i realizowanego przez Uniwersytet Łódzki w ramach konkursu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju nr POWR.03.01.00-IP.08-00-3MU/18, na podstawie umowy nr POWR.03.01.00-00-T173/18 z dnia 21.03.2019 r.;

działanie w projekcie: współprowadzenie warsztatów chemicznych dla szkół średnich.

Działalność recenzencka:

- [R1] 2021, Recenzent w czasopiśmie naukowym *Amino acids* (Springer Nature, ISSN: [0939-4451](#)); nr manuskryptu: AMAC-D-21-00307.

Mobilność zagraniczna:

- [M1] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic, 12-18 lutego 2023 r. Wizyta studyjna w ramach uzyskanego stypendium w programie „PROM – Międzynarodowa wymiana stypendialna doktorantów i kadry akademickiej” organizowanym przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (nr umowy: 035/W/PROM2).
- [M2] International Summer School - Food Safety and Healthy Living - FSHL 2022, Brasov, Romania, 5-8 września 2022 r.

Popularyzacja nauki:

- [PN1] Przeprowadzenie szkolenia pt. „*Akademicki savoir-vivre, czyli jak uniknąć faux pas?*”, Łódzkie Warsztaty Studencko-Doktoranckie, Uniwersytet Łódzki, Centrum Szkoleniowo-Konferencyjne, 15 kwietnia 2023 r.
- [PN2] Organizacja i pełnienie funkcji koordynatora popularyzatorskiego konkursu pn. *Talking Science – student's edition* skierowanego do studentów Uniwersytetu Łódzkiego i Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Uniwersytet Łódzki, Centrum Szkoleniowo-Konferencyjne, 2023 r.
- [PN3] Organizacja i pełnienie funkcji koordynatora trzech edycji popularyzatorskiego konkursu pn. *Talking Science* skierowanego do doktorantów Uniwersytetu Łódzkiego (2021, 2022 r.) i Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (2023 r.), Uniwersytet Łódzki, Centrum Szkoleniowo-Konferencyjne.
- [PN4] Współorganizacja, prowadzenie i ewaluacja zajęć warsztatowych dla uczniów Publicznej Szkoły Podstawowej nr 13 im. UNICEF z Oddziałami Integracyjnymi w Bełchatowie, XIX Festiwal Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi, Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, 13 czerwca 2019 r.
- [PN5] Współorganizacja, prowadzenie i ewaluacja zajęć warsztatowych dla uczniów XXIV Liceum Ogólnokształcącego im. Marii Skłodowskiej-Curie w Łodzi,

Szkolny eksperyment chemiczny, Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii,
7 marca 2019 r.

[PN6] Współorganizacja, prowadzenie i ewaluacja zajęć warsztatowych dla uczniów Publicznego Gimnazjum nr 34 im. Krzysztofa Kamila Baczyńskiego w Łodzi, XVIII Festiwal Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi, Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, 18 maja 2018 r.

Towarzystwa naukowe:

[TN1] 2020 – obecnie, członkini Polskiego Towarzystwa Chemicznego

Działalność samorządowa:

[DS1] Członkini Rady Doktoranckiego Forum Uniwersytetów Polskich w kadencji 2020 – 2022

[DS2] Przewodnicząca Uczelnianej Rady Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Łódzkiego w kadencji 2020 – 2022

[DS3] Przedstawicielka doktorantów w Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. szkół doktorskich w kadencji 2020 – 2024

[DS4] Przedstawicielka doktorantów w Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. studiów doktoranckich w kadencji 2020 – 2023

[DS5] Przedstawicielka doktorantów w Radzie Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego w kadencji 2020 – 2024

[DS6] Delegatka Uniwersytetu Łódzkiego podczas Posiedzenia Rady Doktoranckiego Forum Uniwersytetów Polskich, Wrocław, 2-4 grudnia 2022 r.

[DS7] Delegatka Uniwersytetu Łódzkiego podczas Konferencji „Model Funkcjonowania Szkół Doktorskich”, Krajowa Reprezentacja Doktorantów, Warszawa, 18-20 listopada 2022 r.

[DS8] Przedstawicielka doktorantów w Komisji Rekrutacyjnej do Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego powołanej w związku z rekrutacją na rok akademicki 2021/2022

[DS9] Delegatka Uniwersytetu Łódzkiego podczas Jubileuszowego Zjazdu Krajowej Reprezentacji Doktorantów pt. „Model funkcjonowania szkół doktorskich”, Warszawa, 19-21 listopada 2021 r.

[DS10] Delegatka Uniwersytetu Łódzkiego podczas II Otwartego Posiedzenia Zarządu Krajowej Reprezentacji Doktorantów, 24 kwietnia 2021 r.

[DS11] Delegatka Uniwersytetu Łódzkiego podczas I Otwartego Posiedzenia Zarządu Krajowej Reprezentacji Doktorantów, 27 lutego 2021 r.

Działalność organizacyjna:

- [O1] Organizacja Wigilii Doktorantów Uniwersytetu Łódzkiego, Uniwersytet Łódzki, Pałac Biedermanna, 12 grudnia 2022 r.
- [O2] Członkini Komitetu Organizacyjnego XI Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej, PoKoChA 2022, Łódź, 19-23 czerwca 2022 r.
- [O3] Organizacja I Otwartego Posiedzenia Zarządu Krajowej Reprezentacji Doktorantów, Łódź, 25-27 lutego 2022 r.
- [O4] Organizacja Doktoranckiego Turnieju Bowlingowego o Puchar Rektora Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 1 lipca 2022 r.
- [O5] Organizacja V Dnia Doktoranta Uniwersytetu Łódzkiego oraz Drzwi Otwartych Szkół Doktorskich Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 30 czerwca 2022 r.
- [O6] Organizacja turnieju „Doktorancki Grand Prix w piłce siatkowej o Puchar Rektora Uniwersytetu Łódzkiego”, Łódź, 28 czerwca 2022 r.
- [O7] Organizacja akcji „Samorządowiec UŁ”, 2021, 2022 r.
- [O8] Organizacja akcji „Pierwszak Szkoły Doktorskiej”, 2021, 2022 r.
- [O9] Działalność w ramach umiędzynarodowienia Szkół Doktorskich Uniwersytetu Łódzkiego – organizacja spotkania dla kandydatów cudzoziemców do Szkół Doktorskich UŁ, Łódź, 18 czerwca 2021 r.
- [O10] Organizacja IV Dnia Doktoranta Uniwersytetu Łódzkiego oraz Drzwi Otwartych Szkół Doktorskich Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 11 czerwca 2021 r.

Działalność dydaktyczna:

- [D1] Prowadzenie zajęć dydaktycznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego obejmujących laboratoria z przedmiotów:
 - chromatografia cieczowa w analizie chemicznej (2020/2021, 2021/2022, 2022/2023),
 - dydaktyka chemii szkoły ponadpodstawowej (2022/2023),
 - nowoczesne metody badań substancji chemicznych (2021/2022),
 - specjalistyczne warsztaty chemiczne (2021/2022),
 - techniki elektromigracyjne w analizie chemicznej (2019/2020, 2021/2022),
 - zajęcia specjalistyczne (2021/2022).

- [D2] Aktywny udział w udoskonalaniu zajęć dydaktycznych:
- opracowanie instrukcji do ćwiczenia laboratoryjnego pt.: „Oznaczanie biotoli za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną”,
 - opracowanie instrukcji do ćwiczenia laboratoryjnego pt.: „Oznaczanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją rozpraszania światła przez odparowanie”,
 - modyfikacja ćwiczenia laboratoryjnego dla studentów pt. „Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Detekcja białek w żelu poliakrylamidowym”.

Wykaz najważniejszych szkoleń i uzyskanych certyfikatów:

- [S1] *Finansowanie projektów B+R*, Polski Fundusz Rozwoju, 5-14 marca 2025 r.
- [S2] *ICH E6 (R2) Good Clinical Practice*, Agencja Badań Medycznych, 18 czerwca 2024 r., ważność certyfikatu: 18 czerwca 2027 r.
- [S3] *Program Rozwoju Zawodowego – Specjalista ds. walidacji i oceny niepewności poziomy I-III*, CE2 Centrum Edukacji, poziom I: 21-22 listopada 2023 r. ;poziom II: 12-13 grudnia 2023 r. oraz 18 grudnia 2023 r.; poziom III: 19-21 grudnia 2023 r.
- [S4] *Podstawowe wymagania normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 i polityk PCA opisanych w dokumentach: DA-02, DA-05, DA-06 i DA-08 oraz praktyczne aspekty ich wdrożenia do stosowania w laboratoriach akredytowanych/ubiegających się o akredytację*, CE2 Centrum Edukacji, 27-28 listopada 2023 r.
- [S5] *Prowadzenie i kontrola badań zgodnie z zasadami DPL (GLP)*, CE2 Centrum Edukacji, 24-25 października 2023 r.
- [S6] *Supercritical Fluid Chromatography (SFC) Training*, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic, 13-17 lutego 2023 r.
- [S7] *Supercritical Fluid Extraction (SFE) Training*, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic, 13-17 lutego 2023 r.

Pozostałe szkolenia:

- [S8] *Dlaczego nauka potrzebuje dobrych opowieści?*, prof. Marcin Napiórkowski (Uniwersytet Warszawski), Krajowa Reprezentacja Doktorantów, Warszawa, 21 listopada 2021 r.
- [S9] *Szkoło pomiarowe – zobaczmy dokładniej*, Merck, online, 21 czerwca 2021 r.
- [S10] *Duolink PLA - detekcja i lokalizacja oddziaływań lub modyfikacji białkowych w komórce*, Merck, online, 18 czerwca 2021 r.
- [S11] *Znaczenie jakości wody w analizie białek. Dlaczego woda może stanowić zagrożenie?*, Merck, online, 14 czerwca 2021 r.
- [S12] *Dobra praktyka przy stosowaniu wody do analiz chemicznych, biochemicznych i mikrobiologicznych*, Merck, online, 07 czerwca 2021 r.
- [S13] *Western blotting - wskazówki i porady dotyczące optymalizacji procesu*, Merck, online, 28 maja 2021 r.
- [S14] *Zastosowanie metody ultrafiltracji do odsalania, wymiany buforu, zateżniania oraz separacji białka*, Merck, online, 21 maja 2021 r.
- [S15] *Ekstrakcja i oczyszczanie białka z materiału biologicznego*, Merck, online, 30 kwietnia 2021 r.
- [S16] *How to Get Published: Tips for Chemistry Journals*, Wiley, online, 13 kwietnia 2021 r.
- [S17] *Sprawniej i szybciej w chromatografii cieczowej - współczesne technologie kolumn HPLC w portfolio Merck*, Merck, online, 22 marca 2021 r.
- [S18] *Jakość wody w badaniach analitycznych. Dlaczego woda może stanowić zagrożenie?*, Merck, online, 15 marca 2021 r.
- [S19] *Successful SEC method development for proteins, mAbs, AAVs - critical aspects*, Waters, online, 26 maja 2020 r.
- [S20] *Successful SEC method development for proteins, mAbs, AAVs – fundamentals*, Waters, online, 19 maja 2020 r.
- [S21] *2D electrophoresis*, Bio-Rad, online, 18 maja 2020 r.

Nagrody i wyróżnienia:

- [N1] Nagroda Santander Universidades za działalność na rzecz uczelni oraz aktywność społeczną, 2024 r.
- [N2] Nagroda Naukowa Rektora Uniwersytetu Łódzkiego II stopnia, 2023 r.

- [N3] Zespołowa Nagroda Naukowa Rektora Uniwersytetu Łódzkiego I stopnia za cykl publikacji monotematycznych, 2023 r.
- [N4] List Gratulacyjny JM Rektor Uniwersytetu Łódzkiego, 2023 r.
- [N5] Nagroda Santander Universidades za działalność na rzecz uczelni oraz aktywność społeczną, 2023 r.
- [N6] Medal Universitas Lodziensis Alumno Laude Dignissimo za wybitną działalność na rzecz i dla dobra Uniwersytetu Łódzkiego, 2022 r.
- [N7] Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za aktywne uczestnictwo w organach samorządu przy pracach na rzecz rozwoju i promocji środowiska doktoranckiego Uniwersytetu Łódzkiego – sześciokrotna laureatka w latach 2020 – 2023.
- [N8] I miejsce w ogólnopolskim konkursie DOC^{up} w kategorii wydarzenie samorządowe, nagroda grupowa, organizator: Doktoranckie Forum Uniwersytetów Polskich, 2022 r.
- [N9] III miejsce w kategorii Najlepszy Samorząd Doktorantów w konkursie PRODOK na najbardziej prodoktorancki podmiot naukowy, nagroda grupowa, organizator: Krajowa Reprezentacja Doktorantów, 2022 r.
- [N10] Wyróżnienie za działalność doktorancką na rzecz i dla dobra Uniwersytetu Łódzkiego, 2022 r.
- [N11] III miejsce w ogólnopolskim konkursie DOC^{up} w kategorii wydarzenie naukowe, nagroda indywidualna, organizator: Doktoranckie Forum Uniwersytetów Polskich, 2021 r.
- [N12] II miejsce w kategorii Najlepszy Samorząd Doktorantów w konkursie PRODOK na najbardziej prodoktorancki podmiot naukowy, nagroda grupowa, organizatorzy: Krajowa Reprezentacja Doktorantów, Samorząd Doktorantów Polskiej Akademii Nauk, 2021 r.
- [N13] I miejsce w ogólnopolskim konkursie DOC^{up} w kategorii wydarzenie samorządowe, nagroda grupowa, organizator: Doktoranckie Forum Uniwersytetów Polskich, 2021 r.
- [N14] Nagroda za najlepszą prezentację Młodego Naukowca podczas Międzynarodowej Konferencji Naukowej QUO VADIS Life Sciences, 2021 r.
- [N15] Nagroda Polskiego Towarzystwa Chemicznego im. Bronisława Znatowicza za najlepszy artykuł opublikowany w Wiadomościach Chemicznych w 2019 roku, 2020 r.

- [N16] Nagroda Publiczności podczas X Sesji Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, 2019 r.
- [N17] List gratulacyjny JM Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za wyróżniające się wyniki w nauce, 2019 r.
- [N18] Stypendium Rektora Uniwersytetu Łódzkiego dla najlepszych studentów, 2017, 2018, 2019 r.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. I. Giles, C. Jacob, *Biol Chem* **2002**, 383, 375.
- [2] McMurry, J. (2020). Organic chemistry (10th ed.). Cengage Learning. [3] W. J. A. Woittiez, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1993**, 112, 468.
- [4] Streitwieser, A., Bartlett, P. A., Heathcock, C. H., Koch, J. G., & Kosower, E. M. (1992). Introduction to organic chemistry (4th ed.). Macmillan.
- [5] Carey, F. A., & Sundberg, R. J. (2007). Advanced organic chemistry: Part A: Structure and mechanisms (5th ed.). Springer.
- [6] Weast, R. C. (Ed.). (1972). CRC handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data (53rd ed.). CRC Press.
- [7] K. G. Reddie, K. S. Carroll, *Curr Opin Chem Biol* **2008**, 12, 746.
- [8] W. J. A. Woittiez, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1993**, 112, 468.
- [9] D. Schilter, *Nature Reviews Chemistry* 2017 1:2 **2017**, 1, 1.
- [10] T. Finkel, *FEBS Lett* **2000**, 476, 52.
- [11] T. Finkel, N. J. Holbrook, *Nature* **2000**, 408, 239.
- [12] E. S. J. Arnér, A. Holmgren, *Semin Cancer Biol* **2006**, 16, 420.
- [13] K. Aoyama, T. Nakaki, *Molecules* **2015**, 20, 8742.
- [14] N. Couto, J. Wood, J. Barber, *Free Radic Biol Med* **2016**, 95, 27.
- [15] K. Aquilano, S. Baldelli, M. R. Ciriolo, *Front Pharmacol* **2014**, 5 AUG, 108999.
- [16] A. Holmgren, C. Johansson, C. Berndt, M. E. Lönn, C. Hudemann, C. H. Lillig, *Biochem Soc Trans* **2005**, 33, 1375.
- [17] H. Sies, C. Berndt, D. P. Jones, *Annu Rev Biochem* **2017**, 86, 715.
- [18] L. B. Poole, *Free Radic Biol Med* **2015**, 80, 148.
- [19] J. Yin, W. Ren, G. Yang, J. Duan, X. Huang, R. Fang, C. Li, T. Li, Y. Yin, Y. Hou, S. W. Kim, G. Wu, *Mol Nutr Food Res* **2016**, 60, 134.
- [20] M. H. Stipanuk, *J Nutr* **2020**, 150, 2494S.
- [21] M. H. Stipanuk, *J Nutr* **2020**, 150, 2494S.
- [22] Y. Wang, H. Yang, C. Geerts, A. Furtos, P. Waters, D. Cyr, S. Wang, G. A. Mitchell, *Mol Genet Metab* **2023**, 138, 106966.
- [23] L. Shi, B. P. Tu, *Curr Opin Cell Biol* **2015**, 33, 125.
- [24] D. T. Hess, A. Matsumoto, S. O. Kim, H. E. Marshall, J. S. Stamler, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, 6, 150.
- [25] K. Ulrich, J. Ursula, *Free Radic Biol Med* **2019**, 140, 14-27.

- [26] H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna, *Mol Aspects Med* **2009**, 30, 1.
- [27] D. M. Townsend, K. D. Tew, H. Tapiero, *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2003**, 57, 145.
- [28] A. M. Sadowska, J. Verbraecken, K. Darquennes, W. A. De Backer, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **2006**, 1, 425.
- [29] K. R. Atkuri, J. J. Mantovani, L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, *Curr Opin Pharmacol* **2007**, 7, 355.
- [30] Flora, S.J.S., Mittal, M., & Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 501-523.
- [31] K. R. Atkuri, J. J. Mantovani, L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, *Curr Opin Pharmacol* **2007**, 7, 355.
- [32] R. Dringen, *Prog Neurobiol* **2000**, 62, 649.
- [33] C. Gorrini, I. S. Harris, T. W. Mak, *Nature Reviews Drug Discovery* 2013 12:12 **2013**, 12, 931.
- [34] N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti, B. Marengo, A. L. Furfaro, M. A. Pronzato, U. M. Marinari, C. Domenicotti, *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 2013.
- [35] S. Pushpakumar, S. Kundu, U. Sen, *Curr Med Chem* **2014**, 21, 3662.
- [36] S. Taysi, F. Polat, M. Gul, R. Sari, E. Bakan, *Rheumatol Int* **2002**, 21, 200.
- [37] Armstrong, F. B. (1989). *Biochemistry* (3rd ed). Oxford University Press.
- [38] Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2017) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th Edition, W.H. Freeman, New York, 1328.
- [39] Voet, D., & Voet, J. G. (2016). *Biochemistry* (4th ed.). Wiley.
- [40] Włodek, L. (2013). *Biochemia* (wyd. 2). Wydawnictwo Naukowe PWN.
- [41] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto, G.J. and Stryer, L. (2019) *Biochemistry*. 9th Edition, Macmillan, New York.
- [42] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Stryer Biochemie* **2018**.
- [43] Voet, D., & Voet, J. G. (2017). *Biochimie* (5th ed.). Wiley.
- [44] Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2017) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th Edition, W.H. Freeman, New York, 1328.
- [45] J. Kim, H. Kim, H. Roh, Y. Kwon, *Arch Pharm Res* **2018**, 41, 372.
- [46] A. D. Smith, H. Refsum, *J Intern Med* **2021**, 290, 826.
- [47] M. Cattaneo, *Thromb Haemost* **1999**, 81, 165.
- [48] H. Sies, *Free Radic Biol Med* **1999**, 27, 916.

- [49] A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata, A. F. Casini, *Biochem Pharmacol* **2003**, 66, 1499.
- [50] A. Meister, *Biochem Soc Trans* **1982**, 10, 78.
- [51] K. P. Shay, R. F. Moreau, E. J. Smith, A. R. Smith, T. M. Hagen, *Biochim Biophys Acta* **2009**, 1790, 1149.
- [52] L. Packer, K. Kraemer, G. Rimbach, *Nutrition* **2001**, 17, 888.
- [53] G. P. Biewenga, G. R. M. M. Haenen, A. Bast, *Gen Pharmacol* **1997**, 29, 315.
- [54] S. Golbidi, M. Badran, I. Laher, *Exp Diabetes Res* **2012**, 2012.
- [55] O. W. Griffith, *Free Radic Biol Med* **1999**, 27, 922.
- [56] Meister A. *J Biol Chem.* **1988** Nov 25;263(33):17205-8. PMID: 3053703.
- [57] A. Meister, *Biochem Soc Trans* **1982**, 10, 78.
- [58] S. C. Lu, *Biochim Biophys Acta* **2013**, 1830, 3143.
- [59] G. Wu, Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, N. D. Turner, *J Nutr* **2004**, 134, 489.
- [60] J. Mathew, P. Sankar, M. A. Varacallo, *StatPearls* **2023**.
- [61] G. Meisenberg, W. H. Simmons, *Principles of Medical Biochemistry* **2012**, 232.
- [62] <https://www.clinical-laboratory-diagnostics.com/index.html>
- [63] L. L. Miller, C. G. Bly, M. L. Watson, W. F. Bale, *J Exp Med* **1951**, 94, 431.
- [64] K. Dunphy, P. Dowling, D. Bazou, P. O’Gorman, *Cancers (Basel)* **2021**, 13, 1930.
- [65] Q. Zhong, X. Xiao, Y. Qiu, Z. Xu, C. Chen, B. Chong, X. Zhao, S. Hai, S. Li, Z. An, L. Dai, *MedComm (Beijing)* **2023**, 4, e261.
- [66] Y. Liu, X. Pan, M. Zhao, Y. Gao, *Scientific Reports 2020 10:1* **2020**, 10, 1.
- [67] R. Mnatsakanyan, G. Shema, M. Basik, G. Batist, C. H. Borchers, A. Sickmann, R. P. Zahedi, *Expert Rev Proteomics* **2018**, 15, 515.
- [68] D. L. Zoran, *Handbook of Small Animal Practice, Fifth Edition* **2007**, 357.
- [69] R. H. Stewart, *Small Animal Critical Care Medicine, Second Edition* **2014**, 60.
- [70] Primary Glomerular Disease, *Pocket Companion to Brenner and Rector’s The Kidney* **2011**, 222.
- [71] C. A. Mason, *Robinson’s Current Therapy in Equine Medicine: Seventh Edition* **2015**, 904.
- [72] D. Melnick, G. R. Cowgill, *Yale J Biol Med* **1937**, 10, 49.
- [73] G. Wang, Y. F. Wang, J. L. Li, R. J. Peng, X. Y. Liang, X. D. Chen, G. H. Jiang, J. F. Shi, Y. H. Si-Ma, S. Q. Xu, *Zool Res* **2022**, 43, 301.
- [74] S. R. Goldsmith, K. Stockerl-Goldstein, *Am J Med* **2022**, 135, S24.

- [75] Y. F. Wang, G. Wang, J. L. Li, Y. X. Qu, X. Y. Liang, X. D. Chen, Y. H. Sima, S. Q. Xu, *Biology* **2021**, Vol. 10, Page 112 **2021**, 10, 112.
- [76] J. W. Foreman, *Comprehensive Clinical Nephrology: Fourth Edition* **2010**, 584.
- [77] T. G. DeLoughery, *Hematol Oncol Clin North Am* **2010**, 24, 603.
- [78] P. David Eckersall, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Sixth Edition* **2008**, 117.
- [79] G. S. Markowitz, *Adv Anat Pathol* **2004**, 11, 49.
- [80] F. Ceciliani, A. Giordano, V. Spagnolo, *Protein Pept Lett* **2005**, 9, 211.
- [81] E. Gruys, M. J. M. Toussaint, T. A. Niewold, S. J. Koopmans, *J Zhejiang Univ Sci* **2005**, 6 B, 1045.
- [82] S. Jain, V. Gautam, S. Naseem, *J Pharm Bioallied Sci* **2011**, 3, 118.
- [83] J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, *J Mol Biol* **2005**, 353, 38.
- [84] T. W. Evans, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement* **2002**, 16, 6.
- [85] A. M. Merlot, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, *Front Physiol* **2014**, 5 AUG.
- [86] V. Mishra, R. J. Heath, *Int J Mol Sci* **2021**, 22, 8411.
- [87] G. Fanali, A. Di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Mol Aspects Med* **2012**, 33, 209.
- [88] A. M. N. Silva, T. Moniz, B. de Castro, M. Rangel, *Coord Chem Rev* **2021**, 449, 214186.
- [89] A. S. Ogun, A. Adeyinka, *StatPearls* **2022**.
- [90] C. Longstaff, C. Thelwell, S. C. Williams, M. M. C. G. Silva, L. Szabó, K. Kolev, *Blood* **2011**, 117, 661.
- [91] S. Surma, M. Banach, *Int J Mol Sci* **2021**, 23, 193.
- [92] P. De Moerloose, A. Casini, M. Neerman-Arbez, *Semin Thromb Hemost* **2013**, 39, 585.
- [93] D. Davalos, K. Akassoglou, *Semin Immunopathol* **2012**, 34, 43.
- [94] J. S. Bennett, *Ann N Y Acad Sci* **2001**, 936, 340.
- [95] A. Undas, R. A. S. Ariëns, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**, 31.
- [96] J. W. Weisel, R. I. Litvinov, *Blood* **2013**, 121, 1712.
- [97] M. W. Mosesson, *J Thromb Haemost* **2005**, 3, 1894.
- [98] M. F. Perutz, *Nature* **1970**, 228, 726.
- [99] B. G. Bunn, H. Franklin (Howard Franklin), *Forget*, **1986**, 690.

- [100] G. A. Ordway, D. J. Garry, *J Exp Biol* **2004**, 207, 3441.
- [101] J. B. Wittenberg, B. A. Wittenberg, *J Exp Biol* **2003**, 206, 2011.
- [102] I. Vecchio, C. Tornali, N. L. Bragazzi, M. Martini, *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, 9, 613.
- [103] A. R. Saltiel, C. R. Kahn, *Nature* 2001 414:6865 **2001**, 414, 799.
- [104] A. D. Association, *Diabetes Care* **2021**, 44, S15.
- [105] R. A. DeFronzo, E. Ferrannini, L. Groop, R. R. Henry, W. H. Herman, J. J. Holst, F. B. Hu, C. R. Kahn, I. Raz, G. I. Shulman, D. C. Simonson, M. A. Testa, R. Weiss, *Nature Reviews Disease Primers* 2015 1:1 **2015**, 1, 1.
- [106] Y. Gao, Y. Zhang, X. Liu, *MedComm (Beijing)* **2024**, 5, e509.
- [107] J. B. Imboden, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2009**, 4, 417.
- [108] Y. Gao, Y. Zhang, X. Liu, *MedComm (Beijing)* **2024**, 5, e509.
- [109] A. Jagpal, I. Navarro-Millán, *BMC Rheumatology* 2018 2:1 **2018**, 2, 1.
- [110] S. M. A. Hannawi, H. Hannawi, I. Al Salmi, *Oman Med J* **2021**, 36, e262.
- [111] W. Y. Chi, Y. Der Li, H. C. Huang, T. E. H. Chan, S. Y. Chow, J. H. Su, L. Ferrall, C. F. Hung, T. C. Wu, *Journal of Biomedical Science* 2022 29:1 **2022**, 29, 1.
- [112] P. K. Zarandi, M. R. Zinatizadeh, M. Zinatizadeh, M. H. Yousefi, N. Rezaei, *Biomed Pharmacother* **2021**, 137.
- [113] J. Kulesza, E. Kulesza, P. Koziński, W. Karpik, M. Broncel, M. Fol, *Vaccines* 2022, Vol. 10, Page 1641 **2022**, 10, 1641.
- [114] E. Hartenian, D. Nandakumar, A. Lari, M. Ly, J. M. Tucker, B. A. Glaunsinger, *J Biol Chem* **2020**, 295, 12910.
- [115] J. P. Townsend, H. B. Hassler, A. Dornburg, *Clinical Infectious Diseases* **2025**, 80, 316.
- [116] AstraZeneca COVID-19 vaccine: review of very rare cases of unusual blood clots continues | European Medicines Agency (EMA).
- [117] J. Roh, R. Kitchen, J. S. Guseh, J. McNeill, M. Aid, A. Martinot, A. Yu, C. Platt, J. Rhee, B. Weber, L. Trager, M. Hastings, S. Ducat, P. Xia, C. Castro, B. Atlason, T. Churchill, M. Di Carli, P. Ellinor, D. Barouch, J. Ho, A. Rosenzweig, *Res Sq* **2021**, rs.3.rs.
- [118] G. Çakırca, T. Damar Çakırca, M. Üstünel, A. Torun, İ. Koyuncu, *Ir J Med Sci* **2022**, 191, 1925.
- [119] M. Cazzola, P. Rogliani, S. S. Salvi, J. Ora, M. G. Matera, *Lung* **2021**, 199, 335.

- [120] R. Roubenoff, P. Dellaripa, M. R. Nadeau, L. W. Abad, B. A. Muldoon, J. Selhub, I. H. Rosenberg, *Arthritis Rheum* **1997**, *40*, 718.
- [121] G. W. Rafter, *Med Hypotheses* **1994**, *43*, 59.
- [122] D. Vasiljevic, A. Tomic-Lucic, S. Zivanovic, M. Milosavljevic, S. Radovanovic, N. Andjelkovic, D. Djuric, M. Veselinovic, *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* **2015**, *16*, 207.
- [123] J. C. Banford, D. H. Brown, R. A. Hazelton, C. J. McNeil, W. E. Smith, R. D. Sturrock, *Rheumatol Int* **1982**, *2*, 107.
- [124] Y. H. Polat, Ş. Erten, A. Kor, İ. Dogan, Y. Maraş, O. Küçükşahin, G. Y. Üstüner, Ö. Erel, *Clin Biochem* **2023**, *111*, 81.
- [125] A. Hernanz, A. Plaza, E. Martín-Mola, E. De Miguel, *Clin Biochem* **1999**, *32*, 65.
- [126] Giustarini, D., Lorenzini, S., Rossi, R., Chindamo, D., Di Simplicio, P., & Marcolongo, R., *Clin Exp Rheumatol* **2005**, *23*(2), 205–212.
- [127] A. Hernanz, A. Plaza, E. Martín-Mola, E. De Miguel, *Clin Biochem* **1999**, *32*, 65.
- [128] A. Yxfeldt, S. Wållberg-Jonsson, J. Hulthén, S. Rantapää-Dahlqvist, *Scand J Rheumatol* **2003**, *32*, 205.
- [129] J. Głuszek, M. Wierzowiecka, K. Niklas, A. Niklas, *Reumatologia* **2020**, *58*, 282.
- [130] K. Woolf, M. M. Manore, *J Am Diet Assoc* **2008**, *108*, 443.
- [131] Yang X, Gao F, Liu Y. *Clin Exp Rheumatol*. **2015**, *33*(6), 900-903.
- [132] D. Vasiljevic, A. Tomic-Lucic, S. Zivanovic, M. Milosavljevic, S. Radovanovic, N. Andjelkovic, D. Djuric, M. Veselinovic, *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* **2015**, *16*, 207.
- [133] J. C. Banford, D. H. Brown, R. A. Hazelton, C. J. McNeil, W. E. Smith, R. D. Sturrock, *Rheumatol Int* **1982**, *2*, 107.
- [134] A. Tuzcu, R. A. Baykara, A. Omma, G. K. Acet, E. Dogan, M. C. Cure, S. C. Sandikci, E. Cure, S. Neşelioğlu, O. Erel, *Rom J Intern Med* **2019**, *57*, 30.
- [135] M. D. Magnano, M. C. Genovese, *Curr Rheumatol Rep* **2005**, *7*, 407.
- [136] A. Icardi, P. Araghi, M. Ciabattini, U. Romano, P. Lazzarini, G. Bianchi, *Reumatismo* **2003**, *55*.
- [137] V. Veeranna, S. K. Zalawadiya, A. Niraj, J. Pradhan, B. Ference, R. C. Burack, S. Jacob, L. Afonso, *J Am Coll Cardiol* **2011**, *58*, 1025.
- [138] C. C. Shih, Y. L. Shih, J. Y. Chen, *BMC Cardiovasc Disord* **2021**, *21*, 1.
- [139] H. yong Peng, C. feng Man, J. Xu, Y. Fan, *J Zhejiang Univ Sci B* **2015**, *16*, 78.

- [140] M. Abu-Farha, S. Al-Sabah, M. M. Hammad, P. Hebbar, A. M. Channanath, S. E. John, I. Taher, A. Almaeen, A. Ghazy, A. Mohammad, J. Abubaker, H. Arefanian, F. Al-Mulla, T. A. Thanaraj, *Front Pharmacol* **2020**, *11*.
- [141] M. Karst, J. Hollenhorst, J. Achenbach, *Med Hypotheses* **2020**, *144*.
- [142] E. Lupi-Herrera, M. E. Soto-López, A. de J. Lugo-Dimas, M. E. Núñez-Martínez, R. Gamboa, C. Huesca-Gómez, L. M. Sierra-Galán, V. Guarner-Lans, *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* **2018**, *25*, 1076029618780344.
- [143] G. Ponti, C. Ruini, A. Tomasi, *Med Hypotheses* **2020**, *143*, 109859.
- [144] D. Smajlović, *Med Hypotheses* **2020**.
- [145] G. Ponti, L. Roli, G. Oliva, M. Manfredini, T. Trenti, S. Kaleci, R. Iannella, B. Balzano, A. Coppola, G. Fiorentino, T. Ozben, V. D. Paoli, D. Debbia, E. De Santis, V. Pecoraro, A. Melegari, M. R. Sansone, M. Lugara, A. Tomasi, *Clin Chem Lab Med* **2021**, *59*, E354.
- [146] K. Kurpet, R. Głowacki, G. Chwatko, *Molecules* **2021**, Vol. 26, Page 3321 **2021**, *26*, 3321.
- [147] ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- [148] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry | FDA.
- [149] A. M. Svardal, M. A. Mansoor, P. M. Ueland, *Anal Biochem* **1990**, *184*, 338.
- [150] M. A. Mansoor, A. M. Svardal, P. M. Ueland, *Anal Biochem* **1992**, *200*, 218.
- [151] E. Bald, G. Chwatko, R. Głowacki, K. Kuśmierek, *J Chromatogr A* **2004**, *1032*, 109.
- [152] R. C. Fahey, G. L. Newton, *Methods Enzymol* **1987**, *143*, 85.
- [153] R. C. Fahey, G. L. Newton, R. Dorian, E. M. Kosower, *Anal Biochem* **1980**, *107*, 1.
- [154] M. Isokawa, T. Kanamori, T. Funatsu, M. Tsunoda, *Journal of Chromatography B* **2014**, *964*, 103.
- [155] R. Głowacki, J. Stachniuk, K. Borowczyk, *Acta Chromatogr* **2016**, *28*, 333.
- [156] K. Borowczyk, P. Olejarz, G. Chwatko, M. Szyłberg, R. Głowacki, *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, Vol. 21, Page 1049 **2020**, *21*, 1049.
- [157] K. Borowczyk, M. Wyszczelska-Rokiel, P. Kubalczyk, R. Głowacki, *Journal of Chromatography B* **2015**, *981–982*, 57.
- [158] R. Gowacki, E. Bald, *J Liq Chromatogr Relat Technol* **2009**, *32*, 2530.
- [159] M. Özyürek, S. Baki, N. Güngör, S. E. Çelik, K. Güçlü, R. Apak, *Anal Chim Acta* **2012**, *750*, 173.

- [160] S. Borra, D. E. Featherstone, S. A. Shippy, *Anal Chim Acta* **2015**, 853, 660.
- [161] D. E. Graham, K. C. Harich, R. H. White, *Anal Biochem* **2003**, 318, 325.
- [162] P. Monostori, G. Wittmann, E. Karg, S. Túri, *Journal of Chromatography B* **2009**, 877, 3331.
- [163] D. W. Jacobsen, V. J. Gatautis, R. Green, K. Robinson, S. R. Savon, M. Secic, J. Ji, J. M. Otto, L. M. Taylor, *Clin Chem* **1994**, 40, 873.
- [164] T. Fiskerstrand, H. Refsum, G. Kvalheim, P. M. Ueland, *Clin Chem* **1993**, 39, 263.
- [165] W. Witt, B. Rüstow, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1998**, 705, 127.
- [166] G. Cevasco, A. M. Piatek, C. Scapolla, S. Thea, *J Chromatogr A* **2010**, 1217, 2158.
- [167] R. Ferin, M. L. Pavão, J. Baptista, *Journal of Chromatography B* **2012**, 911, 15.
- [168] K. J. Huang, C. H. Han, J. Li, Z. W. Wu, Y. M. Liu, Y. Y. Wu, *Chromatographia* **2011**, 74, 145.
- [169] S. Satoh, T. Toyo'oka, T. Fukushima, S. Inagaki, *Journal of Chromatography B* **2007**, 854, 109.
- [170] V. Concha-Herrera, J. R. Torres-Lapasió, M. C. García-Alvarez-Coque, *J Liq Chromatogr Relat Technol* **2004**, 27, 1593.
- [171] A. Sano, H. Nakamura, *Analytical Sciences* 1998 14:4 **1998**, 14, 731.
- [172] C. J. Tsai, Y. C. Lin, Y. L. Chen, C. H. Feng, *Talanta* **2014**, 130, 347.
- [173] H. Li, Y. Kong, L. Chang, Z. Feng, N. Chang, J. Liu, J. Long, *Chromatographia* **2014**, 77, 145.
- [174] ICH M10 on bioanalytical method validation - Scientific guideline | ICH.
- [175] L. Turell, R. Radi, B. Alvarez, *Free Radic Biol Med* **2013**, 65, 244.
- [176] G. Chwatko, M. Krawczyk, M. Iciek, A. Kamińska, A. Bilska-Wilkosz, B. Marcykiewicz, R. Głowacki, *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, 12, 4878.
- [177] D. Tsikas, J. Sandmann, M. Ikic, J. Fauler, D. O. Stichtenoth, J. C. Frölich, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1998**, 708, 55.
- [178] K. Borowczyk, P. Olejarz, G. Chwatko, M. Szyłberg, R. Głowacki, *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 1049 **2020**, 21, 1049.
- [179] T. D. Nolin, M. E. McMenamin, J. Himmelfarb, *Journal of Chromatography B* **2007**, 852, 554.
- [180] S. Sechovcová, P. Královcová, R. Kand'ár, K. Ventura, *Biomedical Chromatography* **2018**, 32, e4172.

- [181] M. M. Nascimento, M. E. Suliman, M. Silva, T. Chinaglia, J. Marchioro, S. Y. Hayashi, M. C. Riella, B. Lindholm, B. Anderstam, *Peritoneal Dialysis International* **2010**, 30, 336.
- [182] T. Andus, T. Geiger, T. Hirano, T. Kishimoto, P. C. Heinrich, *Eur J Immunol* **1988**, 18, 739.
- [183] P. H. J. K. Ł. Izabela Korczowska, *Postępy Nauk Medycznych* **2011**.
- [184] F. Paganelli, G. Mottola, J. Fromonot, M. Marlinge, P. Deharo, R. Guieu, J. Ruf, *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 1690 **2021**, 22, 1690.
- [185] S. V. Unadkat, B. K. Padhi, A. V. Bhongir, A. P. Gandhi, M. A. Shamim, N. Dahiya, P. Satapathy, S. Rustagi, M. N. Khatib, A. Gaidhane, Q. S. Zahiruddin, R. Sah, H. A. Serhan, *Egyptian Heart Journal* **2024**, 76, 1.
- [186] H. Refsum, P. M. Ueland, O. Nygård, S. E. Vollset, *Annu Rev Med* **1998**, 49, 31.
- [187] L. Coppo, S. Scheggi, G. Demontis, R. Priora, S. Frosali, A. Margaritis, D. Summa, D. Di Giuseppe, M. Ulivelli, P. Di Simplicio, *Antioxid Redox Signal* **2023**, 38, 920.
- [188] Chromatografia cieczowa - teoria i praktyka - Irena Malinowska, Waldemar Wardencki, Zygfryd Witkiewicz. Księgarnia PWN, **2019**.
- [189] Agilent Serii 1200 Infinity ELSD – Podręcznik użytkownika, Agilent Technologies, **2013**, Niemcy.
- [190] G. K. Webster, J. S. Jensen, A. R. Diaz, *J Chromatogr Sci* **2004**, 42, 484.
- [191] S. Han, K. Karłowicz-Bodalska, D. Szura, L. Ozimek, W. Musiał, *The Scientific World Journal* **2013**, 2013, 564962.
- [192] M. LIPP, E. ANKLAM, *Seminars in Food Analysis* **1997**.
- [193] Povolo, M. & Contarini, Giovanna. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **2012**, 89, 184-192.
- [194] Letter, William. (1990). Advanced Evaporative Light-Scattering Detector (ELSD) For A Variety of HPLC Applications.
- [195] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, E. Psillakis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2022**, 149, 116553.
- [196] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, *Anal Chem* **2020**, 92, 10076.
- [197] Y. Cheng, Y. Chen, X. Sun, Y. Li, C. Huang, H. Deng, Z. Li, *Inflammation* **2014**, 37, 1459.
- [198] S. Drynda, B. Ringel, M. Kekow, C. Kühne, A. Drynda, M. O. Glocker, H. J. Thiesen, J. Kekow, *Pathol Res Pract* **2004**, 200, 165.

- [199] B. Vander Cruyssen, T. Cantaert, L. Nogueira, C. Clavel, L. De Rycke, A. Dendoven, M. Sebag, D. Deforce, C. Vincent, D. Elewaut, G. Serre, F. De Keyser, *Arthritis Res Ther* **2006**, 8, 1.
- [200] Gozdowska M, Kulczykowska E. Oznaczanie hormonów w osoczu krwi technika HPLC, *Postepy Biochem.* **2002**, 48(4), 317-324.
- [201] B. Potter, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* **2007**, 1.
- [202] Bartolomeo MP, Maisano F. *J Biomol Tech.* **2006**, 17(2), 131-137.
- [203] C. Toriumi, K. Imai, *Anal Chem* **2003**, 75, 3725.
- [204] Fluorogenic Derivatization Followed by HPLC Quantification and Final Identification of Proteins by HPLC-Tandem Mass Spectrometry (FD-LC-MS/MS) Method, *Quantitative Proteome Analysis* **2013**, 15.
- [205] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, 50, 78.
- [206] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2008**, 27, 497.
- [207] P. T. Anastas, *Crit Rev Anal Chem* **1999**, 29, 167.
- [208] B. Marciniak, *Kwartalnik NAUKA* **2012**.
- [209] M. Bystrzanowska, M. Tobiszewski, *Analityka: Nauka i Praktyka* **2020**, 2, 40.
- [210] G. Lippi, N. Blanckaert, P. Bonini, S. Green, S. Kitchen, V. Palicka, A. J. Vassault, M. Plebani, *Clin Chem Lab Med* **2008**, 46, 764.
- [211] Aruda, Wayne & Walfish, Steven & Krull, Ira. *LCGC North America* **2008**, 26, 1032-1042.
- [212] J. Piechocka, N. Matwiej, M. Gaweł, M. Matyjaszczyk, R. Głowacki, G. Chwatko, *Scientific Reports* 2023 13:1 **2023**, 13, 1.
- [213] J. Zhou, L. Zhang, Y. Wang, C. Yan, *J Sep Sci* **2011**, 34, 1811.
- [214] N. C. Megoulas, M. A. Koupparis, *Anal Bioanal Chem* **2005**, 382, 290.
- [215] R. C. S. de Sousa, M. de Fatima Gomides, K. Costa, M. R. Ribeiro Cunha, M. de Oliveira Almeida, F. B. Custódio, M. B. A. Gloria, *Food Anal Methods* **2023**, 17, 207.
- [216] M. Soyseven, B. Sezgin, G. Arli, *Microchemical Journal* **2023**, 193, 109225.
- [217] J. M. Dersch, T. T. T. N. Nguyen, J. Østergaard, S. Stürup, B. Gammelgaard, *Anal Bioanal Chem* **2015**, 407, 2829.
- [218] S. Ohlson, B. M. Gudmundsson, P. Wikstrom, P. O. Larsson, *Clin Chem* **1988**, 34, 2039.

- [219] M. Grebe, D. Pröfrock, A. Kakuschke, J. A. C. Broekaert, A. Prange, *Metallomics* **2011**, 3, 176.
- [220] S. Ravi, K. K. Peh, Y. Darwis, B. Krishna Murthy, T. Raghu Raj Singh, *Chromatographia* **2007**, 66, 805.
- [221] B. Yilmaz, Y. Kadioglu, I. Capoglu, *J Chromatogr Sci* **2012**, 50, 586.
- [222] A. Najjar, M. Alawi, N. AbuHeshmeh, A. Sallam, *Advances in Pharmaceutics* **2014**, 2014, 749823.
- [223] Y. Xie, H. He, G. Fan, Y. Wu, *J Pharm Biomed Anal* **2012**, 57, 7.
- [224] Al-Rimawi, Fuad. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry* **2014**, 4, 585-593.
- [225] M. Pan, Y. Lu, L. Feng, X. Zhou, J. Xiong, H. Li, *Anal Chem* **2022**, 94, 11753.
- [226] M. Pan, Y. Lu, L. Feng, X. Zhou, J. Xiong, H. Li, *Anal Chem* **2022**, 94, 11753.
- [227] A. M. Merlot, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, *Front Physiol* **2014**, 5 AUG, 108587.
- [228] V. Mishra, R. J. Heath, *Int J Mol Sci* **2021**, 22, 8411.
- [229] C. D. Karakochuk, S. Y. Hess, D. Moorthy, S. Namaste, M. E. Parker, A. I. Rappaport, R. Wegmüller, O. Dary, *Ann N Y Acad Sci* **2019**, 1450, 126.
- [230] PLHBB - Overview: Plasma Free Hemoglobin, Plasma, test-information, Mayo Foundation for Medical Education and Research.
- [231] L. Koperwas. Właściwości i wybrane metody oznaczania stężenia hemoglobiny cz.I. <http://laboratoria.net/arttykul/22282.html>
- [232] L. B. Pupim, C. J. Martin, T. A. Ikizler, *Nutritional Management of Renal Disease* **2013**, 137.
- [233] S. Kattula, J. R. Byrnes, A. S. Wolberg, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2017**, 37, e13.
- [234] G. D. O. Lowe, A. Rumley, I. J. Mackie, *Ann Clin Biochem* **2004**, 41, 430.
- [235] C. K. Zoltani, *Biomarkers in Toxicology* **2019**, 209.
- [236] A. Z. Gondal, L. A. Foris, M. Zubair, J. R. Richards, *StatPearls* **2023**.
- [237] E. Carmina, F. Z. Stanczyk, R. A. Lobo, *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Seventh Edition* **2013**, 822.
- [238] R. Gulhar, M. A. Ashraf, I. Jialal, *StatPearls* **2023**.
- [239] WHO Guidelines for Haemoglobin Cutoffs to Define Anaemia - 2024 Guideline Summary.

- [240] B. Möller, A. Scherer, F. Förger, P. M. Villiger, A. Finckh, *Ann Rheum Dis* **2014**, 73, 691.
- [241] Y. fan Chen, S. qian Xu, Y. chen Xu, W. jun Li, K. ming Chen, J. Cai, M. Li, *Clin Rheumatol* **2020**, 39, 1737.
- [242] Furst DE, Chang H, Greenberg JD, et al. *Clin Exp Rheumatol*. **2009**, 27(4), 560-566.
- [243] J. Shah, A. Farooq, S. Zadran, Z. H. Kakar, M. Zarrar, H. M. H. S. Bhatti, *Cureus* **2024**, 16.
- [244] G. Smyrnova, *Rev Bras Reumatol* **2014**, 54, 437.
- [245] Diagnostyka laboratoryjna. T. 1, **2009**.
- [246] R. H. Khalil, N. Al-Humadi, *Biomed Rep* **2020**, 12, 143.
- [247] M. Babikir, O. Babikir, N. Eldeen, A. M. Gaufri, M. B. O. Babikir, N. E. A. M. Gaufri, O. Journal, *Open Access Library Journal* **2017**, 4, 1.
- [248] T. Rooney, R. Scherzer, J. K. Shigenaga, J. Graf, J. B. Imboden, C. Grunfeld, *Rheumatology* **2011**, 50, 1458.
- [249] R. A. Feelders, G. Vreugdenhil, G. de Jong, A. J. G. Swaak, H. G. Van Eijk, *Rheumatol Int* **1992**, 12, 195.
- [250] G. Vreugdenhil, A. J. G. Swaak, *Rheumatol Int* **1990**, 9, 243.
- [251] G. E. Cartwright, G. R. Lee, *Br J Haematol* **1971**, 21, 147.
- [252] K. Imai, S. Uzu, T. Toyo'oka, *J Pharm Biomed Anal* **1989**, 7, 1395.
- [253] Błońska-Sikora E., Oszczudłowski J., Witkiewicz Z., Wideł D. *Chemik* **2012**, 66(9), 929-942.
- [254] M. I. Khan, Z. Iqbal, *Journal of Chromatography B* **2011**, 879, 2567.
- [255] K. Kuśmierek, E. Bald, *Biomedical Chromatography* **2009**, 23, 770.
- [256] Gatea, Florentina & Petrareanu, Catalina & Lupeanu, Elena & Radu, Gabriel. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, Vol. 76, Iss. 1, **2014**. 76.
- [257] R. Ferin, M. L. Pavão, J. Baptista, *Journal of Chromatography B* **2012**, 911, 15.
- [258] S. Tokgöz, C. Bilgi, E. Çakir, M. Kemal Erbil, T. Kutluay, *Turk J Med Sci* **2003**, 33, 71.
- [259] T. Santa, C. Aoyama, T. Fukushima, K. Imai, T. Funatsu, *Biomedical Chromatography* **2006**, 20, 656.
- [260] M. L. Steele, L. Ooi, G. Münch, *Anal Biochem* **2012**, 429, 45.
- [261] T. Toyo'oka, S. Uchiyama, Y. Saito, K. Imai, *Anal Chim Acta* **1988**, 205, 29.
- [262] S. H. Kang, J. W. Kim, D. S. Chung, *J Pharm Biomed Anal* **1997**, 15, 1435.

- [263] T. Toyo'oka, *Journal of Chromatography B* **2009**, 877, 3318.
- [264] H. Nishiuchi, M. Kohmura, H. Wakabayashi, *Food Sci Technol Res* **2011**, 17, 341.
- [265] K. Shimada, K. Mitamura, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1994**, 659, 227.
- [266] A. Świdarska, M. Wojciechowska, A. Mamcarz, A. Cudnoch-Jędrzejewska, *Medycyna Faktów* **2016**, 9, 206.
- [267] Gawrysiak, W., Skrypnik, K., Skrypnik, D., Dudlik, P., Pastusiak, K., & Bogdański, P. (2017). Układ sercowo-naczyniowy w wybranych chorobach układowych tkanki łącznej — wskazówki w codziennej praktyce klinicznej. *Forum Zaburzeń Metabolicznych*, 8(1), 12–17.
- [268] Z. Szekanecz, G. Szűcs, G. Kerekes, *Forum Reumatologiczne - Edukacja* **2023**, 2, 110.
- [269] B. D. Scott, T. Hogue, M. S. Fixley, P. B. Adamson, *Clin Cardiol* **2006**, 29, 525.
- [270] J. R. Rey, J. Caro-Codón, S. O. Rosillo, Á. M. Iniesta, S. Castrejón-Castrejón, I. Marco-Clement, L. Martín-Polo, C. Merino-Argos, L. Rodríguez-Sotelo, J. M. García-Veas, L. A. Martínez-Marín, M. Martínez-Cossiani, A. Buño, L. Gonzalez-Valle, A. Herrero, J. L. López-Sendón, J. L. Merino, J. Caro-Codon, S. Castrejon-Castrejon, M. Martinez-Cossiani, C. Merino, L. Martin-Polo, L. A. Martinez, J. M. Garcia-Veas, L. Rodriguez-Sotelo, J. J. Rios, J. R. Arribas, F. Arnalich, C. Prados, R. Alvarez-Sala, M. Quintana, A. García de Lorenzo, F. Reinoso, A. Rivera, R. M. Torres, J. Garcia-Rodriguez, A. Borobia, *Eur J Heart Fail* **2020**, 22, 2205.
- [271] Dominika Krogulec, Carlo Bieńkowski, Justyna D. Kowalska, Agnieszka Bednarska, Beata Wojtycha-Kwaśnica, Natalia Jurek, Piotr Ząbek, Hanna Czeszko-Paprocka, Monika Mrozińska, Marcin Paciorek, Andrzej Pihowicz, Andrzej Horban. Powikłania sercowo-naczyniowe w przebiegu COVID-19 – wnioski z retrospektywnego badania obserwacyjnego oraz ich znaczenie dla przyszłej opieki nad pacjentami. Agencja Badań Medycznych.