



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

**Autoreferat przedstawiający opis osiągnięć naukowych
w języku polskim**

dr Justyna Dobrowolska-Iwanek

Zakład Bromatologii
Wydział Farmaceutyczny UJ CM
Kraków 2023

SPIS TREŚCI

1. IMIĘ I NAZWISKO	4
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.	4
3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH.	4
4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.):	5
4.1 TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	5
4.2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	5
4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO WW. PRACY/PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA	6
5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.	42
6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ:	52
6.1. OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE	52
6.2. OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE,	56
6.3. OSIĄGNIĘCIA POPULARYZUJĄCE NAUKĘ	57

7. OPRÓCZ KWESTII WYMIENIONYCH W PKT. 1-6, 59
WNIOSKODAWCA MOŻE PODAĆ INNE INFORMACJE, WAŻNE Z
JEGO PUNKTU WIDZENIA, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY
ZAWODOWEJ.

1. IMIĘ I NAZWISKO.

Justyna Dobrowolska-Iwanek

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.

- Rok 2004: tytuł magistra chemii, na podstawie pracy magisterskiej pt.: *„Oznaczanie selenu i arsenu w materiale biologicznym przy użyciu metody HG-AFS”*, Zakład Chemii Sądowej, Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Promotor – Prof. dr hab. Paweł Kościelniak.
- Rok 2009: stopień naukowy doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia, na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: *„Analiza pierwiastkowa wybranych narządów organizmu ludzkiego pod kątem toksykologicznym i klinicznym”*, Zakład Chemii Sądowej, Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Promotor – Prof. dr hab. Paweł Kościelniak.

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH.

- Od 02.03.2009 r. do 31.01.2010 r.: pracownik naukowo-techniczny (starszy referent) w Zakładzie Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.
- Od 1.02.2010 r. do 31.03.2011 r.: pracownik naukowo-techniczny (samodzielny referent) w Zakładzie Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.
- Od 01.04.2011 r. do 30.09.2015 r.: asystent w Zakładzie Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.
- Od 01.10.2015 r. do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum;

Od października 2015 roku do czerwca 2017 roku podczas ciąży i urlopu macierzyńskiego miałam przerwę w wykonywaniu doświadczeń laboratoryjnych i aktywności naukowej.

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.).

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl sześciu publikacji o sumarycznym wskaźniku oddziaływania IF (**Impact Factor**) **17,582** i łącznej liczbie punktów **MEiN 400**.

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.

Rozwój i optymalizacja metod oznaczania krótkołańcuchowych kwasów organicznych w żywności oraz próbkach pochodzenia zwierzęcego i ludzkiego.

4.2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.

H1. Chłopicka, J., **Dobrowolska-Iwanek, J.**, Woźniakiewicz, M., Zagrodzki, P. Optimization of conditions for organic acid extraction from edible plant material as applied to radish sprouts. *Food Analytical Methods*, 2014, 7, 1323-1327. DOI: 10.1007/s12161-013-9752-z

F = 1.956, MEiN = 25

H2. **Dobrowolska-Iwanek, J.**, Zagrodzki, P., Woźniakiewicz, M., Woźniakiewicz, A., Zwolińska-Wcisło, M., Winnicka, D., Paśko, P. Procedure optimization for extracting short-chain fatty acids from human faeces. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 124, 337-340. DOI:10.1016/j.jpba.2016.02.042

IF = 3.255, MEiN = 35

H3. **Dobrowolska-Iwanek, J.**, Zagrodzki, P., Prochownik, E., Jarkiewicz, A., Paśko, P. Influence of brassica sprouts on short chain fatty acids concentration in stools of rats with thyroid dysfunction. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 2019, 76(6). DOI: 10.32383/appdr/111840

IF = 0,456 MEiN = 100

H4. Dobrowolska-Iwanek, J., Lauterbach, R., Huras, H., Paśko, P., Prochownik, E., Woźniakiewicz, M., Chrząszcz S., Zagrodzki, P. HPLC-DAD method for the quantitative determination of short-chain fatty acids in meconium samples. *Microchemical Journal*, 2020, 155, 104671. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104671

IF = 4,821, MEiN = 70

H5. Dobrowolska-Iwanek, J. Simple method for determination of short-chain organic acid in mead. *Food Analytical Methods*, 2015, 8, 2356-2359. DOI: 10.1007/s12161-015-0127-5

IF = 2,167 MEiN = 30

H6. Dobrowolska-Iwanek, J., Jamka-Kasprzyk, M., Rusin, M., Paśko, P., Grekh, S., Jurczak, A.: Developed and validated capillary isotachopheresis method for the rapid determining organic acids in children's saliva. *Molecules*, 2023, 28(3), 1092. DOI: 10.3390/molecules28031092

IF = 4,927 MEiN = 140

4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO WW. PRACY/PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.

Celem przeprowadzonych badań naukowych, które zostały opisane w pracach zgłoszonych w ramach postępowania habilitacyjnego (**H1-H6**), było opracowanie metod ekstrakcji oraz oznaczania krótkołańcuchowych kwasów organicznych w żywności oraz próbkach pochodzenia zwierzęcego i ludzkiego.

Cele szczegółowe:

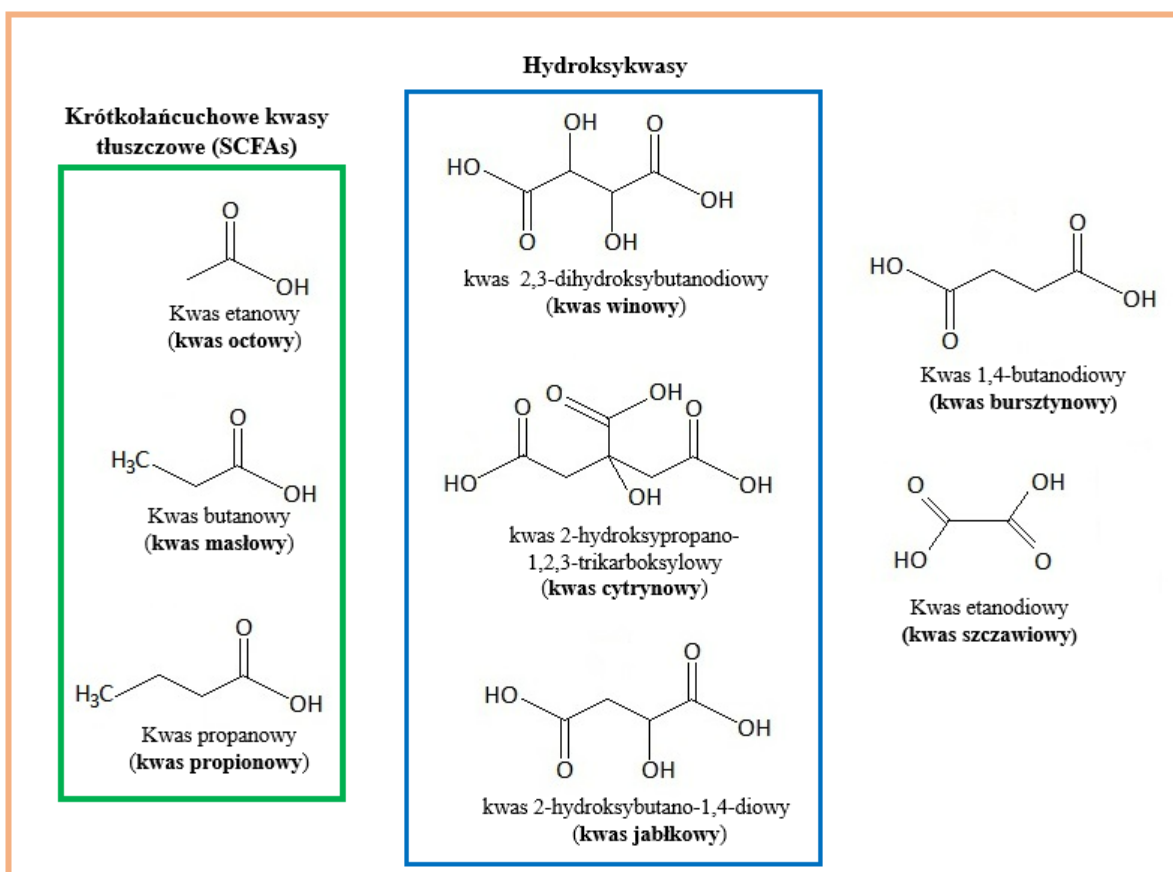
- optymalizacja warunków ekstrakcji krótkołańcuchowych kwasów organicznych z różnych matryc biologicznych (pochodzenia roślinnego (**H1**) i ludzkiego (**H2**)) z wykorzystaniem nowoczesnych technik wmywania,

- opracowanie metody z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania krótkołańcuchowych kwasów organicznych w różnych matrycach biologicznych (kał szczurzy (H3) i smółka noworodków (H4)),
- opracowanie szybkiej procedury analitycznej do oznaczania wybranych krótkołańcuchowych kwasów organicznych w różnych matrycach biologicznych (miody pitne (H5) i ludzka ślina (H6)) z wykorzystaniem techniki izotachoforezy kapilarnej.

Ogólna charakterystyka krótkołańcuchowych kwasów organicznych

Krótkołańcuchowe kwasy organiczne (SCOAs, z ang. *short-chain organic acids*), to związki o krótkich łańcuchach węglowych (do 6 atomów węgla w cząsteczce) i małej masie cząsteczkowej, które zawierają przynajmniej jedną grupę karboksylową, stanowiącą ich grupę funkcyjną. Należą one do słabych elektrolitów, co oznacza, że w wodzie ulegają częściowej dysocjacji. Substancje te mogą zawierać również ugrupowania charakterystyczne dla innych związków organicznych, na przykład grupę hydroksylową. Są to związki szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, występują bowiem w organizmach roślin i zwierząt. Są również produktami aktywności grzybów i bakterii [1]. Należy nadmienić, że źródłem tych związków w produktach spożywczych mogą być niektóre procesy technologiczne (np. proces fermentacji), jak również zastosowanie ich w formie dodatku do żywności. Mogą także stanowić produkt przemian biochemicznych, np. zachodzących pod wpływem rozwijających się drobnoustrojów. Na Ryc. 1 przedstawiono wzory strukturalne przykładowych krótkołańcuchowych kwasów organicznych z uwzględnieniem hydroksykwasów oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs, z ang. *short-chain fatty acids*), które omówione zostaną w dalszej części autoreferatu. W pracy przyjęto posługiwanie się zwyczajowymi nazwami kwasów organicznych.

Krótkołańcuchowe kwasy organiczne (SCOAs)



Ryc. 1. Wzory strukturalne wybranych krótkołańcuchowych kwasów organicznych (SCOAs), z uwzględnieniem przykładów hydroksykwasy oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs). W nawiasach podano nazwy zwyczajowe.

Uzasadnienie wyboru materiału biologicznego do badań:

Materiał roślinny

Krótkołańcuchowe kwasy organiczne, występujące w roślinach, to związki cechujące się bardzo dobrą rozpuszczalnością w wodzie. W większości przypadków wynika to z obecności dodatkowych hydrofilowych grup hydroksylowych lub/i karboksylowych. Przykładami takich związków mogą być hydroksykwasy: (i) kwas cytrynowy, który posiada w swojej budowie trzy grupy karboksylowe i jedną hydroksylową, (ii) kwas jabłkowy z dwiema grupami karboksylowymi i jedną hydroksylową czy też (iii) kwas winowy z dwiema grupami karboksylowymi i dwiema hydroksylowymi (Ryc. 1).

Krótkołańcuchowe kwasy organiczne pełnią istotną rolę w fizjologii roślin, kształtują także ich właściwości sensoryczne. Biorą udział w podstawowych szlakach metabolizmu roślin takich jak np.: (i) cykl Krebsa, w którym, z jednej strony, wytwarzane są związki pośrednie

do syntezy aminokwasów i kwasów tłuszczowych, a z drugiej, energia niezbędna dla wielu procesów fizjologicznych [2]; (ii) fotosynteza oraz (iii) szlak glioksylanowy, które są odpowiedzialne za syntezę węglowodanów pełniących rolę rezerwuaru węgla w roślinach [3, 4]. Ponadto, badania wskazują na istotną rolę krótkołańcuchowych kwasów organicznych m.in. w rozwijaniu przez roślinę tolerancji wobec stresu środowiskowego. Metale ciężkie, takie jak kadm, rtęć, ołów, ale też te funkcjonalne, w zbyt wysokich stężeniach mogą oddziaływać na rośliny toksycznie, powodując zaburzenie procesów fizjologicznych, ograniczenie pobierania składników mineralnych, zahamowanie ich wzrostu, chlorozę lub nekrozę, czy zmiany ultrastruktury komórki i morfologii roślin. Jednym z mechanizmów obronnych, uruchamianych w roślinie w odpowiedzi na czynnik stresujący, jest proces detoksykacji, w którym udział biorą m.in. SCOAs, takie jak kwas jabłkowy, cytrynowy, szczawiowy czy winowy, posiadające zdolność kompleksowania metali [5, 6]. Ponadto zaobserwowano, że u niektórych gatunków roślin w stanach niedoboru fosforu, dochodzi do wzmożenia biosyntezy kwasów organicznych, które poprzez system korzeniowy odprowadzane są do gleby. Następnie, na drodze różnych mechanizmów (np. poprzez zakwaszenie gleby czy tworzenie kompleksów z jonami Ca^{2+} , Al^{3+}) SCOAs zwiększają dostępność dobrze przyswajalnych związków fosforu (jonów wodoro- i diwodorofosforanowych (V)), które wcześniej tworzyły trudno rozpuszczalne sole/kompleksy z jonami/tlenkami metali [7, 8]. W ten sposób roślina adaptuje się do warunków deficytowych. Badacze również wskazali rolę kwasu jabłkowego we wspomaganiu wzrostu korzenia pierwotnego przy niedoborze bioprzyswajalnych form fosforu, kwasu szczawiowego we wspomaganiu tolerancji na stres biotyczny oraz kwasu octowego na stres związany z suszą [8]. Do innych interesujących właściwości SCOAs, w szczególności kwasu mlekowego, szczawiowego i cytrynowego, należy stymulacja rozwoju bakterii i grzybów, bytujących w glebie, dla których mogą stanowić dobre źródło węgla i energii [9]. Krótkołańcuchowe kwasy organiczne warunkują zatem nie tylko prawidłowy przebieg podstawowych procesów fizjologicznych i rozwój roślin, ale również odgrywają istotną rolę między innymi w adaptacji do niekorzystnych czynników otoczenia [8]. Za szczególnie bogate źródło roślinne tych związków uznaje się kielki roślin, będące przykładem żywności funkcjonalnej. Dzięki obecności SCOAs, związki odżywcze, obecne w kielkach, takie jak składniki mineralne [10], mogą zostać przekształcone w kompleksy chelatowe, poprzez tworzenie kompleksów z np. kwasem cytrynowym, co powoduje zwiększenie ich biodostępności w organizmie człowieka. Ponadto, obecność SCOAs w kielkach roślin może sprzyjać ich prawidłowemu rozwojowi, jak również zapewniać

bezpieczeństwo mikrobiologiczne, prowadząc do uzyskania pełnowartościowego produktu żywieniowego, stanowiącego ważny element zrównoważonej diety człowieka.

Badania pod kątem oznaczania krótkołańcuchowych kwasów organicznych w roślinach są zatem istotne z uwagi na ich fundamentalną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu tych organizmów. Mogą również prowadzić do poznania nowego, dotąd nieodkrytego znaczenia tych związków dla kondycji roślin. Ma to duże znaczenie zarówno dla badań podstawowych, z zakresu fizjologii roślin jadalnych i leczniczych, jak i z dziedziny nauk farmaceutycznych, w tym obszarów bromatologii, farmakognozji, czy botaniki farmaceutycznej. Dodatkowo, SCOAs mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie jako markery stresu różnego pochodzenia u roślin, co znajduje coraz większe zainteresowanie w naukach żywieniowych. Różne rodzaje stresu, jak susza, wysokie zasolenie, ograniczanie dostępu światła, czy też stosowanie różnej jakości źródeł światła, jest wykorzystywane w celu stymulacji syntezy związków o działaniu m.in. chemoprewencyjnym, czy też ograniczeniu powstawania związków o działaniu antyodżywczym. Jednak temat ten wymaga dalszych badań.

Miody pitne

Krótkołańcuchowe kwasy organiczne mogą również spełniać rolę markerów jakości spożywanej żywności. W pracy Seraglio i wsp. [11] wskazano, że na podstawie stężenia i profilu krótkołańcuchowych alifatycznych kwasów organicznych możliwe jest odróżnienie miodów kwiatowych od miodów spadziowych i miodów zafałszowanych. Mimo, że kwasy organiczne stanowią niewielką część składników miodu, to mają istotny wpływ na ich właściwości sensoryczne, takie jak smak i aromat. Pełnią także rolę środka konserwującego, przedłużając trwałość produktu. O ile w literaturze przedmiotu wiele prac zostało poświęconych składowi chemicznemu miodów różnego pochodzenia botanicznego, w tym oznaczeniu kwasów organicznych, to wciąż niewiele doniesień dotyczy miodów pitnych [12, 13]. Miody pitne są napojami alkoholowymi, które powstają w wyniku fermentacji alkoholowej brzezki miodowej. Stężenie alkoholu w tych produktach waha się w granicach 9 – 18%. W zależności od proporcji miodu i wody, użytych do przygotowania napoju, możemy wyróżnić cztery główne rodzaje miodów pitnych: półtoraki (1:0,5 – stosunek objętościowy miodu do wody), dwójniaki (1:1), trójniaki (1:2) i czwórniaki (1:3) [14]. Producenci, aby urozmaicić asortyment miodów pitnych i wzbogacić ich bukiet smakowy i aromat, na etapie produkcji mogą wprowadzać różne dodatki. I tak, oprócz miodów pitnych naturalnych (produkcja wyłącznie z miodu), powstają miody owocowe – zawierające dodatek soków owocowych lub

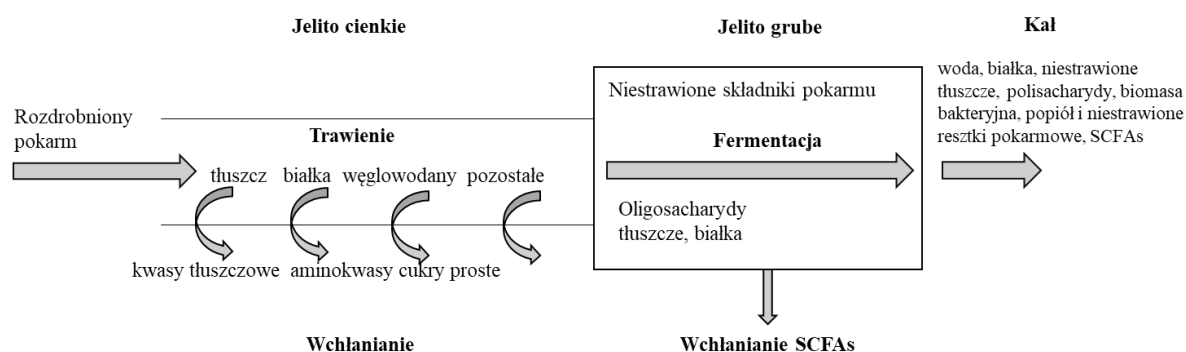
ekstraktów z owoców, korzenno-ziółowe – zawierające dodatek ziół i przypraw korzennych, czy też miody chmielowe. Dozwolone jest również regulowanie kwasowości końcowego produktu poprzez dodatek kwasów organicznych (np. kwasu cytrynowego czy jabłkowego). Należy wspomnieć, że sposób wyrobu fermentowanych napojów winiarskich (w tym - dopuszczalne dodatki) podlega regulacji prawnej. Obowiązującym aktem jest rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 września 2022 „(...) w sprawie szczegółowego sposobu wyrobu fermentowanych napojów winiarskich” [15]. Od 2008 r. polskie miody pitne są zarejestrowane przez Komisję Europejską jako Gwarantowana Tradycyjna Specjalność (rozporządzenie Komisji (WE) nr 729/2008), a niektóre z nich zostały uznane przez organizację międzynarodową Slow Food jako produkty stanowiące bogactwo kulturalno-kulinarne, z uwagi na lokalny i tradycyjny sposób produkcji oraz naturalny skład.

Miody pitne zawierają pulę krótkołańcuchowych kwasów organicznych, charakterystycznych dla miodu, z którego zostały sporządzone (np. kwas glukonowy czy mrówkowy), a ponadto kwasy powstałe podczas fermentacji alkoholowej (np. kwas bursztynowy), a także będące efektem stosowania dodatków w postaci soków owocowych, przypraw czy zakwaszania (np. kwas winowy, jabłkowy czy cytrynowy) [16, 17]. Zatem, oznaczanie zawartości kwasów organicznych w miodach pitnych jest w pełni uzasadnione. Już na etapie produkcji analizy te mogą dostarczyć istotnych informacji dotyczących przebiegu procesu fermentacji czy dojrzewania produktu. Badania ostatecznego produktu mogą potwierdzać autentyczność miodu, z którego napój został sporządzony, a także wskazywać na obecność naturalnych dodatków, zastosowanych w toku produkcji. Takie analizy wpisują się w jeden z aktualnych trendów naukowych w obszarze bromatologii, stanowiąc zarazem kontynuację badań prowadzonych w Zakładzie Bromatologii UJ CM w okresie 1968-1984 r. przez doc. dr hab. Zofię Fedorowską.

Kał/smółka

Szczególną grupę związków wchodzących w skład SCOAs stanowią krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFAs, z ang. *short-chain fatty acids*). Substancje te zawierają w swojej budowie od jednego do sześciu atomów węgla w cząsteczce oraz jedną grupę karboksylową. Ich rozpuszczalność w wodzie maleje wraz z długością hydrofobowego łańcucha węglowego. Kwas metanowy (mrówkowy), etanowy (octowy), propanowy (propionowy), butanowy (masłowy) i pentanowy (walerianowy) są dobrze rozpuszczalne w wodzie, a także w większości rozpuszczalników polarnych [18]. SCFAs wytwarzane są przede wszystkim w kątnicy i okrężnicy jelita grubego ssaków, w wyniku zachodzącego w warunkach beztlenowych

procesu fermentacji, przebiegającego z udziałem organizmów bakteryjnych (głównie *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Ruminococcus* spp., *Blautia hydrogenotrophica*, czy też *Clostridium* spp.). Substratami do produkcji alifatycznych SCFAs są głównie węglowodany złożone (błonnik), dostarczane wraz z dietą, które nie uległy strawieniu pod wpływem enzymów trawiennych we wcześniejszych odcinkach przewodu pokarmowego (Ryc. 2) [19]. Istotnym jest, że polisacharydy obecne w różnych rodzajach pożywienia, mają odmienne właściwości fizykochemiczne. Z tego powodu urozmaicona dieta będzie wspierać rozwój zróżnicowanego składu mikrobioty [20]. Z kolei rozgałęzione SCFAs (kwas izobutanowy (kwas izomasłowy) i izopentanowy (izowalerianowy)) powstają m.in. w wyniku fermentacji aminokwasów i białek, jednak w mniejszej ilości niż kwasy o prostych, nierozgałęzionych łańcuchach [21]. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe mogą również być wytwarzane na drodze syntrofii, czyli procesu, który ma miejsce, kiedy produkt przemian biochemicznych jednej grupy bakterii staje się substratem do wytwarzania innego produktu kolejnej grupy bakterii (np. octan, stanowiący produkt fermentacji bakterii z rodzaju *Bacteroidetes*, może zostać zużyty przez bakterie z rodzaju *Firmicutes* do syntezy maślanu i propionianu) [22]. Spośród SCFAs, w najwyższym stężeniu w przewodzie pokarmowym człowieka występują: kwas octowy, propionowy i masłowy, a ich łączna ilość stanowi ponad 95% wszystkich krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w organizmie. Zdecydowana większość SCFAs (nawet do 95%) jest szybko absorbowana przez kolonocyty, a pozostała część jest wydalana wraz z kałem (Ryc. 2) [23]. SCFAs dobrze rozpuszczają się w osoczu i dzięki temu mogą być transportowane do różnych tkanek.



Ryc. 2. Schemat poglądowy przedstawiający losy pożywienia w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego, w kontekście powstawania SCFAs [23].

Na profil oraz stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych ma wpływ wiele czynników, wśród najważniejszych można wyróżnić: stosowaną dietę, profil i stężenie bakterii

stanowiących konsorcjum jelit, odcinek jelita - miejsce fermentacji składników pokarmu oraz stan zdrowia gospodarza. Kwasy te stanowią źródło energetyczne dla kolonocytów (kwas masłowy zapewnia około 70-80% ich zapotrzebowania energetycznego). Uzyskana energia z utleniania SCFAs wykorzystywana jest również przez komórki gospodarza do przemian metabolicznych węglowodanów i kwasów tłuszczowych [24]. Warto podkreślić także ich wpływ na motorykę przewodu pokarmowego [25] oraz na produkcję mucyny przez komórki nabłonka jelitowego [26].

Prozdrowotne znaczenie SCFAs w jelitach jest wielokierunkowe. Wśród najlepiej udokumentowanych aktywności biologicznych znajduje się:

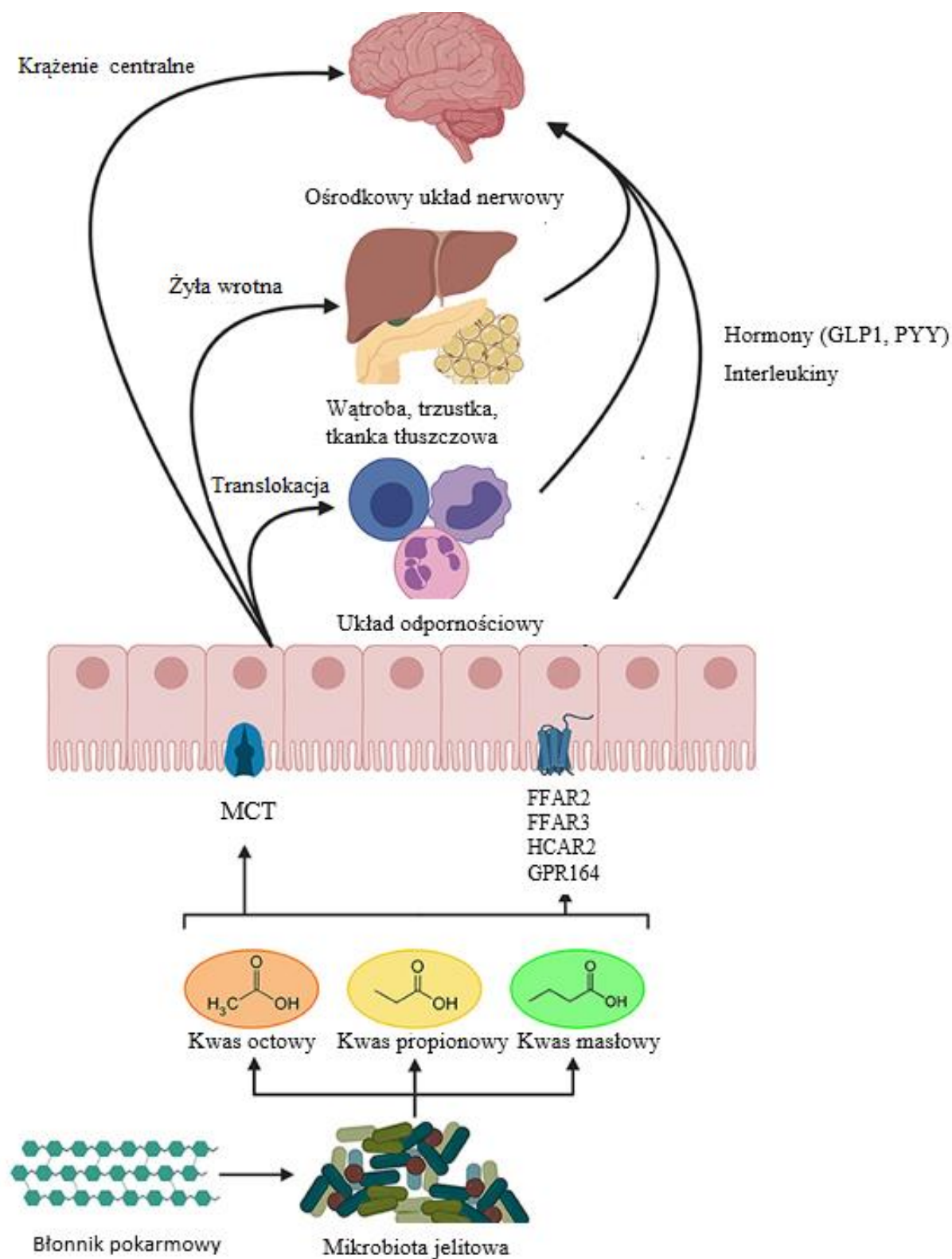
- działanie przeciwdrobnoustrojowe, m.in. poprzez obniżenie zarówno pH światła jelita, jak i pH organizmów bakterii chorobotwórczych czy stymulowanie wzrostu saprofitycznej flory bakteryjnej,
- działanie przeciwzapalne, m.in. poprzez modulowanie produkcji mediatorów stanu zapalnego przez makrofagi [27],
- udział w utrzymaniu i wzmocnieniu integralności bariery nabłonkowej poprzez skoordynowaną regulację białek ścisłych połączeń. Zwiększona przepuszczalność (zespół nieszczelnego jelita) może prowadzić do translokacji bakterii i/lub składników ich ściany komórkowej, co indukuje kaskadę zapalną, odpowiadającą za przewlekły proces zapalny, który jest obserwowany m.in. przy otyłości oraz insulinooporności [28],
- zwiększenie miejscowego przepływu krwi w obrębie błony śluzowej, co wspomaga proces gojenia i regeneracji komórek nabłonka jelitowego [29],
- działanie chemoprewencyjne, poprzez pobudzanie procesów namnażania się prawidłowych komórek nabłonka jelitowego i jednocześnie hamowanie tych, które zmienione zostały na skutek procesów nowotworowych oraz indukcję procesów apoptycznych. Ta podwójna rola została nazwana „paradoksem maślanu” [30].

SCFAs są wchłaniane przez kolonocyty głównie za pośrednictwem transporterów monokarboksylowych (MCTs, z ang. *monocarboxylate transporter*). Te które nie uległy metabolizmowi w kolonocytach są transportowane krążeniem wrotnym do wątroby i wykorzystywane jako substrat energetyczny dla hepatocytów (wyjątek stanowi kwas octowy). Stąd też tylko niewielka część pochodzącego z okrzężnicy kwasu octowego, propanowego i butanowego dociera do krążenia centralnego i innych tkanek. SCFAs wiążą się z receptorami sprzężonymi z białkami G (GPCR, z ang. *G protein-coupled receptor*), z których najlepiej

przebadanymi są receptory wolnych kwasów tłuszczowych FFAR2 (ang. *Free fatty acid receptor 2*) i FFAR3 (FFAR3, z ang. *Free fatty acid receptor 3*), a także GPR109a/HCAR2 (z ang. *G protein-coupled receptor 109A/hydroxycarboxylic acid 2 receptor*) i GPR164 (z ang. *G protein-coupled receptor 164*), które ulegają ekspresji w znacznej liczbie komórek, od błony śluzowej przewodu pokarmowego po układ immunologiczny i nerwowy (Ryc. 3) [31].

Konsekwencją wiązania SCFAs z receptorami są:

- w jelicie: stymulacja wydzielania hormonów takich jak glukagonopodobny peptyd 1 (GLP-1, z ang. *glucagon-like peptide-1*) i peptyd YY i (PYY, z ang. *peptide YY*), które po przedostaniu się do mózgu regulują spożycie pokarmu,
- w trzustce: stymulacja komórek β trzustki prowadząca do zwiększonego wydzielania insuliny,
- w tkance tłuszczowej: zwiększenie adipogenezy i hamowanie lipolizy oraz stanu zapalnego,
- w wątrobie: zmniejszenie produkcji glukozy i magazynowania lipidów, prawdopodobnie poprzez aktywację kinazy AMP (AMPK z ang. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*),
- w układzie nerwowym: dzięki zdolności SCFAs do przechodzenia przez barierę krew-mózg (BBB) za pośrednictwem transporterów monokarboksyłanowych zlokalizowanych na komórkach śródbłonna, wpływ na integralność BBB poprzez regulację ekspresji białek ścisłego połączenia. W ośrodkowym układzie nerwowym SCFAs również wpływają na neurozapalenie poprzez wpływ na morfologię i funkcję komórek glejowych, jak również poprzez modulację poziomów czynników neurotroficznych, zwiększanie neurogenezy, wspomaganie syntezy serotoniny oraz poprawę homeostazy i funkcji neuronów [31, 32].



Ryc. 3. Schemat poglądowy przedstawiający wybrane funkcje SCFAs; MCT – transporter monokarboksylowy; FFAR2 i FFAR3, GPR109a/HCAR2 i GPR164 – receptory sprzężone z białkiem G; GLP1, PYY – hormony jelitowe [31].

W dostępnym piśmiennictwie jest wiele prac poświęconych badaniom zależności między stężeniami poszczególnych SCFAs w próbkach kału a stanem chorobowym pacjenta. W głównej mierze analizy te dotyczą chorób zapalnych jelit (IBD, z ang. *inflammatory bowel disease*) a w szczególności choroby Leśniowskiego - Crohna (CD, z ang. *Crohn's disease*) oraz wrzodziejącego zapalenia jelit (UC, z ang. *ulcerative colitis*), które charakteryzują się przewlekłym i nawracającym stanem zapalnym przewodu pokarmowego [33, 34]. U pacjentów z IBD obserwowane są zmiany ilościowe i jakościowe konsorcjum bakteryjnego jelit, a w konsekwencji zmiany stężeń produktów ich aktywności, m.in. SCFAs. Dodatkowo, w przebiegu IBD pacjenci często stosują różne diety, w tym niskobłonnikową oraz eliminacyjną, np. bezmleczną, bezglutenową, lekkostrawną, w celu złagodzenia objawów lub w obawie przed ich nawrotem [35]. Może to prowadzić do zaburzeń w produkcji krótkołańcuchowych kwasów organicznych, pochodzących z fermentacji bakteryjnej błonnika i paradoksalnie nasilać stan zapalny w jelitach oraz zaostrzać objawy chorobowe.

Z kolei wyniki metaanalizy wykonanej przez zespół Alvandi i wsp. [36], wskazują, że obniżone stężenie kwasów octowego, propionowego i masłowego w kale pacjentów wiąże się z wyższym ryzykiem rozwoju raka jelita grubego. Granado-Serrano i wsp. [37] objęli badaniem pacjentów z hipercholesterolemią. W toku analiz stwierdzono, że kał tych osób charakteryzował się wyższym stężeniem kwasu izomasłowego i izowalerianowego, w stosunku do pobranego od pacjentów z prawidłową gospodarką lipidową. Badania przeprowadzone przez Nakahori i wsp. [38], wśród pacjentów w stanie krytycznym, dostarczyły dowodów na istnienie powiązania pomiędzy stwierdzonymi anomaliami stężeń SCFAs (kwasu propionowego i octowego) w kale a wzrostem śmiertelności.

O ile kał ludzki jest materiałem biologicznym szeroko badanym, również w kontekście wyznaczania profilu i stężeń kwasów organicznych, to w przypadku smółki niewiele badań poświęcono dotychczas oznaczaniu tych analitów [39 - 41]. Smółka jest pierwszym stolcem noworodka, zwykle oddawanym w pierwszej dobie po urodzeniu [42]. Zaczyna się tworzyć w przewodzie pokarmowym płodu między 12 a 16 tygodniem ciąży i gromadzi się aż do urodzenia. Do tej pory była głównie wykorzystywana w badaniach toksykologicznych i z powodzeniem wykorzystywana do monitorowania ekspozycji płodu na alkohol, narkotyki i ich metabolity (np. kokaina, opiaty, kannabinoidy) [43-45], zanieczyszczenia organiczne [46], pestycydy [47], zanieczyszczenia nieorganiczne (np. metale ciężkie) [48] oraz antybiotyki [49]. Kolonizacja układu pokarmowego dziecka rozpoczyna się już w jego życiu płodowym, gdzie obserwowany jest transfer matczynej mikrobioty do płodu. Głównymi czynnikami, które kształtują w tym okresie profil bakteryjny przewodu pokarmowego dziecka, są mikrobiota

przewodu pokarmowego matki (zależna m.in. od jej diety, przyjmowanych leków, schorzeń czy środowiska, w którym przebywa), infekcje dróg rodnych, a także obecność stanu zapalnego przyzębia. Kolejnym istotnym czynnikiem jest sposób porodu [50]. Zatem, obserwowany profil bakteryjny smółki noworodków jest m.in. ściśle związany ze zdrowotną kondycją organizmu matki, jej nawykami żywieniowymi/stosowanymi lekami i środowiskiem w którym żyje.

Jak już wspomniano, w literaturze można odnaleźć niewiele badań dotyczących oznaczania SCFAs w smółce noworodków, a uzyskane przez badaczy wyniki analiz nie są spójne [51-53]. Biorąc pod uwagę, że zmiany w konsorcjum bakteryjnym, które mogą być przyczyną lub konsekwencją zaburzeń zdrowotnych, wpływają na produkcję istotnych metabolitów, takich jak krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, próbuje się powiązać stężenie tych związków w smółce noworodków i kale niemowląt z ryzykiem wystąpienia różnych chorób. W dostępnym piśmiennictwie kilka badań wskazywało na związek między rozwojem mikrobioty jelitowej we wczesnym okresie życia a ryzykiem rozwoju astmy i chorób alergicznych w późniejszych jego etapach [54]. Wczesne stwierdzenie anomalii w zakresie konsorcjum bakteryjnego jelit mogłoby prowadzić do zastosowania interwencji żywieniowej albo farmakologicznej, które mogłyby pomóc w normalizacji/przywróceniu prawidłowej flory bakteryjnej, a co za tym idzie istotnych produktów jej aktywności w organizmach dzieci, unikając dalszych jej zaburzeń jako przyczyny lub skutku choroby. Interwencja taka mogłaby mieć również charakter profilaktyczny, zwłaszcza u dzieci z grupy wysokiego ryzyka wystąpienia chorób immunologicznych.

Badania koncentrujące się na oznaczaniu SCFAs w smółce oraz kale są niezwykle ważne, z uwagi na ich znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu jelit, jak również istotne działanie ogólnoustrojowe. Kolejne badania odsłaniają wciąż nowe kierunki potencjalnej roli tych związków w organizmach ludzkich i zwierzęcych. Ma to duże znaczenie zarówno dla badań podstawowych, z zakresu fizjologii człowieka, jak i z dziedziny nauk farmaceutycznych, w tym w obszarze bromatologii. Ponadto, profil i stężenie SCFAs w kale, materiale pobieranym nieinwazyjnie, mogą w przyszłości stanowić marker chorób o różnej etiologii, oraz wskazywać na stopień zaawansowania niektórych schorzeń. Z kolei, monitorowanie SCFAs może wspomagać śledzenie skutków interwencji żywieniowej.

Ślina

Oprócz jelit, w organizmie ludzkim miejscem powstawania krótkołańcuchowych kwasów organicznych jest również jama ustna. Bakterie namnażające się na płytce nazębnej (*Mutans streptococci* i *Lactobacilli species*) mają zdolność do przeprowadzania fermentacji

węglowodanów z diety, zwłaszcza sacharozy [55]. Powstające w ten sposób krótkołańcuchowe kwasy organiczne, takie jak: kwas mlekowy, octowy, mrówkowy i propionowy, przyczyniają się do spadku pH, co z kolei sprzyja demineralizacji szkliwa [56]. Fidalgo i wsp. [57] w toku badań zaobserwowali, że ślina dzieci ze zmianami próchnicznymi charakteryzowała się wyższymi stężeniami kwasu mlekowego, masłowego oraz octowego, w porównaniu z wyznaczonymi w materiale pozyskanym od grupy kontrolnej. Wyniki podobnych analiz innych autorów nie potwierdzają jednak tej prawidłowości, co wskazuje na potrzebę dalszych badań w tym zakresie [58]. Należy nadmienić, że obecność krótkołańcuchowych kwasów organicznych w ślinie (szczególnie SCFAs) może być wynikiem przenikania ich do jamy ustnej wraz ze śliną, do której z kolei składniki te transportowane są wraz z krwią z jelit. Ich źródłem może być też pożywienie.

Ślina jest coraz częściej wykorzystywana i walidowana jako „biofluid” do diagnozowania, monitorowania stanu chorób ogólnoustrojowych oraz przewidywania progresji choroby [59]. Pobieranie śliny jest procesem nieinwazyjnym, niedrogim i bezpiecznym. Nie powoduje takiego stresu u pacjentów, a szczególnie u dzieci, jak np. pobieranie krwi. Ponadto, sama procedura jest na tyle prosta, że pacjent może ją samodzielnie wykonać w warunkach domowych, a następnie przetransportować materiał do laboratorium.

Prowadzone analizy wskazują również na możliwość wykorzystania SCFAs jako swoistych biomarkerów niektórych schorzeń. I tak, Szczeklik i wsp. [60], prowadząc doświadczenia z udziałem ochotników, u których zdiagnozowano chorobę refluksową przełyku (GERD), zaobserwowali, że średnie stężenie kwasu octowego, propionowego, masłowego i izomasłowego w ślinie tych osób było istotnie wyższe, niż wyznaczone w grupie kontrolnej. Z kolei zespół Bel'skaya i wsp. [61], analizując ślinę pobraną od pacjentek z nowotworem piersi, zauważył m.in., że charakteryzuje się ona wyższym stężeniem kwasu mlekowego, octowego oraz propionowego, w porównaniu z materiałem pobranym od zdrowych ochotniczek.

Badania wykazały, że ślina zawiera różne białka, kwasy tłuszczowe i różne mikroorganizmy oraz inne biomarkery, które, podobnie jak krew, mogą odzwierciedlać zmiany w organizmie człowieka [62]. Należy podkreślić, że stosunkowo mało prac poświęconych jest oznaczaniu SCFAs w ślinie. Coraz częściej jednak wskazuje się te związki jako potencjalne biomarkery, świadczące o procesach fizjologicznych/patologicznych, zachodzących w organizmie. Stąd konieczność dalszych badań w tym zakresie.

Uzasadnienie kierunku rozwijania metod analitycznych

Analiza chemiczna próbki stanowi złożony, wieloetapowy proces, na który składa się: pobranie materiału i transport do jednostki badawczej, przygotowanie próbki do analizy, pomiar sygnału analitycznego oraz opracowanie wyników badań. Szacuje się, że najbardziej czasochłonnym etapem w całej procedurze analitycznej jest pobieranie i przygotowanie próbki do analizy (średnio ok. 67% całkowitego czasu). Jednocześnie etap ten jest źródłem ok. 60% błędów sumarycznie popełnianych w toku analizy. Zatem etap pobierania próbki i dalszego jej przetwarzania jest krytyczny, i w największej mierze wpływa na niepewność otrzymanych wyników analiz [63]. W przypadku pobierania próbki kluczowym jest, aby spełnione było kryterium reprezentatywności, co oznacza, że wyselekcjonowana porcja materiału powinna posiadać właściwości charakterystyczne dla całości. W toku postępowania analitycznego należy ograniczyć do minimum ryzyko kontaminacji próbki, jej degradacji oraz utraty analitów [64]. W przypadku próbek biologicznych, które zazwyczaj cechują się skomplikowaną matrycą, przygotowanie materiału do pomiaru jest wieloetapowe. Jednym z etapów, zazwyczaj koniecznym do przeprowadzenia w toku przygotowania stałych próbek biologicznych do analiz, jest ekstrakcja analitów - wyodrębnienie oznaczanych substancji z matrycy złożonej do medium o prostszym składzie (eliminacja potencjalnych interferentów). Optymalizacja tego procesu wymaga doboru odpowiedniego rozpuszczalnika, techniki ekstrakcji oraz warunków jej prowadzenia [65]. Przy czym istotne jest, aby proces ten przebiegał stosunkowo szybko, izolacja pożądaných substancji była efektywna a ilość zużytego rozpuszczalnika była możliwie mała.

W ostatnich latach obserwujemy postęp w rozwoju i zastosowaniu nowych technik szybkiej i wydajnej ekstrakcji związków organicznych z różnych materiałów biologicznych. Do nowoczesnych metod, wykorzystywanych do ekstrakcji związków organicznych z biologicznych, złożonych matryc, można między innymi zaliczyć ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (UAE, ang. *ultrasound-assisted extraction*) oraz ekstrakcję wspomaganą mikrofalami (MAE, ang. *ultrasound-assisted extraction*).

Ekstrakcja wspomaganą mikrofalami (MAE) jest jedną z najważniejszych technik stosowanych do izolacji różnych związków z roślin lub materiałów roślinnych zarówno do celów analitycznych, jak i przemysłowych [66-68]. MAE opiera się na interakcji pomiędzy mikrofalami generowanymi przez magnetron lub inne źródło promieniowania a układem próbka - rozpuszczalnik ekstrakcyjny. Technika ta zapewnia wysoką wydajność ekstrakcji, zużycie niewielkich ilości odczynników oraz krótki czas jej trwania. Ponadto, może być stosowana do ekstrakcji składników roślinnych rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych

w wodzie. Jednakże proces ekstrakcji mikrofalowej wymaga optymalizacji kilku czynników, takich jak moc promieniowania mikrofalowego, czas ekspozycji, zawartość wilgoci i stopień rozdrobnienia próbki, rodzaj i skład rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, stosunek ilości próbki do rozpuszczalnika, temperatura i ciśnienie ekstrakcji [69].

Do ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z kolei wykorzystywane są fale ultradźwiękowe o częstotliwościach powyżej 16 kHz. Działanie fal powoduje powstawanie w układzie periodycznego ciśnienia akustycznego, które uruchamia różne mechanizmy, ostatecznie przyspieszając proces ekstrakcji. Między innymi obserwowane jest zjawisko kawitacji, które polega na powstawaniu i nagłym pękaniu w cieczy pęcherzyków gazu, co generuje wysokie ciśnienie oraz temperaturę, tym samym wspomagając penetrację rozpuszczalnika. Ponadto, obserwowane jest tarcie na powierzchniach międzyfazowych i granicznych. Tym zjawiskom towarzyszy również wydzielanie ciepła, które dodatkowo sprzyja migracji związków z próbki do rozpuszczalnika [70]. Opisana technika posiada liczne zalety, czas trwania procesu jest stosunkowo krótki, wymagana jest niewielka ilość odczynników, a koszt samej aparatury jest niewielki w porównaniu na przykład z piecem mikrofalowym. Dlatego stała się również szeroko stosowana w procesie ekstrakcji analitów z próbek biologicznych [71].

W dostępnym piśmiennictwie, jak już wspomniano, wykorzystywane są na szeroką skalę opisane techniki ekstrakcji związków organicznych z matryc biologicznych. Jednak niewiele jest prac poświęconych optymalizacji warunków ekstrakcji, w celu zapewnienia możliwie wysokiej wydajności procesu. A jest to szczególnie istotne, na przykład przy charakterystyce produktów spożywczych (pochodzenia roślinnego czy zwierzęcego), jeżeli konieczne jest wyznaczenie dokładnej, wiarygodnej zawartości składnika odżywczego, antyodżywczego, czy też innych składników bioaktywnych istotnych dla zdrowia człowieka. Podobnie w sytuacji, gdy dany składnik wykorzystywany jest jako marker, biologiczny wskaźnik, którego często nie tylko obecność, ale i stężenie stanowi informację dotyczącą przebiegających procesów (fizjologicznych lub patologicznych) i ich zaawansowania, co może przełożyć się na formułowanie istotnych dla pacjenta rokowań oraz kierować na właściwe tory postępowanie terapeutyczne.

Problem optymalizacji procesu ekstrakcji SCOAs został poruszony w dwóch pracach z cyklu habilitacyjnego, na przykładzie dwóch różnych matryc biologicznych. W pracy **H1** przedstawiono po raz pierwszy proces optymalizacji parametrów ekstrakcji krótkołańcuchowych kwasów organicznych z materiału roślinnego – na przykładzie kiełków rzodkiewki, z wykorzystaniem dwóch niezależnych technik: MAE oraz UAE. Zgodnie z

wiedzą autorki, były to pierwsze badania w literaturze światowej, w których wykorzystano ekstrakcję wspomaganą mikrofalami do izolacji SCOAs z próbek roślinnych. Wybór tego rodzaju próbek był podyktowany niewielką ilością doniesień, opublikowanych jak dotąd w literaturze światowej, dotyczących badań profilu i stężeń krótkołańcuchowych kwasów organicznych w kielkach różnych gatunków roślin. Ponadto, wstępne badania ujawniły, że kielki są bogatym źródłem tych analitów, odznacza je duże zróżnicowanie tych związków, co sprawia, że opracowaną metodę cechuje większa uniwersalność, a wraz z tym możliwość jej adaptacji do przygotowania także innego materiału pochodzenia roślinnych.

Z kolei w pracy **H2** przedstawiono badania, których celem był dobór optymalnych warunków ekstrakcji SCFAs z kału ludzkiego. Jak nadmieniono, w dostępnym piśmiennictwie można znaleźć wiele prac dotyczących oznaczania tej grupy analitów w ekstraktach kału zwierzęcego i ludzkiego, jednak, oprócz przedstawionej w publikacjach metodyki przygotowania próbki do analizy, brak jest w nich informacji o optymalizacji tego procesu. Opracowana procedura została wykorzystana m.in. w badaniach **H3** i **H4**.

Wiele metod instrumentalnych zostało opracowanych do oznaczania SCOAs w materiale biologicznym. W głównej mierze wykorzystywana jest do tego celu chromatografia gazowa (GC, ang. *gas chromatography*), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC, ang. *high-performance liquid chromatography*), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*) i elektroforeza kapilarna (CE, ang. *capillary electrophoresis*). W ostatnich latach, w tej grupie metod znalazła się również chromatografia cieczowa (LC, ang. *liquid chromatography*) sprzężona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), coraz częściej stosowana do ilościowego oznaczania SCFAs [72]. Każda z wymienionych technik badawczych może być z powodzeniem wykorzystana do oznaczania SCOAs w próbkach biologicznych, i uzyskania wyników pomiarowych o wysokiej rzetelności. Zatem, wybór metody w głównej mierze zostaje podyktowany dostępnością aparatury pomiarowej, czasem i złożonością całej procedury analitycznej (w tym przygotowania próbki do analizy) oraz jej kosztami. W ramach cyklu prac zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego, do oznaczeń ilościowych wykorzystano zoptymalizowaną i zwalidowaną metodę HPLC-DAD (z ang. *high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection*), często stosowaną w oznaczaniu SCOAs w próbkach biologicznych (**H3**, **H4**), oraz przedstawiono po raz pierwszy możliwość zastosowania izotachoforezy kapilarnej jako wiarygodnej, alternatywnej metody oznaczania SCOAs w takich matrycach jak miody pitne (**H5**) czy ślina (**H6**).

W pierwszej pracy cyklu postępowania habilitacyjnego (**H1**) został opisany proces opracowania metody izolacji krótkołańcuchowych kwasów organicznych z materiału

roślinnego na przykładzie kiełków rzodkiewki. Należy wspomnieć, że z chwilą podjęcia analiz, w dostępnym piśmiennictwie niewiele było prac poświęconych badaniu profilu i stężenia SCOAs w kiełkach różnych gatunków roślin. Ponadto, zgodnie z wiedzą autorki, dostępne piśmiennictwo praktycznie nie daje jasnej odpowiedzi na problem optymalizacji parametrów ekstrakcji kwasów organicznych z kiełków.

H1. Chłopicka, J., **Dobrowolska-Iwanek, J.**, Woźniakiewicz, M., Zagrodzki, P. Optimization of conditions for organic acid extraction from edible plant material as applied to radish sprouts. **Food Analytical Methods**, 2014, 7, 1323-1327. **IF = 1.956, MEiN = 25**

W niniejszej pracy skupiono się na wykorzystaniu dwóch nowoczesnych, szeroko stosowanych technik wmywania - ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami oraz ekstrakcji wspomaganej mikrofalami. Ponadto, wśród optymalizowanych parametrów znalazły się: czas trwania procesu, temperatura, jak również rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika (wybrano czynniki, które w głównej mierze determinują wydajność procesu ekstrakcji). W przypadku zastosowania techniki MAE, proces prowadzony był w piecu mikrofalowym MARS X (CEM, Matthews, USA) w zamkniętych naczyniach z kopolimeru PFA. Testowanymi temperaturami procesu były: 50°C, 70°C oraz 90°C. Wybór takiego zakresu temperatur wynikał z faktu, że w układzie badawczym nie było możliwe uzyskanie stabilnej temperatury poniżej 50°C, natomiast temperatura wyższa niż 90°C mogła powodować straty analitów wynikające z rozpadu związków. Z racji tego, że technika MAE może być wysoce wydajna, nawet przy krótkim czasie trwania procesu [73, 74], minimalnym testowanym czasem trwania ekstrakcji były 2 minuty, a kolejne zastosowane interwały to 10 oraz 18 minut. W przypadku ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami wykorzystano homogenizator ultradźwiękowy VC 505 (Sonics & Materials, USA). Z uwagi na zastosowane urządzenie, które generuje znaczną ilość ciepła w układzie, zdecydowano się m.in. na chłodzenie próbki podczas trwania procesu. W tym celu użyto: (i) łaźni lodowej, aby utrzymać temperaturę próbki w toku trwania procesu ekstrakcji na poziomie 15°C; (ii) kąpieli wodnej by uzyskać średnią temperaturę układu wynoszącą 25°C; (iii) niezmiennych warunków otoczenia, co z kolei wiązało się ze znacznym podniesieniem temperatury roztworu, do 40°C. Wpływ czasu oddziaływania ultradźwięków na wydajność ekstrakcji badano na trzech poziomach, począwszy od 1 min. Przy dłuższym czasie ekspozycji, podczas wstępnych eksperymentów, zaobserwowano zmiany w stężeniu analitów, które mogły być spowodowane zarówno ich przemianami/rozkładem jak i odparowaniem wody. Czas

ekstrakcji dłuższy niż 15 min mógł spowodować obniżenie ilości lotnych analitów, ponieważ ekstrakcję UAE prowadzono w układzie otwartym.

Niezależnie od wykorzystywanej techniki ekstrakcji, przetestowano trzy rozpuszczalniki: (i) 0,01 M roztwór wodorotlenku sodu - sole sodu są rozpuszczalne w wodzie, dysocjują, co jest istotne w następnym etapie procedury analitycznej - rozdzielaniu izotachforetycznym; (ii) wodę - najczęściej stosowany rozpuszczalnik; (iii) 50 mM bufor fosforanowy o pH równym 7,4, po to aby przeprowadzić ekstrakcję w środowisku bliskim neutralnemu pH, ale przy podwyższonej sile jonowej.

Doświadczenia zostały zaplanowane z wykorzystaniem frakcyjnego planu doświadczeń typu 3^{3-1} , na podstawie którego dokonano wyboru optymalnych kombinacji testowanych parametrów, równocześnie ograniczając liczbę przeprowadzonych eksperymentów.

Ekstrakty próbek kiełków przeanalizowano z wykorzystaniem metody izotachforezy kapilarnej z detekcją konduktometryczną (EA 202 M, Villa Labeco, Spisska Nova Ves, Słowacja). Zastosowano następujący układ elektrolitów: (i) bufor wiodący o składzie: 10 mM kwas solny, 0,2% hydroksyetylometyloceluloza (M-HEC), uzupełniony β -alaniną tak, aby końcowe pH roztworu wynosiło 3,5; (ii) bufor kończący, który zawierał kwas kapronowy w stężeniu 5 mM i L-histydynę, również w stężeniu 5 mM.

W próbkach oznaczono następujące kwasy organiczne: kwas winowy, kwas cytrynowy, kwas jabłkowy, kwas mlekowy, kwas bursztynowy, kwas octowy i kwas szczawiowy. Strefy uzyskane w analizie ITP zidentyfikowano poprzez porównanie z wysokościami stopni wzorców odpowiednich kwasów, a dodatkowo próbki były wzbogacone analitami (wzorcami wewnętrznymi), w celu zapewnienia poprawności identyfikacji.

Na podstawie otrzymanych wyników analiz zaobserwowano, że technika MAE była bardziej efektywna niż UAE, a za optymalne parametry zostały uznane: 0,01 M NaOH użyty jako rozpuszczalnik, 18 minutowy czas trwania procesu i temperaturę 90°C w jakiej powinna przebiegać ekstrakcja. W takich warunkach, oznaczane kwasy organiczne wymywały się z materiału roślinnego z największą wydajnością.

Aspekt nowości:

- optymalizacja warunków ekstrakcji krótkołańcuchowych kwasów organicznych z próbek roślinnych. Wykorzystanie po raz pierwszy do tego celu ekstrakcji wspomaganej mikrofalami.

Praktyczne możliwości wykorzystania opracowanej metody:

- z uwagi na uniwersalność metody, może ona zostać łatwo zaadoptowana do ekstrakcji krótkołańcuchowych kwasów organicznych z innych materiałów roślinnych, których tkanki cechują się zbliżoną morfologią,
- może stać się częścią składową procedury analitycznej, której celem jest wyznaczenie stężenia krótkołańcuchowych kwasów organicznych w próbkach roślinnych.

Oprócz badań dotyczących przygotowania materiałów roślinnych do analiz skupiono się również na optymalizacji metody ekstrakcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych z kału ludzkiego. W dostępnym piśmiennictwie wiele prac jest poświęconych oznaczaniu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w ekstraktach kału. Wskazane przez innych autorów procedury ekstrakcji tych związków z matrycy biologicznej budzą jednak pewne wątpliwości co do efektywności procesu. W literaturze opisane zostały wprowadzić parametry wymywania, ale brak jest dokładnych informacji dotyczących ich optymalizacji. Dlatego w kolejnych badaniach, opisanych w pracy **H2** cyklu stanowiącego osiągnięcie habilitacyjne, skoncentrowano się na opracowaniu metody ekstrakcji kwasu octowego, masłowego oraz propionowego z próbek kału ludzkiego.

H2. Dobrowolska-Iwanek, J., Zagrodzki, P., Woźniakiewicz, M., Woźniakiewicz, A., Zwolińska-Wcisło, M., Winnicka, D., Paśko, P. Procedure optimization for extracting short-chain fatty acids from human faeces. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2016, 124, 337-340. **IF = 3.255, MEiN = 35**

Kał ludzki pozyskano od pacjenta Oddziału Klinicznego Gastroenterologii i Hepatologii Szpitala Uniwersyteckiego UJ CM, dzięki współpracy naukowej z prof. dr hab. med. Małgorzatą Zwolińską-Wcisło, kierownikiem tego Oddziału. Na badania otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej o numerze: KBET/206/B/2012. W toku badań zwrócono uwagę na niehomogeniczność próbki kału ludzkiego, dlatego ten rodzaj materiału powinien być pobierany do analiz ilościowych najlepiej w całości, z jednego wypróżnienia. Kał był suszony do stałej masy, homogenizowany a następnie porcjowany z przeznaczeniem do badań. W procesie wymywania analitów wykorzystano kombinację dwóch technik: ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami oraz wytrząsanie. Ta ostatnia, tradycyjna metoda ekstrakcji, polegała na wytrząsaniu próbki stałej z rozpuszczalnikiem w zamkniętym naczyniu. Stosując tę technikę należy zapewnić duże rozdrobnienie próbki tak, aby zwiększyć powierzchnię

kontakty faz ciało stałe – ciecz. Zaletą tej techniki jest łatwość wykonywanych operacji, jak również stosunkowo niewielki koszt aparatury. Izolacja kwasów z kału odbywała się z zastosowaniem: (i) różnych czasów ekspozycji próbki na ultradźwięki (20, 40 i 60 minut) w temperaturze 35°C, przy czym zastosowano kąpiel w łaźni ultradźwiękowej Sonic-6 (POLSONIC, Polska), a nie jak uprzednio (**H1**) homogenizator ultradźwiękowy; (ii) różnych czasów wytrząsania próbki (4, 8 i 24 minut) z użyciem wytrząsarki 358S (ELPAN, Polska); (iii) różnej krotności powtórzeń procesu wymywania analitów z tej samej próbki (1, 2 i 3 powtórzenia procesu ekstrakcji). Jako rozpuszczalnik wybrano 0,15 M kwas nadchlorowy, który najczęściej wykorzystywany jest jako efektywny środek do wymywania SCFAs z próbek kału. Rozpuszczalnik ten jest również czynnikiem odbiałczającym, co pozwala na skuteczne usunięcie potencjalnie zakłócających wielkocząsteczkowych substancji balastowych z próbki. Zwiększona temperatura na etapie ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami została zastosowana celowo, aby poprawić jej wydajność, poprzez zmniejszenie napięcia powierzchniowego i lepkości rozpuszczalnika (poprawie ulega penetracja matrycy przez rozpuszczalnik). Jednak należy mieć na uwadze, iż przegrzanie próbki czy nadmierna jej ekspozycja na działanie ultradźwięków może skutkować degradacją struktury kwasów organicznych.

Doświadczenia zostały zaplanowane z wykorzystaniem frakcyjnego planu doświadczeń 3^{3-1} , na podstawie którego dokonano wyboru optymalnych kombinacji testowanych parametrów, i tym samym ograniczono liczbę przeprowadzonych eksperymentów.

Pomiar sygnału analitycznego dla poszczególnych analitów w ekstraktach kału przeprowadzono z wykorzystaniem techniki izotachoforezy kapilarnej z detekcją konduktometryczną (EA 202 M, Villa Labeco, Spisska Nova Ves, Słowacja). Jako metodę porównawczą wykorzystano elektroforezę kapilarną z detektorem diodowym (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), dzięki współpracy z zespołem dr hab. Michała Woźniakiewicza, z Pracowni Chemii Sądowej Wydziału Chemii UJ.

Wyniki analiz wskazują, że optymalnymi parametrami spośród testowanych były: 40 minutowy czas oddziaływania ultradźwięków na układ próbka kału-rozpuszczalnik w temperaturze 35°C, wytrząsanie próbki z rozpuszczalnikiem przez 4 minuty, i trzykrotne powtórzenie procedury wymywania analitów z jednej próbki.

Aspekt nowości:

- optymalizacja warunków ekstrakcji krótkołańcuchowych kwasów organicznych z próbek kału ludzkiego.

Praktyczne możliwości wykorzystania opracowanej metody:

- opracowana metoda ekstrakcji SCFAs może służyć do badań, w których anality te są wykorzystywane jako biomarkery, wskazujące na procesy fizjologiczne zachodzące w organizmie, a także do monitorowania zmian przy zastosowaniu terapii farmakologicznej czy określonych interwencji żywieniowych,
- opisana procedura izolacji kwasów organicznych z próbek kału została wykorzystana do analizy materiału biologicznego pochodzącego od pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego Oddziału Klinicznego Gastroenterologii i Hepatologii, u których stwierdzono nieswoiste zapalenie jelit (wrzodziejące zapalenie jelita grubego i choroba Leśniowskiego-Crohna, w fazie aktywnej i nieaktywnej), czego efektem była seria publikacji **P28-P32** (załącznik 4, pkt II.4).

Opracowane powyżej procedury przygotowania próbek kału do analizy zostały wykorzystane przeze mnie do rozwoju metod separacyjnych stosowanych do oznaczania SCFAs w próbkach kału szczurzego (**H3**), a także smółki (**H4**).

H3. Dobrowolska-Iwanek, J., Zagrodzki, P., Prochownik, E., Jarkiewicz, A., Paśko, P. Influence of brassica sprouts on short chain fatty acids concentration in stools of rats with thyroid dysfunction. **Acta Poloniae Pharmaceutica.-Drug Research**, 2019, 76(6). **IF = 0,456**
MEiN = 100

Kolejne badanie, zaprezentowane w publikacji zgłoszonej w ramach postępowania habilitacyjnego, obejmowało między innymi opracowanie i walidację metody oznaczania kwasu octowego, propionowego i masłowego w ekstraktach kału szczurzego, z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD. Etap ten był niezbędny do zbadania wpływu modyfikacji diety na stężenia krótkołańcuchowych kwasów organicznych w kale szczurów z indukowaną niedoczynnością tarczycy. Niedobór hormonów tarczycy jest jednym z czynników zaburzających częstotliwość i rytmiczność ruchów perystaltycznych, co przekłada się na zwolnienie pasażu jelitowego i zaleganie mas pokarmowych w jelicie. W konsekwencji może to doprowadzić do tzw. zespołu przerostu bakteryjnego w jelicie cienkim (SIBO, z ang. *small*

intestinal bacterial overgrowth). SIBO to zespół chorobowy, który przebiega z nadmiernym rozrostem bakterii w jelicie cienkim, które normalnie bytują w jelicie grubym. Wynikiem tej dolegliwości mogą być zaburzenia trawienia i wchłaniania składników pokarmowych, ale SIBO może także wtórnie prowadzić do powstania biegunki [75]. Obserwowane zjawiska mogą zatem wpłynąć istotnie na proces produkcji SCFAs w jelitach.

Aby rozdzielić anality oraz odseparować je od składników próbki zakłócających rejestrowane sygnały pomiarowe, zdecydowano się na zastosowanie elucji gradientowej. Faza ruchoma składała się z acetonitrylu (ACN) oraz buforu fosforanowego o $\text{pH} \approx 2,6$, zgodnie z następującym programem (% udział ACN w eluencie): 0 min 20% ACN, 6 min 30% ACN, 12 min 30% ACN, 16 min 40% ACN, 25 min 10% ACN i 35 min 10% ACN. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 mL/min a temperatura kolumny 35°C.

Zastosowane warunki rozdzielania pozwoliły na skuteczną separację oznaczanych kwasów organicznych. W toku walidacji metody ustalono, że opracowana metoda analityczna cechuje się liniowością wskazań w zadanym zakresie stężeń oznaczanych analitów ($R^2 > 0,999$), wysoką precyzją ($\text{CV} < 2,1\%$), a wyznaczony odzysk mieścił się w przedziale: 99,9%-106,1%. Na podstawie uzyskanych wartości parametrów analitycznych uznano, że metoda oznaczania kwasów organicznych w ekstraktach kału szczurzego spełnia stawiane jej wymagania i może zostać zastosowana do analizy próbek rzeczywistych.

W następnym kroku przeprowadzono eksperyment z udziałem 108 pięcioletnich samców szczurów rasy Wistar, które podzielono na 9 grup ($n=12$). U części osobników wywołano niedoczynność tarczycy, stosując dietę z deficytem jodu lub przez podanie sulfadimetoksyny wraz z wodą do picia. Zwierzęta były karmione paszą standardową lub fortifikowaną liofilizatami kiełków kalarepy lub brokułów. Eksperyment trwał 8 tygodni. Po tym czasie próbki kału zwierząt zebrano do dalszych analiz. W toku analiz zaobserwowano między innymi że: (i) w próbkach kału szczurów, u których wywołano niedoczynność tarczycy poprzez wprowadzenie diety z sulfadimetoksyną (S1), odnotowano istotnie niższe stężenia kwasu octowego w odniesieniu do wyniku uzyskanego dla grupy kontrolnej – dieta standardowa (C) ($p < 0,05$). Jednak gdy dieta szczurów z takim samym schorzeniem była wzbogacona liofilizatami kiełków brokułów (SB), średnie stężenie kwasu octowego było istotnie wyższe niż wyznaczone w grupie otrzymującej dietę z sulfadimetoksyną (S1) ($p < 0,05$); (ii) w materiale biologicznym szczurów, u których wywołano niedoczynność tarczycy w wyniku niedoboru jodu (J1) zaobserwowano istotnie niższe średnie stężenia kwasu propionowego w odniesieniu do wyznaczonych w analizowanych próbkach grupy kontrolnej (C) ($p < 0,05$);

(iii) choć średnie stężenie kwasu masłowego w kale zwierząt S1 nie różniło się istotnie od wyznaczonego w grupie kontrolnej, to gdy zwierzęta otrzymywały dietę z sulfadimetoksyną, dodatkowo wzbogaconą kielkami brokułów, średnie stężenie tego analitu okazało się istotnie wyższe niż wyznaczone w grupie S1; (iv) W badanym materiale odnotowano silną korelację pomiędzy średnimi wartościami stężeń kwasu octowego i kwasu butanowego, współczynnik korelacji dla tych zmiennych wyniósł $r=0,809$ ($p<0,05$). Konieczne są jednak dalsze badania w celu oceny znaczenia związku między zaburzeniami czynności tarczycy a funkcjonowaniem przewodu pokarmowego i dietą.

Parametry uzyskane w trakcie procesu walidacji świadczą o tym, że opracowana metoda z wykorzystaniem techniki HPLC z detektorem DAD jest rzetelna, a uzyskane wyniki są wiarygodne. Zatem może być wykorzystana do rutynowego oznaczania kwasu octowego, propionowego i masłowego w kale szczurów.

Aspekt nowości:

- optymalizacja warunków rozdzielania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych z ekstraktów kału zwierzęcego z wykorzystaniem metody HPLC-DAD. Walidacja opracowanej metody oznaczania SCFAs,
- wstępne zbadanie powiązania pomiędzy uszkodzeniem tarczycy w organizmach szczurów a stężeniem kwasu octowego, propionowego oraz masłowego w ich kale.

Praktyczne możliwości wykorzystania opracowanej metody:

- metoda ta może znaleźć zastosowanie w szerokiej gamie badań, nie tylko wpływu diety na stężenie wybranych SCFAs w kale zwierząt doświadczalnych zdrowych oraz takich, u których wywołano różne zaburzenia, ale może również służyć monitorowaniu rozwoju chorób, których markerami mogą być SCFAs w kale.

H4. Dobrowolska-Iwanek, J., Lauterbach, R., Huras, H., Paśko, P., Prochownik, E., Woźniakiewicz, M., Chrzęszcz S., Zagrodzki, P. HPLC-DAD method for the quantitative determination of short-chain fatty acids in meconium samples. **Microchemical Journal**, 2020, 155, 104671. **IF = 4,821, MEiN = 70**

Badania przedstawione w niniejszym artykule obejmowały opracowanie i zwalidowanie metody analitycznej, z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową, do oznaczania pięciu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (kwasu

octowego, propionowego, masłowego, *n*-walerianowego i izowalerianowego) w ekstraktach smółek. Ponadto, opisaną procedurę zastosowano do oceny stężeń kwasów organicznych w próbkach pierwszego kału noworodków pobranych od 17 pacjentów. Materiał biologiczny pozyskano od noworodków Oddziału Położnictwa i Perinatologii Szpitala Uniwersyteckiego UJ w Krakowie, dzięki współpracy naukowej z prof. dr hab. n. med. Ryszardem Lauterbachem oraz prof. dr hab. n. med. Hubertem Hurasem. Na badania otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej o numerze: 1072.6120.133.2018. Tak jak w przypadku wcześniejszych badań kału ludzkiego, starano się, aby możliwie cała ilość wypróżnionej smółki była zabezpieczona do badań. Materiał po pobraniu był niezwłocznie zamrażany i przechowywany w temperaturze -21°C do czasu analizy.

W pierwszej kolejności skupiono się na dobraniu takich warunków rozdzielania z wykorzystaniem techniki HPLC, aby oddzielić badane krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, a następnie zmodyfikowano je tak, żeby sygnały otrzymane od analitów nie interferowały z tymi pochodzącymi od innych składników ekstraktu smółki. Niemożliwym było zaadoptowanie uprzednio opracowanej metody, przedstawionej w pracy **H3**, gdyż ekstrakty smółki okazały się matrycą dużo bardziej złożoną. Przygotowanie do badań takiego materiału, cechującego się zupełnie inną konsystencją i dużo większą gęstością niż kał zwierzęcy czy pobrany od osób dorosłych, stanowiło duże wyzwanie analityczne. Chromatogram ekstraktów smółki wykazał również obecność sygnałów, pochodzących od znacznie większej ilości związków, w porównaniu do próbek kału szczurzego, co dodatkowo utrudniało analizę. Proces rozdzielania prowadzono z wykorzystaniem tej samej aparatury pomiarowej, co w doświadczeniu opisanym w pracy **H3**. Jednak ponownego opracowania wymagał program gradientowy, który ostatecznie przedstawiał się następująco (% udział ACN w buforze fosforanowym): 0 min 5% ACN, 6 min. 20% ACN, 12 min. 30% ACN, 16 min. 30% ACN, 25 min. 40% ACN, 28 min. 80% ACN, 32 min. 80% ACN i 35 min. 5% ACN. Zastosowane warunki pomiarowe zapewniły zadowalającą separację wszystkich interesujących związków, z wyjątkiem kwasu octowego (przy powtarzalności czasów retencji poniżej 1%). W tym ostatnim przypadku stwierdzono znaczną interferencję ze strony składników matrycy, dlatego oznaczenie kwasu octowego przeprowadzono jako osobną analizę, z wykorzystaniem jedynie fazy ruchomej B (bufor fosforanowy o $\text{pH} \approx 2,6$, elucja izokratyczna).

Walidację przeprowadzono poprzez wyznaczenie następujących parametrów: zakres liniowości wskazań w zadanym przedziale stężeń analitów, granice wykrywalności i oznaczalności, precyzja (CV) i odzysk. Otrzymane wyniki wskazały, że przedstawione

metody odznaczały się wysoką precyzją (współczynnik wariancji $\leq 2,5\%$), oraz niskimi granicami wykrywalności (od 0,01 do 0,80 mmol/kg) i oznaczalności (od 0,04 do 2,64 mmol/kg). Odzysk dla poszczególnych analitów mieścił się w zakresie 90 – 106 %. Ponadto, metody cechowała liniowość wskazań w zadanym zakresie stężeń oznaczanych analitów (3,125 - 200 mg/L, $R^2 > 0,997$). Na podstawie uzyskanych wartości wyznaczonych parametrów analitycznych uznano, że metody oznaczeń kwasów organicznych w ekstraktach smółki spełniają stawiane jej wymagania i mogą zostać zastosowane do analizy próbek rzeczywistych. Zatem w ostatnim kroku przeprowadzono analizę ekstraktów smółek, pozyskanych od 17 noworodków, z których 8 przyszło na świat drogą cięcia cesarskiego (CC), a 9 siłami natury (SN).

Najwyższe stężenie spośród oznaczonych SCFAs w próbkach smółek stwierdzono dla kwasu octowego (mediana: 40,0 mmol/kg) i masłowego (mediana: 61,6 mmol/kg). Mediany stężeń tych kwasów były istotnie wyższe, niż wyznaczone dla kwasów propionowego (mediana: 3,65 mmol/kg) i izowalerianowego (6,06 mmol/kg) ($p < 0,05$). Różnice pomiędzy medianami par: kwas octowy i kwas masłowy oraz kwas propionowy i izowalerianowy, nie były istotne statystycznie. Mediany stężeń oznaczone dla kwasu walerianowego i wszystkich pozostałych kwasów nie różniły się istotnie. Zaobserwowano również, że w przypadku stosunku molowego kwasu octowego, propionowego i masłowego, nie ma wyraźnej prawidłowości, jak w przypadku stwierdzonej u osób dorosłych. Ponadto zaobserwowano, że średnie stężenia poszczególnych kwasów w smółkach pochodzących od noworodków urodzonych drogą CC nie różnią się statystycznie istotnie od tych, które przyszły na świat SN. Może to wynikać z wysokiej zmienności osobniczej pacjentów, która między innymi przejawiała się uzyskanym, szerokim przedziałem stężeń oznaczanych SCFAs w smółkach pacjentów poszczególnych grup.

Parametry uzyskane w trakcie procesu walidacji świadczą o tym, że opracowana metoda z wykorzystaniem techniki HPLC z detektorem DAD jest rzetelna, a uzyskane wyniki są wiarygodne. W związku z tym może być ona wykorzystana do rutynowej analizy smółki noworodków.

Aspekt nowości:

- optymalizacja warunków rozdzielania krótkołańcuchowych kwasów organicznych z ekstraktów smółki z wykorzystaniem metody HPLC-DAD. Walidacja metody oznaczania SCFAs,
- dostarczenie pilotowych danych dotyczących stężeń wybranych krótkołańcuchowych kwasów organicznych, w próbkach smółek noworodków z regionu Małopolski, urodzonych w sposób naturalny lub metodą cesarskiego cięcia.

Praktyczne możliwości wykorzystania opracowanej metody:

- do badań podstawowych w zakresie roli SCFAs w prawidłowym rozwoju noworodków,
- metoda ta może znaleźć zastosowanie w wytypowaniu kluczowych czynników, które mogą mieć wpływ na stężenie SCFAs w smółce noworodków,
- monitorowanie stężeń poszczególnych krótkołańcuchowych kwasów organicznych w smółce noworodków, a następnie kale niemowląt, może być wykorzystane do badań mających na celu powiązania ich ze stanem zdrowia dziecka. W przyszłości, mogłoby to posłużyć do wczesnego zastosowania celowanej interwencji żywieniowej lub farmakologicznej.

H5. Dobrowolska-Iwanek, J. Simple method for determination of short-chain organic acid in mead. *Food Analytical Methods*, 2015, 8, 2356-2359. **IF = 2,167, MEiN = 30.**

W kolejnej pracy przedstawiono szybką, prostą i taną metodę rozdzielania 8 krótkołańcuchowych kwasów organicznych (kwas: winowy, mrówkowy, cytrynowy, jabłkowy, mlekowy, bursztynowy, octowy i glukonowy) w próbkach miodu pitnego, z wykorzystaniem izotachforezy kapilarnej. Miody pitne do analizy pozyskano od producenta - Pasięka Maciej Jaros, z Tomaszowa Mazowieckiego. Przed analizą miody pitne były jedynie rozcieńczane wodą destylowaną. W doborze składu buforów, wykorzystywanych w procesie rozdzielania, kierowano się wymogiem uzyskania znaczącej różnicy ruchliwości jonów poszczególnych kwasów (co gwarantowało skuteczną ich separację), jednocześnie dbając o to, żeby rozdzielane związki znalazły się w środowisku o odpowiednim pH, zapewniającym ich występowanie w formie zjonizowanej (zapewnienie ruchu w polu elektrycznym). W toku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że optymalnymi warunkami rozdzielania kwasów obecnych w miodach pitnych są: (i) bufor wiodący o składzie: 15 mM kwas solny,

0,2% hydroksyetylometyloceluloza (M-HEC), uzupełniony β -alaniną tak, aby końcowe pH roztworu wynosiło 3,6; (ii) bufor kończący o składzie: 5 mM kwas kapronowy i 5 mM L-histydyna. Nie było możliwe zastosowanie tych samych warunków rozdzielania, co w przypadku analiz przedstawionych w pracy **H1**, ponieważ przy pH=3,5 roztworu wiodącego, sygnał od kwasu mrówkowego nakładał się z obserwowanym od kwasu winowego.

Rozdzielanie izotachforetyczne wykonywano przy użyciu analizatora elektroforetycznego EA 202 M (Villa Labeco, Spisska Nova Ves, Słowacja) z detektorem konduktometrycznym. Przy zastosowaniu opracowanych warunków, rozdzielono 8 kwasów organicznych zidentyfikowanych w miodach pitnych. Strefy uzyskane w analizie ITP zidentyfikowano poprzez porównanie z wysokościami stopni wzorców odpowiednich kwasów. Ponadto, skontrolowano poprawność identyfikacji poprzez analizę próbek wzbogaconych analitami (wzorcami wewnętrznymi).

Opracowana metoda rozdzielania z wykorzystaniem techniki ITP była w kolejnym kroku zwalidowana. Wyznaczono takie parametry jak: granice wykrywalności i oznaczalności, odzysk (na dwóch poziomach) oraz precyzję wyrażoną jako RSD, liniowość wskazań w zadanym przedziale stężeń elektrolitów. Przy czym analizy prowadzono równolegle, z wykorzystaniem dwóch rodzajów miodów pitnych: dwójniaków i trójniaków.

Otrzymane wyniki analiz wskazały, że opracowana metoda cechuje się liniowością wskazań dla wszystkich analitów w przedziale stężeń od 3,125 do 100 mg/L ($R^2 > 0,998$). Otrzymany odzysk na dwóch poziomach dodatku analitów wynosił od 96% do 101%. Względna wartość odchylenia standardowego była mniejsza lub równa 2,5%. Dla wszystkich przebadanych kwasów organicznych, granica wykrywalności wahała się od 0,7 do 4,7 mg/L a granica oznaczalności od 2,2 do 14,2 mg/L.

Opracowaną procedurę analityczną z wykorzystaniem techniki ITP, można uznać za szybką (wystarczy rozcieńczyć miód pitny wodą destylowaną) i wiarygodną do oznaczania kwasów organicznych w miodach pitnych (świadczą o tym wartości parametrów uzyskanych w toku procesu walidacji)

Aspekt nowości

- Opracowanie szybkiej procedury analitycznej (przygotowanie próbki i pomiar sygnału analitycznego) z wykorzystaniem techniki ITP., do wiarygodnego oznaczania kwasów organicznych w miodach pitnych.

Praktyczne możliwości wykorzystania opracowanej metody:

- zaproponowana metoda umożliwia monitorowanie zmian profilu i stężenia kwasów organicznych podczas fermentacji brzezki miodowej, jak również pozwala na kontrolę dojrzałości produktu końcowego,
- metoda ta może posłużyć do badania autentyczności miodów wykorzystanych do produkcji miodów pitnych, w oparciu o profil SCOAs,
- metoda ta została wykorzystana do badania dostępnych na rynku miodów pitnych w celu wykrycia obecności kwasów organicznych pochodzących z innych źródeł niż miód pitny i proces fermentacji (np. z soków owocowych lub dodatków kwasów organicznych). Wyniki analiz zostały zaprezentowane w pracy: Dobrowolska-Iwanek, J., Kwit, M., Fołta, M., Rusin, M., Galanty, A., Zagrodzki, P., Chemical analysis of selected meads produced in Poland, European Food Research And Technology, która jest obecnie w recenzji.

H6. Dobrowolska-Iwanek, J., Jamka-Kasprzyk, M., Rusin, M., Paśko, P., Grekh, S., Jurczak, A.: Developed and validated capillary isotachopheresis method for the rapid determining organic acids in children's saliva. **Molecules**, 2023, 28(3), 1092. **IF = 4,927 MEiN = 140**

W kolejnym artykule, zgłoszonym do postępowania habilitacyjnego, przedstawiono szybką procedurę oznaczania wybranych krótkołańcuchowych kwasów organicznych w ślinie dzieci. Kwalifikacja pacjentów do badania, pobranie próbek i ich wstępne przygotowanie (odwirowanie materiału biologicznego) odbyło się w Uniwersyteckiej Klinice Stomatologicznej w Krakowie, dzięki współpracy naukowej z mgr Małgorzatą Jamką-Kasprzyk i dr hab. n. zdr. Anną Jurczak, prof. PUM. Na badania otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej o numerze: 1072.6120.106.2019. Otrzymane próbki przed samą analizą były jedynie rozcieńczane wodą destylowaną i przesączone przez 0,45 µm filtr nylonowy.

Rozdzielanie izotachforetyczne wykonywano przy użyciu analizatora elektroforetycznego EA 202 M (Villa Labeco, Spisska Nova Ves, Słowacja) z detektorem konduktometrycznym. Przy doborze warunków pomiarowych kierowano się tym, aby skład buforów, ich pH, zapewniły występowanie analitów w formie zjonizowanej (elektromigracja) i uzyskanie takiej różnicy ruchliwości jonów poszczególnych kwasów, aby możliwa była ich skuteczna separacja.

W toku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że optymalny skład wykorzystywanych elektrolitów do rozdzielenia wybranych SCFAs w ślinie techniką ITP jest

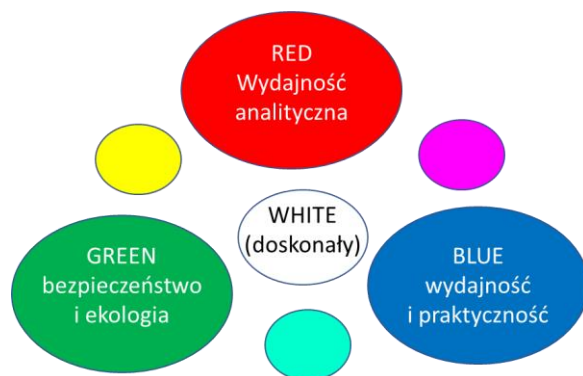
następujący:

(i) bufor wiodący (LE): 10 mM kwas solny, 0,1% M-HEC, 20 mM kwas ϵ -aminokapronowy (pH = 4,5); (ii) bufor kończący: 5 mM kwas kapronowy i 5 mM L-histydyna.

Opracowana metoda rozdzielania wybranych kwasów organicznych z wykorzystaniem techniki ITP była w kolejnym kroku zwalidowana. Wyznaczono takie parametry jak: granice wykrywalności i oznaczalności, odzysk (na dwóch poziomach) oraz precyzję wyrażoną jako RSD, liniowość wskazań w zadanym przedziale stężeń analitów.

Metoda charakteryzowała się liniowością wskazań ($R^2 > 0,996$) w następujących zakresach stężeń: 0,05-150 mg/L dla kwasu octowego, 0,39-50 mg/L dla kwasu mrówkowego, 0,39-100 mg/L dla kwasu propionowego, 0,78-50 mg/L dla kwasu mlekowego oraz 1,56-50 mg/L dla kwasu masłowego. Precyzja metody wyrażona jako RSD mieściła się w przedziale 1,5-5,3% i spełniała kryterium walidacji precyzji dla próbek biologicznych. Odzysk wyznaczony na dwóch poziomach wynosił od 90% do 110% (I) oraz od 75% do 106% (II). Parametry uzyskane w trakcie procesu walidacji świadczą o tym, że opracowana metoda z wykorzystaniem techniki ITP z detektorem konduktometrycznym jest rzetelna, a uzyskane wyniki są wiarygodne.

W pracy podjęto się również porównania opracowanej metody z wcześniej opracowaną metodą analizy techniką UPLC-MS/MS przez Schulz i wsp. [58]. Jako narzędzia do realizacji tego celu wykorzystano model barw addytywnych RGB; Red-Green-Blue (Ryc. 4)[76].



Ryc. 4. Schemat poglądowy modelu barw addytywnych RGB [76].

Ta analiza porównawcza opiera się na trzech aspektach metod analitycznych: wydajności analitycznej (Red), bezpieczeństwie i ekologiczności (Green) oraz wydajności/praktyczności (Blue). Dlatego przy budowie modelu uwzględniono następujące aspekty: parametry walidacyjne, ilość i toksyczność odczynników chemicznych oraz koszty związane z walidacją i analizą próbki (w tym koszty składników fazy ruchomej i stacjonarnej

oraz buforu, wzorce wewnętrzne i wzorce kwasów organicznych, a także inne odczynniki niezbędne do kalibracji i przygotowania próbek). Uwzględniono również proces pobierania i przygotowania próbek śliny, czas analizy, a także zużycie energii (na podstawie Nowak i wsp. [77]). Końcowy kolor metody izotachforezy okazał się biały, co oznaczało, że metoda ta jest dobrym kandydatem do opisanego zastosowania. Natomiast kolor końcowy dla metody UPLC-MS/MS był szary, co oznaczało, że metoda ta może być brana pod uwagę, jeśli nie są dostępne lepsze metody [76]. Niższa wartość parametru "Method brilliance" dla metody UPLC-MS/MS wynikała z większej liczby użytych odczynników, a tym samym z liczby piktogramów i kosztów tych odczynników. Jest to związane z zastosowaniem odczynników znakowanych izotopami jako wzorców wewnętrznych oraz derywatyzacją analitów przeprowadzaną przed analizą chromatograficzną. Natomiast metoda izotachforezy charakteryzuje się znacznie lepszą efektywnością praktyczną, co wynika przede wszystkim z krótkiego czasu potrzebnego na pobranie i przygotowanie próbek śliny do analizy. Z tego powodu można zauważyć, że opracowana metoda izotachforezy, choć mniej zautomatyzowana w przypadku tego konkretnego układu instrumentalnego, wymaga mniejszego nakładu odczynników, krótszego czasu przygotowania próbek oraz powoduje mniejsze zużycie energii. Czynniki te świadczą o tym, że opracowana metoda oznaczania kwasów organicznych w ślinie jest szybka, wiarygodna i równocześnie wpisuje się w paradygmat zielonej chemii.

Parametry uzyskane w trakcie procesu walidacji świadczą o tym, że opracowana metoda z wykorzystaniem techniki ITP z detektorem konduktometrycznym jest rzetelna, a uzyskane wyniki są wiarygodne. W związku z tym może być ona wykorzystana do rutynowej analizy śliny dzieci pod kątem oznaczania w niej SCFAs.

Metoda ta, z uwagi na krótki czas jaki jest potrzebny do przygotowania próbki, niski koszt analiz, zużycie odczynników o niewielkiej toksyczności, jak również stosunkowo niski pobór energii, wpisuje się paradygmat zielonej chemii i stanowi atrakcyjną, proekologiczną alternatywę dla innych metod wykorzystywanych do tego celu.

Aspekt nowości

- opracowanie szybkiej procedury analitycznej (przygotowanie próbki i pomiar sygnału analitycznego) z wykorzystaniem techniki ITP do wiarygodnego oznaczania kwasów organicznych w ślinie dzieci,
- zastosowanie modelu RGB do wielokierunkowej oceny opracowanej metody analitycznej.

Praktyczne możliwości wykorzystania opracowanej metody:

- Opracowana procedura badawcza, wykorzystująca technikę izotachforezy (ITP), może w przyszłości stać się nowym narzędziem do badania śliny w celach diagnostycznych, gdzie kwasy organiczne (ich obecność/ stężenie) będą służyły jako biomarkery chorób o różnej etiologii np. chorób jamy ustnej.

Podsumowanie osiągnięcia naukowego

Zaprezentowane przeze mnie wyniki badań, opisane w cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych: **H1-H6**, są zgodne z celem badawczym i stanowią znaczący wkład w rozwój dyscypliny – nauki farmaceutyczne, ze szczególnym uwzględnieniem obszaru bromatologia. W ramach przedstawianego osiągnięcia:

- opracowano procedurę ekstrakcji krótkołańcuchowych kwasów organicznych z dwóch matryc: materiału roślinnego (kielek) oraz kału ludzkiego, z wykorzystaniem nowoczesnych technik ekstrakcji. W toku badań dokonano optymalizacji warunków wmywania tak, żeby proces przebiegał z możliwie największą wydajnością, przy czym plan doświadczeń oparto na zaawansowanych metodach statystycznych. Opisana procedura ekstrakcji SCOAs z kału ludzkiego już znalazła zastosowanie w szeregu badań, ukierunkowanych między innymi na poszerzenie wiedzy dotyczącej roli tych związków w chorobach zapalnych jelit i szukaniu biomarkerów tych schorzeń,
- opracowano i zwalidowano metody oznaczania krótkołańcuchowych kwasów organicznych w ekstraktach kału szczurzego i smółki, z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Metody te zostały wykorzystane w praktyce w badaniach pilotażowych: (i) analizie wpływu diety bogatej w produkty wysokobłonnikowe na stężenie wybranych SCOAs w kałach szczurów z uszkodzoną tarczycą (ii) oznaczaniu SCOAs w smółkach dzieci urodzonych drogą cięcia cesarskiego i naturalnie,
- opracowano szybką i kompletną procedurę analityczną (przygotowanie próbki do analizy i pomiaru sygnału analitycznego) oznaczania SCOAs w miódach pitnych i ślinie dzieci, z wykorzystaniem techniki izotachforezy kapilarnej. Ponadto, opracowana procedura oznaczania kwasów organicznych w miódach pitnych znalazła zastosowanie w analizach tych napojów wyprodukowanych w Polsce. W przypadku analizy śliny, wykorzystując model RGB oceniono, że opracowana metoda jest dobrą, wydajną i

„zieloną” alternatywą dla wykorzystywanej przez inne zespoły badawcze techniki UPLC-MS/MS.

Opracowane metody analityczne mogą z powodzeniem zostać wykorzystywane do dalszych badań, które przyczynią się do:

- poszerzania wiedzy na temat roli SCOAs w organizmach roślinnych, zwierzęcych i ludzkich i znaczenia tych związków w fizjologii i patofizjologii,
- wyznaczenia profilu i stężenia SCOAs w produktach spożywczych, co może przełożyć się na ocenę ich jakości oraz potencjału prozdrowotnego,
- wprowadzenia nowych biomarkerów, których obecność lub/i poziom stężenia w materiale pozyskanym metodami nieinwazyjnymi pozwoli na ocenę stopnia rozwoju różnych chorób, w szczególności schorzeń przewodu pokarmowego,
- wspomagania monitorowania efektów zastosowanych interwencji żywieniowych czy też farmakoterapii.

Spis literatury

- [1] Papagianni M., Organic Acids (Second ed.) M.Y. Murray (Ed.), Comprehensive Biotechnology, Elsevier (2011), pp. 109-120
- [2] Kozłowski, T. T., & Pallardy, S. G. (1996). Physiology of woody plants. Elsevier.
- [3] Igamberdiev, A. U., & Eprintsev, A. T. (2016). Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1042
- [4] Igamberdiev, A. U., & Bykova, N. V. (2018). Role of organic acids in the integration of cellular redox metabolism and mediation of redox signalling in photosynthetic tissues of higher plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 74-85
- [5] Stroiński, A. (2002). Odporność roślin na stres wywołany przez metale ciężkie. *Biotechnologia*, 3(58), 124-134.
- [6] Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Thangavel, P., Roychoudhury, A., Gill, S. S., Rodrigo, M. A. M., Adam, V., Fujita, M., Kizek R., Duarte, A. C., Pereira, E., Ahmad, I. (2015). Jacks of metal/metalloid chelation trade in plants—an overview. *Frontiers in Plant Science*, 6, 192
- [7] Shahbaz, A. M., Oki, Y., Adachi, T., Murata, Y., & Khan, M. H. R. (2006). Phosphorus starvation induced root-mediated pH changes in solubilization and acquisition of sparingly soluble P sources and organic acids exudation by Brassica cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition*, 52(5), 623-633.
- [8] Panchal, P., Miller, A. J., & Giri, J. (2021). Organic acids: versatile stress-response roles in plants. *Journal of Experimental Botany*, 72(11), 4038-4052.
- [9] Macias-Benitez, S., Garcia-Martinez, A. M., Caballero Jimenez, P., Gonzalez, J. M., Tejada Moral, M., & Parrado Rubio, J. (2020). Rhizospheric organic acids as biostimulants: monitoring feedbacks on soil microorganisms and biochemical properties. *Frontiers in plant science*, 11, 633.
- [10] Dobrowolska-Iwanek, J., Zagrodzki, P., Galanty, A., Fołta, M., Kryczyk-Kozioł, J., Szłósarczyk, M., Rubio, P. S., Saraiva de Carvalho, I., Paśko, P. (2022). Determination of

essential minerals and trace elements in edible sprouts from different botanical families—application of chemometric analysis. *Foods*, 11(3), 371.

[11] Seraglio, S. K. T., Bergamo, G., Brugnerotto, P., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2021). Aliphatic organic acids as promising authenticity markers of bracing honeydew honey. *Food Chemistry*, 343, 128449.

[12] Švecová, B., Bordovská, M., Kalvachová, D., & Hájek, T. (2015). Analysis of Czech meads: Sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 80-88.

[13] Kružík, V., Grégrová, A., Vaispacherová, L., Václavíková, E., Škorpilová, T., Rajchl, A., & Cizkova, H. (2022). Characteristic parameters of honey wines and dessert meads. *Czech Journal of Food Sciences*, 40(1), 42-50.

[14] Gogol D, Tuszyński T (1996) Miody pitne - tradycje, surowce i technologie. *Przem. Ferment. Owocowo-Warzywny* 40(08):25–27

[15] <https://www.infor.pl/akt-prawny/DZU.2022.287.0002113,metryka,rozporzadzenie-ministra-rolnictwa-i-rozwoju-wsi-w-sprawie-szczegolowego-sposobu-wyrobu-fermentowanych-napojow-winiarskich-rodzajow-tych-napojow-ich-dodatkowego-znakowania-oraz-szczegolowych-wymagan-kt.html> (dostęp 30.04.2023)

[16] Sroka, P., & Tuszyński, T. (2007). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, 104(3), 1250-1257.

[17] Dobrowolska-Iwanek, J., Kwit, M., Fołta, M., Rusin, M., Galanty, A., Zagrodzki, P., Chemical analysis of selected meads produced in Poland, *European Food Research And Technology* (w recenzji)

[18] Morrison, R.T.; Boyd, R.N. (1992). *Organic Chemistry* (6th ed.). ISBN 0-13-643669-2.

[19] Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1979). Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *The American journal of clinical nutrition*, 32(1), 164-172

[20] Holscher H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes*, 8(2), 172-184.

[21] Gilbert, M. S., Ijssennagger, N., Kies, A. K., & van Mil, S. W. (2018). Protein fermentation in the gut; implications for intestinal dysfunction in humans, pigs, and poultry. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 315(2), G159-G170.

[22] Louis, P., Hold, G. L., & Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature reviews microbiology*, 12(10), 661-672

[23] Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*.

[24] Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 54(9), 2325-2340.

[25] Scheppach, W. (1994). Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 35(1 Suppl), S35-S38.

[26] Jung, T. H., Park, J. H., Jeon, W. M., & Han, K. S. (2015). Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. *Nutrition Research and Practice*, 9(4), 343-349.

[27] Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., & Vidal, A. (2007). Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, 13(20), 2826.

[28] Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut microbes*, 7(3), 189-200

[29] Hijova, E., & Chmelarova, A. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislavské lekárske listy*, 108(8), 354.

- [30] Avivi-Green, C., Polak-Charcon, S., Madar, Z., & Schwartz, B. (2002). Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *The Journal of nutrition*, 132(7), 1812-1818.
- [31] Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 25.
- [32] May, K. S., & den Hartigh, L. J. (2021). Modulation of adipocyte metabolism by microbial short-chain fatty acids. *Nutrients*, 13(10), 3666.
- [33] Sun, Q., Jia, Q., Song, L., & Duan, L. (2019). Alterations in fecal short-chain fatty acids in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 98(7).
- [34] Dąbek-Drobny, A., Kaczmarczyk, O., Piątek-Guziewicz, A., Woźniakiewicz, M., Paśko, P., Dobrowolska-Iwanek, J., Woźniakiewicz, A., Targosz, A., Ptak-Belowska, A., Zagrodzki, P., Zwolińska-Wcisło, M. (2022). Application of the clustering technique to multiple nutritional factors related to inflammation and disease progression in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrients*, 14(19), 3960.
- [35] Limdi, J. K. (2018). Dietary practices and inflammatory bowel disease. *Indian Journal of Gastroenterology*, 37(4), 284-292.
- [36] Alvandi, E., Wong, W. K., Joglekar, M. V., Spring, K. J., & Hardikar, A. A. (2022). Short-chain fatty acid concentrations in the incidence and risk-stratification of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine*, 20(1), 1-11
- [37] Granado-Serrano, A. B., Martín-Garí, M., Sánchez, V., Riart Solans, M., Berdún, R., Ludwig, I. A., Rubió, L., Vilapriyó E., Portero-Otín M., Serrano, J. C. E. (2019). Faecal bacterial and short-chain fatty acids signature in hypercholesterolemia. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13
- [38] Nakahori, Y., Shimizu, K., Ogura, H., Asahara, T., Osuka, A., Yamano, S., Tasaki, O., Kuwagata, Y., Shimazu, T. (2020). Impact of fecal short-chain fatty acids on prognosis in critically ill patients. *Acute Medicine & Surgery*, 7(1), e558
- [39] Rasmussen, H. S., Holtug, K., Ynggård, C., & Mortensen, P. B. (1988). Faecal concentrations and production rates of short chain fatty acids in normal neonates. *Acta Paediatrica*, 77(3), 365-368.
- [40] Midtvedt, A. C., & Midtvedt, T. (1992). Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 15(4), 395-403.
- [41] Łoniewska, B., Fraszczyk-Tousty, M., Tousty, P., Skonieczna-Żydecka, K., Maciejewska-Markiewicz, D., & Łoniewski, I. (2023). Analysis of fecal short-chain fatty acids (scfas) in healthy children during the first two years of life: an observational prospective cohort study. *Nutrients*, 15(2), 367
- [42] Moore, C., Negrusz, A., & Lewis, D. (1998). Determination of drugs of abuse in meconium. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 713(1), 137-146
- [43] Lisowska-Myjak, B., Skarżyńska, E., & Bakun, M. (2018). Meconium proteins as a source of biomarkers for the assessment of the intrauterine environment of the fetus. *Journal of developmental origins of health and disease*, 9(3), 329-337
- [44] Gareri, J., Klein, J., & Koren, G. (2006). Drugs of abuse testing in meconium. *Clinica Chimica Acta*, 366(1-2), 101-111
- [45] Concheiro, M., & Huestis, M. A. (2018). Drug exposure during pregnancy: analytical methods and toxicological findings. *Bioanalysis*, 10(8), 587-606
- [46] Jeong, Y., Lee, S., Kim, S., Choi, S. D., Park, J., Kim, H. J., Lee, J. J., Choi, G., Choi, S., Kim, S., Kim, S. Y., Kim, Y. D., Cho, G., Suh, E., Kim, S. K., Eun, S.H., Eom, S., Kim, S., Kim, G. H., Kim, S., Choi, K., Moon, H. B. (2016). Occurrence and prenatal exposure to

persistent organic pollutants using meconium in Korea: Feasibility of meconium as a non-invasive human matrix. *Environmental research*, 147, 8-15

[47] Bielawski, D., Ostrea, E., Posecion, N., Corrion, M., & Seagraves, J. (2005). Detection of several classes of pesticides and metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 62, 623-629

[48] Hamzaoglu, O., Yavuz, M., Turker, G., & Savli, H. (2014). Air pollution and heavy metal concentration in colostrum and meconium in two different districts of an industrial city: a preliminary report. *Int. Med. J*, 21(1), 77-82.

[49] Zhao, Y., Zhou, Y., Zhu, Q., Xia, B., Ma, W., Xiao, X., ... & Zhang, Y. (2019). Determination of antibiotic concentration in meconium and its association with fetal growth and development. *Environment international*, 123, 70-78

[50] Tamburini, S., Shen, N., Wu, H. C., & Clemente, J. C. (2016). The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature medicine*, 22(7), 713-722

[51] RASMUSSEN, H. S., HOLTUG, K., YNGGÅRD, C., & MORTENSEN, P. B. (1988). Faecal concentrations and production rates of short chain fatty acids in normal neonates. *Acta Paediatrica*, 77(3), 365-368.

[52] Midtvedt, A. C., & Midtvedt, T. (1992). Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 15(4), 395-403.

[53] Szylił, O., Maurage, C., Gasqui, P., Popot, F., Favre, A., Gold, F., & Borderon, J. C. (1998). Fecal Short-Chain Fatty Acids Predict Digestive Disorders in Premature Infants. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 22(3), 136-141.

[54] Zhuang, L., Chen, H., Zhang, S., Zhuang, J., Li, Q., & Feng, Z. (2019). Intestinal microbiota in early life and its implications on childhood health. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 17(1), 13-25.

[55] Moores, C. J., Kelly, S. A. M., & Moynihan, P. J. (2022). Systematic review of the effect on caries of sugars intake: ten-year update. *Journal of Dental Research*, 101(9), 1034-1045

[56] Featherstone, J. D. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Australian dental journal*, 53(3), 286-291

[57] Fidalgo, T.; Freitas-Fernandes, L.B.; Angeli, R.; Muniz, A.M.S.; Gonsalves, E.; Santos, R.; Nadal, J.; Almeida, F.C.L.; Valente, A.P.; Souza, I.P.R. Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions. *Metabolomics* 2012, 9, 657–666

[58] Schulz, A., Lang, R., Behr, J., Hertel, S., Reich, M., Kümmerer, K., ... & Hofmann, T. (2020). Targeted metabolomics of pellicle and saliva in children with different caries activity. *Scientific reports*, 10(1), 697

[59] Krahel, A., Hernik, A., Dmitrzak-Weglarz, M., & Paszynska, E. (2022). Saliva as Diagnostic Material and Current Methods of Collection from Oral Cavity. *Clinical Laboratory*, 68(10).

[60] Szczeklik, K., Krzysciak, W., Osiewicz, M., Bystrowska, B., Kuszaj, M., Piatek-Guziewicz, A., ... & Zwolinska-Wcislo, M. (2022). Short-chain fatty acids in the saliva of patients with gastroesophageal reflux disease. *JPP*, (4), 05

[61] Bel'skaya, L. V. (2018). Determination of the content of organic acids in the saliva of patients with breast cancer by capillary electrophoresis. *Klinicheskaja Laboratornaia Diagnostika*, 63(7), 419-422

[62] Cui, Y., Yang, M., Zhu, J., Zhang, H., Duan, Z., Wang, S., ... & Liu, W. (2022). Developments in diagnostic applications of saliva in Human Organ Diseases. *Medicine in Novel Technology and Devices*, 100115.

[63] Namieśnik, J., Jamróiewicz, Z., Pilarczyk, M., & Torres, L. (2000). Preparation of environmental samples for analysis. *WN-T, Warszawa*.

- [64] Namieśnik, J., & Szefer, P. (2008). Preparing samples for analysis-the key to analytical success. *Ecol. Chem. Eng. S*, 15(2), 167-244.
- [65] Srivastava, N., Singh, A., Kumari, P., Nishad, J. H., Gautam, V. S., Yadav, M., ... & Kharwar, R. N. (2021). Advances in extraction technologies: Isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. In *Natural bioactive compounds* (pp. 409-433). Academic Press.
- [66] Zhang, H. F., Yang, X. H., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(12), 672-688.
- [67] Fang, X., Wang, J., Zhang, S., Zhao, Q., Zheng, Z., & Song, Z. (2012). Simultaneous extraction of hydrosoluble phenolic acids and liposoluble tanshinones from *Salviae miltiorrhizae radix* by an optimized microwave-assisted extraction method. *Separation and purification technology*, 86, 149-156.
- [68] Liu, T., Sui, X., Zhang, R., Yang, L., Zu, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, Z. (2011). Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1218(47), 8480-8489.
- [69] Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- [70] Śliwiński, A. (2001). Ultradźwięki i ich zastosowanie. Warszawa, WNT. ISBN 83-204-2567-04.
- [71] Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325.
- [72] Liebisch, G., Ecker, J., Roth, S., Schweizer, S., Öttl, V., Schött, H. F., Yoon, H., Haller, D., Holler, E., Burkhardt, R., Matysik, S. (2019). Quantification of fecal short chain fatty acids by liquid chromatography tandem mass spectrometry—investigation of pre-analytic stability. *Biomolecules*, 9(4), 121.
- [73] Alupului, A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2009, May). Ultrasonic vs. microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants. In AIDIC conference series (Vol. 9, No. 1-8). Milano, Italy: ERIS CTSrl.
- [74] Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. J. P. R. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 7-18.
- [75] Lauritano, E. C., Bilotta, A. L., Gabrielli, M., Scarpellini, E., Lupascu, A., Laginestra, A., Novi, M., Sottili, S., Serricchio, M., Cammarota, G., Gasbarrini, G., Pontecorvi, A., Gasbarrini, A. (2007). Association between hypothyroidism and small intestinal bacterial overgrowth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(11), 4180-4184.
- [76] Nowak, P. M., & Kościelniak, P. (2019). What color is your method? Adaptation of the RGB additive color model to analytical method evaluation. *Analytical chemistry*, 91(16), 10343-10352.
- [77] Nowak, P. M., Bis, A., Rusin, M., & Woźniakiewicz, M. (2023). Carbon footprint of the analytical laboratory and the three-dimensional approach to its reduction. *Green Analytical Chemistry*, 100051.

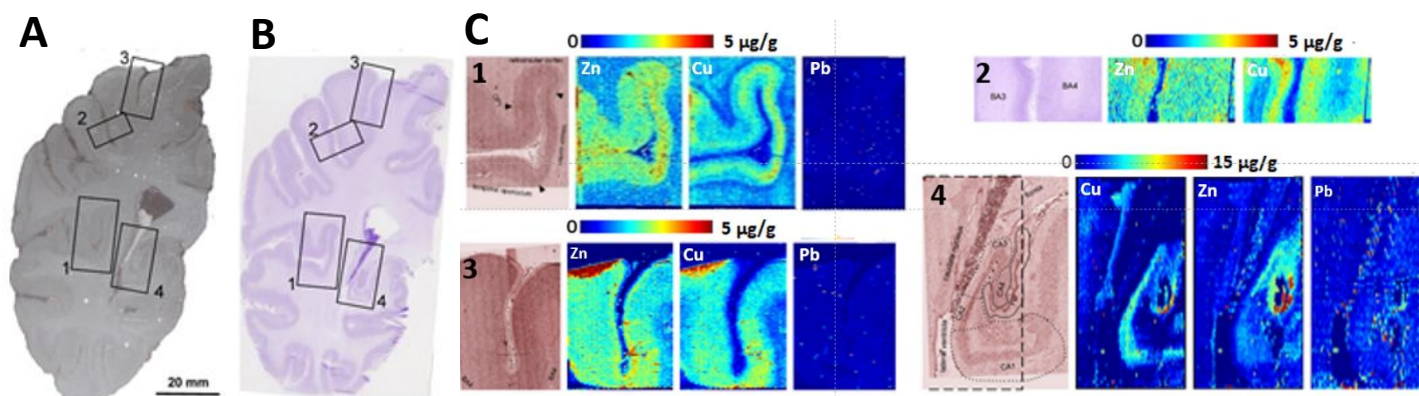
5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

Oprócz cyklu habilitacyjnego, drugim co do ważności moim osiągnięciem naukowym, jest cykl badań, ukierunkowanych na określenie dystrybucji wybranych makro i mikro pierwiastków w określonych obszarach mózgu szczurzego i ludzkiego, z wykorzystaniem metody spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie.

W ramach tego projektu do analizy rozmieszczenia pierwiastków w różnych obszarach mózgu ssaków zaadaptowałam i zwalidowałam metody spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS, z ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Badania te były realizowane w Centrum Naukowo-Badawczym *Forschungszentrum Jülich* (**Juelich, Niemcy**), w Zentralabteilung für Chemische Analysen (ZCH) pod opieką dr hab. J. Sabine Becker od października 2005 roku do lutego 2007 roku.

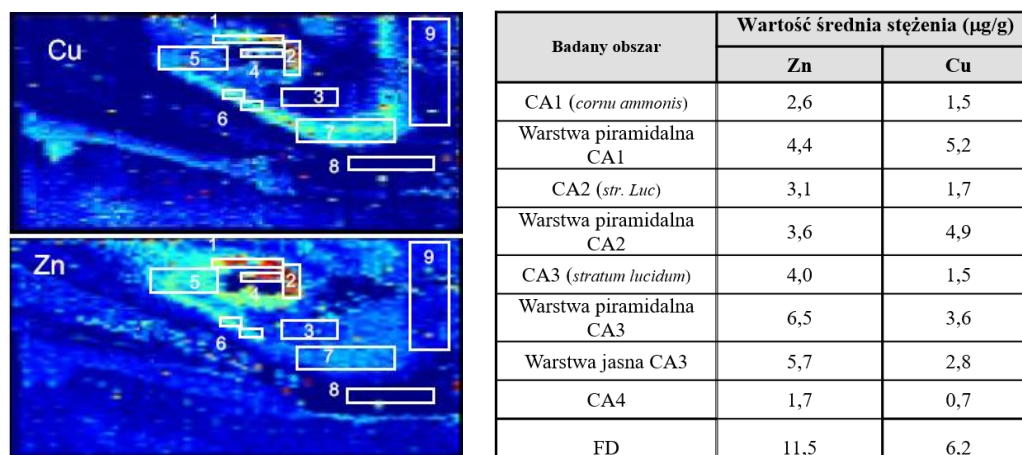
W ramach prezentowanego, dodatkowego osiągnięcia:

1. Określono dystrybucję i wyznaczono stężenia cynku, miedzi i ołowiu w wybranych regionach i podregionach mózgu ludzkiego: korze wyspowej (*cortex insulae*), bruzdzie środkowej (*sulcus centralis*), bruzdzie przedśrodkowej (*sulcus precentralis*) oraz hipokampie (*hippocampus*). W tym celu pobierano dwa, sąsiadujące 20 µm skrawki mózgu ludzkiego i umieszczano na szkiełku mikroskopowym (Ryc. 5A i 5B). Z jednego wycinano wybrane obszary mózgu do analizy pierwiastkowej a drugi skrawek mózgu poddawano procesowi wybarwienia. Badania prowadzono z wykorzystaniem metody ICP-MS z laserowym systemem mikropróbkiowania (ablacją) (LA, *laser ablation*). Analiza wzbogaconych analitami tkanek mózgu pozwoliła na oznaczenie ilościowe pierwiastków. W toku analiz wykazano zróżnicowane rozmieszczenie cynku i miedzi w badanych obszarach mózgu ludzkiego. W przypadku ołowiu, pierwiastek ten był równomiernie rozmieszczony we wszystkich badanych regionach i występował w znacznie niższym stężeniu, niż cynk i miedź. Ponadto stwierdzono, że niektóre obszary hipokampu cechowały się wyższymi stężeniami cynku, miedzi i ołowiu w porównaniu do pozostałych części mózgu poddanych analizie (Ryc. 5C).



Ryc. 5. **A** - skrawek mózgu ludzkiego z zaznaczonymi obszarami, które przeznaczono do analizy pierwiastkowej: 1. *insular cortex*, 2. *central sulcus*, 3. *precentral sulcus*, 4. *hippocampus*; **B** – sąsiadujący, wybarwiony skrawek mózgu; **C** - wyniki analiz: wybarwione cztery obszary mózgu ludzkiego (1-4) i rozmieszczenie/stężenie w nich cynku, miedzi i ołowiu. Pb* - w przypadku ołowiu, skala jego stężenia sięgała do 0,5 µg/g.

Autorka zaprojektowała również program, który umożliwił opracowanie aplikacji do wyznaczenie uśrednionego stężenia oznaczanych metali w podregionach danego obszaru mózgu (przykład, Ryc. 6).

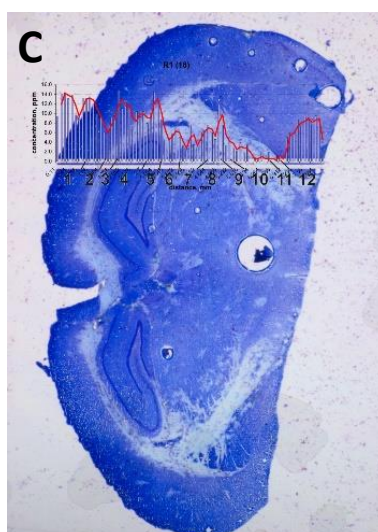
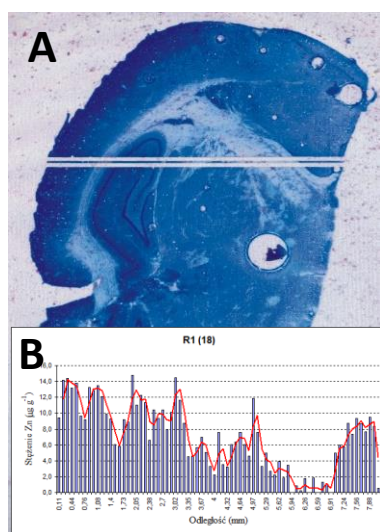


Ryc. 6. Po lewej stronie zaznaczone podobszary regionu hipokampa, po prawej wyznaczone w nich średnie stężenia cynku i miedzi.

Należy wspomnieć, że w trakcie tych badań po raz pierwszy zostało oszacowane stężenie ołowiu, miedzi i cynku w wybranych podobszarach mózgu ludzkiego.

Wyniki badań zostały zamieszczone w publikacji **P8** (załącznik 4, pkt II.4) i przedstawione na konferencji międzynarodowej – załącznik 4, pkt II. 7, pozycja 9.

2. Określono dystrybucję i stężenie cynku oraz miedzi w wybranych obszarach mózgu szczurzego na podstawie zarejestrowanych sygnałów analitycznych wzdłuż jednej linii ablacji materiału biologicznego (wybrane wyniki analiz, Ryc. 7). Badania prowadzono z wykorzystaniem metody LA-ICP-MS. Czas analizy wynosił zaledwie ok. 8 minut. W toku analiz zaobserwowano różny stopień kumulowania się oznaczanych pierwiastków w poszczególnych regionach mózgu szczurzego. Na Ryc. 7 przedstawiono przykładowe wyniki pomiarów.



Regiony przez które przeprowadzono linię ablacji:

- 1 = warstwa przednia ziarnista (*supragranular*)
- 2 = warstwa tylna ziarnista (*infragranular*)
- 3 = warstwa tylna ziarnista (*infragranular layers*)
- Hipokamp (*hippocampus*), z obszarami:
- 4 = CA1 = Rróg Ammona (*Cornu ammonis*), pierwszy obszar
- 4 = CA3 = Rróg Ammona, trzeci obszar
- 6 = fimbria, istota biała
- 7 = ciało kolankowate (*corpus geniculatum*)
- 8 = wzgórze wzrokowe (*thalamus*)
- 9 = jądro tworzącego siatkowego (*thalamus, reticular nucleus*)
- 10 = jądro podwzgórzowe (*subthalamic nucleus*)

Ryc. 7. Zdjęcie **A** przedstawia wybarwiony preparat mózgu szczurzego wraz z widoczną linią ablacji. Wykres **B** pokazuje stężenie miedzi zmierzone wzdłuż linii ablacji. Na zdjęciu **C** widoczne jest rozmieszczenie cynku w poszczególnych obszarach mózgu szczurzego.

Wyniki badań zostały przedstawione na konferencji międzynarodowej – załącznik 4, pkt II.7, pozycja 6.

Do zalet opracowanego postępowania analitycznego (badanie 1 i 2) z wykorzystaniem techniki LA-ICP-MS, należy niewielkie zużycie materiału biologicznego i bezpośrednia analiza próbki umieszczonej na szkle mikroskopowym, co znacząco ogranicza zużycie odczynników chemicznych oraz możliwość kontaminacji próbki.

3. Określono poziomy stężenie fizjologicznych manganu, miedzi, cynku, żelaza, magnezu i ołowiu w pięciu obszarach mózgu szczurzego: hipokampu (*hippocampus*), jąder podstawy mózgu (*nuclei basales*), wzgórza (*thalamus*) oraz mózdzku (*cerebellum*) a także warstwie kory mózgowej (*cortex cerebi*). Tkanki wyselekcjonowanych do badań obszarów mózgu szczurzego były mineralizowane, a następnie oznaczano w nich wymienione wyżej

pierwiastki z wykorzystaniem techniki ICP-MS. W toku analiz zaobserwowano między innymi, że stężenie manganu (2,0-2,2 µg/g) było najmniej zróżnicowane w badanych obszarach mózgu, w przeciwieństwie do żelaza (49 -103 µg/g) i cynku (29 – 85 µg/g). Ponadto, z wyjątkiem żelaza, najmniejsze stężenie oznaczanych pierwiastków odnotowano we wzgórzu. W przypadku żelaza był to obszar jąder podstawy mózgu (*nuclei basales*). Najwyższe stężenie cynku i manganu wyznaczono w obszarze kory mózgowej (*cortex cerebi*), miedzi w obszarze jąder podstawy mózgu (*nuclei basales*) a dla żelaza w mózdzku (*cerebellum*).

Wyniki badań zostały przedstawione na konferencji międzynarodowej – załącznik 4, pkt II.7, pozycja 6.

Należy wspomnieć, że z chwilą podjęcia badań było niewiele prac poświęconych wyznaczeniu stężeń wybranych metali w konkretnych obszarach mózgu szczurzego. W przypadku ołowiu były to pierwsze tego typu analizy.

Mój udział w przedstawionych badaniach (1-3), stanowiło opracowanie koncepcji analiz, optymalizacja warunków pomiarowych, walidacja metod, wykonanie wszystkich analiz, opracowanie otrzymanych wyników, udział w opracowaniu aplikacji do wizualizacji wyników badań. Zaprezentowane wyniki badań, stanowiące drugie osiągnięcie naukowe wnoszą znaczący wkład w rozwój dyscypliny – nauki farmaceutyczne, gdyż:

- dzięki wprowadzaniu zaawansowanych metod analitycznych można określić dystrybucję biopierwiastków w różnych strukturach mózgu. Prezentowaną metodę charakteryzuje stosunkowo niska granica oznaczalności, co pozwala oznaczyć cynk, miedź i ołów na poziomie fizjologicznych stężeń w tkankach mózgu,
- opracowane metody pozwalają na oznaczanie pierwiastków w niewielkiej ilości materiału biologicznego (skrawki 20 µm), co było do tej pory istotnym ograniczeniem w badaniach neurofarmakologicznych z powodu niewielkiej ilości materiału biologicznego (tkanki, płyn mózgowo-rdzeniowy), który można pozyskać w trakcie badań laboratoryjnych,
- dzięki wprowadzonym metodom można określać eksperymentalnie wpływ różnych form podawania biopierwiastków na rozwój procesów chorobowych czy też modyfikacji diety, co ma istotne znaczenie dla rozwoju dziedziny farmacji, w tym obszarów: bromatologia, farmakologia i farmakoterapia,

- wprowadzone metody są bardzo ekonomiczne, zużycie odczynników chemicznych jest niewielkie, także ilość wytwarzanych odpadów jest znikoma, co wpisuje się doskonale w trend zielonej chemii.

Opis pozostałej, istotnej aktywności naukowej:

- Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk chemicznych.

W okresie do uzyskania tytułu doktora dorobek naukowy autorki obejmował:

- 9 oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach zagranicznych,
- 1 oryginalny artykuł naukowy opublikowany w recenzowanym czasopiśmie polskim,
- 1 rozdział w książce,
- 15 zjazdów naukowych: krajowych - 5; międzynarodowych - 9.

Suma IF za ten okres to 20,004, zaś wartość punktów MEiN: 169, liczba cytowań: 653.

Przed uzyskaniem stopnia doktora, **oprócz** badań prowadzonych w ramach realizacji projektu doktorskiego, brałam czynny udział w innych projektach badawczych prowadzonych w:

- Centrum Naukowo-Badawczym *Forschungszentrum Jülich* (**Juelich, Niemcy**), w Zentralabteilung für Chemische Analysen (ZCH) pod opieką dr hab. J. Sabine Becker. Badania były realizowane od października 2005 roku do lutego 2007 roku. Moja aktywność naukowa skupiała się na udziale w opracowywaniu metod z wykorzystaniem spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie z laserowym systemem mikropróbkiowania (ablacja) (LA ICP-MS, z ang. *laser ablation inductively coupled with plasma mass spectrometry*) do pierwiastkowej analizy próbek biologicznych.

Kierunkami badań były:

- zastosowanie metody LA-ICP-MS do badania dystrybucji selenu, węgla i wybranych metali w przekrojach podłużnych (grubość 100 µm) organizmów ślimaków z rodzaju *Arion*. Stwierdzono m.in. niejednorodny rozkład selenu, węgla, cynku i miedzi w organizmach ślimaków. Najwyższe stężenie miedzi zaobserwowano w sercu i błonie śluzowej skóry brzusznej, cynku w przewodzie pokarmowym i skórze grzbietowej a selenu w przewodzie pokarmowym i nerkach. Była to pierwsza praca opublikowana na świecie, w której przedstawiono wykorzystanie techniki LA-ICP-MS, do określenia

dystrybucji wybranych metali, węgla i selenu w całym organizmie zwierzęcym. Opisane badania zostały przedstawione w publikacji **P3** (załącznik 4, pkt II.4),

- adaptacja metody NF-LA-ICP-MS (NF, bliskiego pola, z ang. *near-field*) do oznaczania pierwiastków w próbkach o powierzchni wyrażonej w skali nanometrów np. na żelach 2D i próbkach biologicznych. Taka metoda daje możliwość badania dystrybucji pierwiastków np. w pojedynczych komórkach czy organellach komórkowych. Opisane badania zostały przedstawione w publikacji **P6** (załącznik 4, pkt II.4),

- zastosowanie metody LA-ICP-MS do badań proteomicznych mózgu, w których mieszanina białek charakterystycznych dla uprzednio wybranego regionu mózgu ludzkiego była rozdzielona z wykorzystaniem dwuwymiarowej elektroforezy żelowej. W powstałych plamkach oznaczono miedź, cynk oraz fosfor (siarkę wykorzystano jako wzorzec wewnętrzny) metodą LA-ICP-MS. Białka zidentyfikowano za pomocą techniki MALDI-FTICR-MS. Przeprowadzone badania pozwoliły na wyznaczenie stężeń miedzi, cynku i fosforu w strukturze różnych białek budujących mózg ludzki. Opisane badania zostały przedstawione w publikacjach **P4** i **P5** (załącznik 4, pkt II.4),

- adaptacja metody LA-ICP-MS do potrzeb badań geofizycznych, w szczególności do datowania prekambryjskiej cyrkonii ($ZrSiO_4$), pozyskanej z tarczy bałtyckiej. W pojedynczym „ziarnie” cyrkonii zbadana została dystrybucja i stężenie izotopów uranu oraz ołowiu, dzięki czemu oszacowano wiek tych minerałów wykorzystując metodę uranowo-ołowiową. Opisane badania zostały przedstawione w publikacji **P7** (załącznik 4, pkt II.4).

Wyniki wyżej opisanych badań zostały również zaprezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych (załącznik 4, pkt II.7, pozycje: 7, 8, 11 i 12).

- Zakładzie Chemii Sądowej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Moja aktywność skupiała się na rozwijaniu metody atomowej spektrometrii fluorescencyjnej połączonej z generacją wodorków (HG-ASF, z ang. *hydride generation atomic fluorescence spectrometry*). Metoda ta została wykorzystana między innymi do oznaczania selenu w guzach tarczycy pacjentów oddziału Chirurgii Ogólnej, Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Opisane badania zostały przedstawione w publikacji **P10** (załącznik 4, pkt II.4).

- Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk chemicznych

W okresie po uzyskaniu tytułu doktora mój dorobek naukowy obejmował (z wyłączeniem artykułów stanowiących cykl habilitacyjny):

- 9 oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach polskich,
- 16 oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach zagranicznych,
- 28 zjazdów naukowych: krajowych - 22; międzynarodowych - 6.

Suma IF za ten okres to 50,468, zaś wartość punktów MEiN: 1059, liczba cytowań: 300

Po uzyskaniu stopnia doktora, równolegle do badań przedstawionych w ramach rozprawy habilitacyjnej, podjęłam współpracę z następującymi ośrodkami badawczymi:

- Zespołem Analiz Sądowych i Klinicznych Zakładu Chemii Analitycznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Współpraca z dr hab. Michałem Woźniakiewiczem, prof. UJ, polega na udziale w opracowaniu procedur analitycznych - przygotowanie próbek do pomiaru (m.in. optymalizacja parametrów derywatyzacji analitów) oraz dobór parametrów pomiarowych do oznaczania wybranych oligosacharydów w mleku kobiecym, z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej sprzężonej z detektorem laserowo wzbudzonej fluorescencji (CE-LIF, z ang. *capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection*) lub sprzężonej ze spektrometrem mas (CE-MS, z ang. *capillary electrophoresis-mass spectrometry*). Efektem tej współpracy jest współudział w doniesieniach naukowych na konferencjach międzynarodowych (załącznik 4, pkt II.7, pozycje: 39 i 41). Dzięki realizacji wspólnego projektu, dotyczącego roli oligosacharydów w prawidłowym rozwoju noworodków i niemowląt, powierzono mi funkcje:
 - oficjalnego opiekuna naukowego dwóch prac magisterskich o tytułach:
 - „Opracowanie metody oznaczania oligosacharydów w mleku kobiecym”, Kraków 2020 r.
 - „Opracowanie metody przygotowania próbek mleka ludzkiego do oznaczania oligosacharydów techniką elektroforezy kapilarnej z detektorem wzbudzonej laserowo fluorescencji”, Kraków 2021 r.

- promotora pomocniczego w realizowanym przewodzie doktorskim pt. „Zastosowanie technik separacyjnych, technik sprzężonych i mikroskopii FTIR w badaniu sposobu żywienia i chorób przewodu pokarmowego niemowląt i ludzi dorosłych”.

Współpraca naukowa trwa od 2004 roku do chwili obecnej.

- Zespołem Analiz Toksykologicznych i Farmaceutycznych, Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Współpraca z zespołem prof. dr hab. n. med. Wojciecha Piekoszewskiego dotyczyła opracowania procedury przygotowania próbki do pomiaru i kalibracji metody obrazowania dystrybucji cynku i magnezu w tkance mózgowej szczurów z wykorzystaniem metody LA-ICP-TOF-MS (z ang. *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Time of Flight Mass Spectrometry*). Wykonywałam analizy chemiczne. Efektem tej współpracy jest publikacja **P20** (załącznik 4, pkt II.4). Współpraca rozpoczęła się w 2009 roku i zakończyła w 2014 roku.
- Katedrą Farmakognozji, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Współpraca z dr hab. Agnieszką Galanty dotyczyła:
 - analizy suplementów diety zawierających kofeinę, stosowanych wspomagająco w odchudzaniu (oznaczałam jod w tych preparatach),
 - analizy chemicznej owoców południowo-syberyjskich,
 - analizy pierwiastkowej kielków różnych odmian roślin jadalnych w toku której wybrano te, które mogą stanowić dobre źródło niezbędnych dla organizmu człowieka składników mineralnych.Efektem tej współpracy są odpowiednio publikacje: **P11**, **P33** i **P34** (załącznik 4, pkt II.4). Współpraca naukowa trwa od 2011 roku do chwili obecnej.
- Katedrą Ogrodnictwa, Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Współpraca z zespołem dr hab. inż. Macieja Gąstoła, prof. URK, skupia się na:
 - oznaczaniu wybranych składników chemicznych w sokach z jabłek różnych odmian jabłoni i derenia jadalnego,
 - analizie sensorycznej i chemicznej win wyprodukowanych w stacji doświadczalnej UR w Garlicy Murowanej.

Efektem tej współpracy są publikacje: **P13**, **P19** i **P21** (załącznik 4, pkt II.4) a także współudział w doniesieniu konferencyjnym krajowym (załącznik 4, pkt II.7, pozycja: 18). Współpraca rozpoczęła się w 2012 roku i trwa do chwili obecnej.

- Instytutem Produkcji Ogrodniczej, Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Celem współpracy z zespołem dr hab. Magdaleny Kapłań było przeprowadzenie analiz określających wpływ sposobu prowadzenia winorośli odmian „Rondo” oraz „Jutrzenka” na stężenie wybranych kwasów organicznych w sokach pozyskanych z ich owoców. Aktywność naukowa autorki polegała na przeprowadzeniu powyższych analiz chemicznych. Efektem tej współpracy są publikacje: **P16** i **P17** (załącznik 4, pkt II.4) a także współudział w doniesieniu konferencyjnym krajowym (załącznik 4, pkt II.7, pozycja 23). Współpraca trwała w okresie od 2013 roku do 2014 roku.
- Katedrą Gastroenterologii i Hepatologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Współpraca z zespołem prof. dr hab. med. Małgorzaty Zwolińskiej-Wcisło koncentruje się na poszukiwaniu zależności pomiędzy stężeniem krótkołańcuchowych kwasów organicznych w kale i cytokinami pro- i przeciwzapalnymi w surowicy, stanem odżywiania, rodzajem stosowanej diety, parametrami antropometrycznymi oraz stopniem aktywności choroby u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit (choroba Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego). Opracowałam procedury oznaczania krótkołańcuchowych kwasów organicznych w kale pacjentów. Efektem tej współpracy są publikacje: **P28, P29, P30, P31, P32** (załącznik 4, pkt II.4) a także współudział w doniesieniach konferencyjnych krajowych i zagranicznych (załącznik 4, pkt II.7, pozycje: 32, 34, 35, 36, 38, 40). Współpraca rozpoczęła się w 2015 roku i trwa do chwili obecnej.
- Katedrą Inżynierii i Technologii Procesów Chemicznych, Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej. Współpraca z dr hab. Agnieszką Saeid dotyczy opracowania metody odzysku fosforu z surowców wtórnych - takich jak popioły, kości czy ości, z wykorzystaniem solubilizacji mikrobiologicznej. Mikroorganizmy (bakterie z rodzaju *Bacillus*), m.in. poprzez produkcję krótkołańcuchowych kwasów organicznych, wywołują rozpad masy odpadowej, uwalniając dostępną dla roślin postać fosforu. Moja aktywność naukowa była związana z wyznaczeniem profilu i stężeń krótkołańcuchowych kwasów organicznych w zawiesinach bakteryjnych z wykorzystaniem metod izotachoforezy kapilarnej (ITP) oraz HPLC. Efektem tej współpracy są publikacje: **P23** i **P26** (załącznik 4, pkt II.4). Współpraca rozpoczęła się w 2015 roku i trwa do chwili obecnej.

- Katedrą i Zakładem Leczenia Otyłości, Zaburzeń Metabolicznych oraz Dietetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Współpraca z dr hab. n. med. Marta Stelmach-Mardas związana była z przeprowadzeniem przeglądu systematycznego dotyczącego określenia zależności pomiędzy gęstością energetyczną pożywienia a zmianami masy ciała u osób otyłych. Efektem tej współpracy jest publikacja **P24** (załącznik 4, pkt II.4). Współpraca rozpoczęła się w 2015 roku i zakończyła w 2016 roku.
- Oddziałem Chirurgii Szczękowo-Twarzowej, Szpitala Rydygiera w Krakowie. Współpraca z dr hab. Mariuszem Szutą polegała na udziale w projekcie dotyczącym wpływu żywienia dojelitowego wzbogaconego selenem na proces gojenia się ran u pacjentów po zabiegach chirurgicznych w obrębie jamy ustnej. Współpraca rozpoczęła się w 2021 roku i trwa do chwili obecnej.
- Katedrą Ginekologii i Położnictwa, Wydziału Lekarskiego Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum. Współpraca z prof. dr hab. n. med. Hubertem Hurasem (Oddział Kliniczny Położnictwa i Perinatologii) i prof. dr hab. n. med. Ryszardem Lauterbachem (Oddział Kliniczny Neonatologii). Jestem pomysłodawcą, koordynatorem oraz częściowo wykonawcą badań, prowadzonych w kierunku oceny zależności pomiędzy profilem oligosacharydów i florą bakteryjną mleka kobiecego a mikroflorą kałową niemowląt karmionych tym mlekiem, krótkołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi, kwasem mlekowym i bursztynowym, będącymi produktami jej aktywności oraz pochodnymi indolowymi. W projekt zaangażowane są następujące ośrodki naukowe:
 - Katedra Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Współpraca z zespołem prof. dr hab. n. med. Waldemara Turskiego. Badania są poświęcone oznaczaniu pochodnych indolowych w próbkach smółek i kału.
 - Pracownia Biobank, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, Współpraca z zespołem dr Dominika Strapagiela, prof. UŁ. Badania są poświęcone florze bakteryjnej mleka i kału.
- Zakładem Badań nad Żywieniem i Lekami, Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Od 2022 roku podjęłam współpracę z dr Pawłem Jagielskim polegającą na oznaczeniu krótkołańcuchowych kwasów organicznych w kale osób będących na diecie wegańskiej oraz tradycyjnej.

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ.

6.1. OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE.

Prowadzenie zajęć dydaktycznych z następujących przedmiotów w ramach kształcenia przeddyplomowego:

- *Chemia analityczna I* (laboratoria chemiczne), dla studentów I rok kierunku Chemia, Wydział Chemii UJ (do 2009 roku),
- *Chemia analityczna II* (laboratoria chemiczne), dla studentów IV rok kierunku Chemia, Wydział Chemii UJ (do 2009 roku),
- *Bromatologia (ćwiczenia i seminaria)* dla studentów IV roku kierunku Farmacja,
- *Dietetyka – Zasady żywieniowe wybranych jednostkach chorobowych (ćwiczenia PBL)* – przedmiot fakultatywny dla studentów IV roku kierunku Farmacja,
- *Analiza środków spożywczych (ćwiczenia i seminaria)* dla studentów II roku kierunku Analityka Medyczna,
- *Analiza i ocena jakości żywności (ćwiczenia)* dla studentów II roku kierunku Dietetyka na Wydziale Lekarskim UJ CM,
- *Interakcje leku z pożywieniem - aspekty kliniczne (ćwiczenia)* dla studentów studiów drugiego stopnia kierunku Dietetyka na Wydziale Lekarskim UJ CM,
- *Poprawa jakości życia w oparciu o nowe odkrycia z chronobiologii* – przedmiot fakultatywny dla studentów studiów pierwszego stopnia kierunku Dietetyka na Wydziale Lekarskim UJ CM,
- *Etnodietetyka* – przedmiot fakultatywny dla studentów studiów pierwszego stopnia kierunku Dietetyka na Wydziale Lekarskim UJ CM.

Prowadzenie zajęć dydaktycznych z następujących przedmiotów w ramach kształcenia podyplomowego:

- *Interakcje leku z pożywieniem – aspekty kliniczne* dla studentów III roku Szkoły Doktorskiej Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu UJCM,
- *Zdrowotne aspekty wina i Chemia wina* (wykłady i ćwiczenia) dla słuchaczy studiów podyplomowych – Enologia, Ośrodek ds. kształcenia podyplomowego na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM,

- zajęcia stażowe z zakresu nowoczesnych technik separacyjnych wykorzystywanych do *analizy żywności*, dla uczestników specjalizacji z Analityki Farmaceutycznej dla farmaceutów, Ośrodek ds. kształcenia podyplomowego na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM.

Udział w opracowaniu programu i sylabusów do przedmiotów:

- *Analiza środków spożywczych* dla studentów II roku kierunku Analityka Medyczna, Wydział Farmaceutyczny UJ CM,
- *Analiza i ocena jakości żywności* dla studentów II roku kierunku Dietetyka, Wydział Lekarski UJ CM,
- *Chemia wina oraz Zdrowe aspekty wina* dla słuchaczy studiów podyplomowych Enologia, Ośrodek ds. kształcenia podyplomowego na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM,

oraz

- współudział w tworzeniu programu kształcenia i sylabusów do kursów weekendowych (w ramach kształcenia podyplomowego): Wino w aspekcie żywieniowym, zdrowotnym i kulturowym oraz Chemiczno-sensoryczna analiza wina,
- przygotowanie oraz aktualizacja sylabusów przedmiotów realizowanych w Zakładzie Bromatologii UJ CM dla studentów Wydziału Farmaceutycznego (od 2013 do chwili obecnej),
- wprowadzanie nowych metod dydaktycznych (nauka w kontekście, case study, PBL) do modułów przedmiotowych realizowanych przez Zakład Bromatologii UJ CM. Metoda „nauki w kontekście” została przedstawiona na konferencji międzynarodowej (załącznik 4: pozycja 38),
- wprowadzenie nowych ćwiczeń laboratoryjnych, przygotowanych od podstaw wraz z materiałami dla studentów w ramach ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotów Bromatologia, Analiza i ocena jakości żywności oraz Analiza środków spożywczych.

Przeprowadzenie szkoleń:

- prowadzenie wykładów i warsztatów w języku angielskim ze studentami studiów licencjackich, magisterskich i doktoranckich oraz dla pracowników naukowych w

ramach wyjazdu dydaktycznego w maju 2022 r., Uniwersytet w Aveiro, Portugalia (program Erasmus+),

- prowadzenie kursów szkoleniowych nt. metod dydaktycznych stosowanych podczas zajęć z interakcji leków z pożywieniem dla pracowników innych Katedr i Zakładów Bromatologii (Warszawa, Sosnowiec, Białystok), Wydział Farmaceutyczny UJ CM, 2013 r.

Sprawowanie opieki nad studentami i doktorantami:

- promotor prac magisterskich studentów kierunków farmacja i kosmetologia, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum UJ, od 2009 roku: a) kierunek farmacja – 11 osób, b) kierunek kosmetologia – 6 osób,
promotor jednej pracy magisterskiej studenta kierunku dietetyka, Wydział Lekarski Collegium Medicum UJ, od 2010 roku. Pełna lista tych 18 osób:

1. Barbara Filip, tytuł pracy magisterskiej: „Znaczenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w smółkach noworodków i kale dzieci”, Kraków 2022 r.,
2. Julia Betlej, tytuł pracy magisterskiej: „Czynniki wpływające na profil i stężenie oligosacharydów w mleku ludzkim”, Kraków 2021 r.,
3. Weronika Olbrycht, tytuł pracy magisterskiej: „Profil i stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w kale zdrowych osób stosujących trzy różne rodzaje diety, w warunkach symulowanej misji kosmicznej”, Kraków 2021 r.,
4. Klaudia Wirska, tytuł pracy magisterskiej: „Tatuaż a wybrane, potencjalne zagrożenia zdrowotne dla organizmu człowieka”, Kraków 2020 r.,
5. Izabela Małek, tytuł pracy magisterskiej: „Suplementy diety wspomagające płodność”, Kraków 2019 r.,
6. Patrycja Stec, tytuł pracy magisterskiej: „zastosowanie kakao w kosmetologii”, Kraków 2019 r.,
7. Sabina Chrzęszcz, tytuł pracy magisterskiej: „Walidacja metody oznaczania krótkołańcuchowych kwasów organicznych w smółce niemowląt”, Kraków 2018 r.,
8. Wioleta Piątek, tytuł pracy magisterskiej: „Analiza chemiczno-sensoryczna win wyprodukowanych na terenie Małopolski”, Kraków 2018 r.,
9. Aneta Kosowska, tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ modyfikacji diety na stężenia krótkołańcuchowych kwasów organicznych w kale szczurów”, Kraków 2016 r.,
10. Marlena Smardz, tytuł pracy magisterskiej: „Analiza chemiczna i sensoryczna win polskich, wyprodukowanych z owoców winorośli właściwej”, Kraków 2016 r.,

11. Agnieszka Sekulska, tytuł pracy magisterskiej: „Nutrikosmetyka”, Kraków 2016 r.,
12. Diana Winnicka, tytuł pracy magisterskiej: „Optymalizacja parametrów ekstrakcji krótkołańcuchowych kwasów organicznych z próbek kału”, Kraków 2015 r.,
13. Agnieszka Cetnar, tytuł pracy magisterskiej: „Oznaczanie kwasów organicznych w soku z winogron i w winie - na kolejnych etapach jego produkcji”, Kraków 2014 r.,
14. Anita Cisowska, tytuł pracy magisterskiej: „Zmiany skórne towarzyszące alergiom pokarmowym”, Kraków 2014 r.,
15. Mateusz Kwit, tytuł pracy magisterskiej: „Oznaczanie kwasów organicznych, całkowitej zawartości polifenoli i aktywności antyoksydacyjnej w miódach pitnych”, Kraków 2013 r.,
16. Dominika Sobańska, tytuł pracy magisterskiej: „Rola kwasów organicznych stosowanych w preparatach i zabiegach kosmetycznych”, Kraków 2012 r.,
17. Malwina Lis, tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ na organizm ludzki preparatów kosmetycznych zawierających filtry chroniące przed promieniowaniem UV”, Kraków 2012 r.,
18. Anna Chamielec, tytuł pracy magisterskiej: „Właściwości antyoksydacyjne i inne właściwości biochemiczne win oraz soków i napojów z winogron”, Kraków 2011 r.

- Promotor 2 prac licencjackich studentów kierunku dietetyka, Wydział Lekarski Collegium Medicum UJ:

1. Ewelina Cichocka, tytuł pracy licencjackiej: „Barwniki stosowane w żywności – korzyści i zagrożenia”, Kraków 2019 r.,
2. Weronika Olbrycht, tytuł pracy licencjackiej: „Rola kwasu foliowego w organizmie człowieka w świetle najnowszych badań naukowych”, Kraków 2019 r.

- Obecnie, promotor pomocniczy w 2 wszczętych przewodach doktorskich:

1. mgr Marcelina Rusin, tytuł rozprawy doktorskiej: „*Zastosowanie technik separacyjnych, technik sprzężonych i mikroskopii FTIR w badaniu żywienia i chorób przewodu pokarmowego niemowląt i ludzi dorosłych*”. Promotor: dr hab. Michał Woźniakiewicz, prof. UJ, wszczęcie przewodu doktorskiego: Kraków 2020 r., Szkoła Doktorskiej Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu UJCM,
2. mgr Magdalena Górecka, tytuł rozprawy doktorskiej: „*Analiza wpływu cukrzycy ciążowej na profil mikrobiologiczny siary i mleka oraz smółki i kału noworodków z ciąż donoszonych w populacji polskiej*” Promotor: prof. dr hab. n. med. Hubert Huras, wszczęcie przewodu doktorskiego: Kraków 2022 r., Szkoła Doktorskiej Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu UJCM.

- Recenzent 11 prac magisterskich.
- Koordynator prac badawczych studentów zrzeszonych w Kole Naukowym przy Zakładzie Bromatologii UJ CM. Efektem tej aktywności było przygotowanie wraz z studentami komunikatu przedstawionego na międzynarodowej konferencji naukowej Studentów Uczelni Medycznych: Tomasz Władysław Rządca, Anna Gwizdak, Karolina Wojton, **Justyna Dobrowolska-Iwanek tutor**. Determination of organic acids in alcoholic beverages (development of methodology), Międzynarodowa Konferencja Naukowa Studentów Uczelni Medycznych, Kraków, 10-12 kwietnia 2014 r.
- Organizator zwiedzania nowoczesnych, komercyjnych laboratoriów biotechnologicznych (firma Selvita) oraz prezentacji zaawansowanych technik badawczych (firma Shim-pol) dla studentów II roku kierunku Analityka Medyczna, Kraków 2019 r.

6.2. OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE

Konferencje i konkursy naukowe:

- członek komisji oceniającej prezentacje studentów w ramach konferencji szkoleniowej: „GIEŁDA PRAC”, Wydział Chemii UJ, Kraków 2 - 3 czerwca 2009 r.,
- organizator z ramienia Wydziału Farmaceutycznego UJ CM na VI Zakopiańskich Dniach Enologicznych – pozostałe instytucje współorganizujące: Instytut Współpracy z Europą Orientalną (ICEO), Institute of Higher Studies of Vine and Wine (Montpellier, Francja), Zakopane 24-27 października 2013 r.,
- członek komitetu organizacyjnego oraz sekretarz naukowy XXIII Ogólnopolskiego Sympozjum Bromatologicznego – organizator Zakład Bromatologii UJ CM wraz z Polskim Towarzystwem Farmaceutycznym, Kraków 10-12 września 2014 r.,
- członek komisji nadzorującej przebieg konkursu wiedzy o winie (udział w opracowaniu pytań konkursowych) na Wydziale Farmaceutycznym - WIEWIQ 2020 - organizator Studenckie Koło Naukowe Enologiczne UJ CM, Kraków 27 czerwca 2020 r.,
- członek komisji naukowej oceniającej prezentacje studentów na 29th International Medical Students' Conference in Cracow - organizator Studenckie Towarzystwo Naukowe Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, kwiecień 2021 r.,
- zastępca przewodniczącego komitetu naukowego, prowadząca i moderator sesji tematycznej I Kongresu Absolwentów Enologii UJ CM, Kraków 21-24 kwietnia 2022 r.

Organizacja i opieka nad profesorami wizytującymi Wydział Farmaceutyczny UJ CM:

- udział w zorganizowaniu i przebiegu spotkania z prof. Philippo Pszczółkowskim-Tomaszewskim (University of Santiago, Chile) (2012 r.),
- udział w zorganizowaniu i przebiegu spotkania z prof. Alain Carbonneau wraz z delegacją z Uniwersytetu w Montpellier (2013 r.),
- udział w opiece nad prof. Isabel Saraiva de Carvalho (University of Algarve, Portugalia) – visiting professor w Zakładzie Bromatologii UJ CM (2014 r.),
- udział w zorganizowaniu i przebiegu spotkania z Prof. Ken-ichi Yoshida (Kobe University, Japonia) - visiting professor w Zakładzie Bromatologii UJ CM (2017 r.).

6.3. OSIĄGNIĘCIA POPULARYZUJĄCE NAUKĘ

- Współudział w zorganizowaniu stoiska Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, czynny udział w Festiwalach Nauki, Kraków 2010 – 2015 r.
- Przeprowadzenie wykładów w ramach spotkań naukowych Polskiego Towarzystwa Dietetyki zatytułowanych „*Dodatki do żywności*” oraz „*Żywienie w chorobie refluksowej oraz chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy*”.
- Przeprowadzenie wykładu dla studentów Koła Naukowego Akademii Górniczo-Hutniczej dotyczącego stosowanych dodatków do żywności.
- Zorganizowanie, pozyskanie środków, koordynowanie oraz udział w prowadzeniu wykładów w ramach „*Praktycznego kursu wiedzy o żywieniu i suplementacji kobiet w okresie ciąży, laktacji oraz dzieci do lat 3*”, Wydział Farmaceutyczny UJ CM, Kraków 7-9 grudnia 2018.
- Zorganizowanie warsztatów dla kobiet w ciąży, w ramach projektu *Świadoma Mama*, dotyczących prawidłowego odżywiania kobiet w ciąży, Kraków 2019 r.
- Redagowanie broszury informacyjnej „*Moje dziecko zaczyna jeść. Kompendium wiedzy o rozszerzaniu diety niemowląt*” powstałej podczas realizacji zadania badawczego dotyczącego analizy smółki noworodków i mleka ich matek. Kraków 2020 r.
- Zorganizowanie stoiska Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, czynny udział w VIII, X i XI Edycji „*Święta Rodziny Krakowskiej*” – organizator Urząd Miasta Krakowa, Kraków 2019 oraz 2022 r.
- Przeprowadzenie warsztatów dla dzieci z przedszkola „Niezapominajka” w Krakowie na temat piramidy żywienia, zdrowych nawyków żywieniowych (2022 r.).

- Współautor artykułu popularnonaukowego dla portalu „Świadoma Mama” zatytułowany „*Zalecenia żywieniowe dotyczące podstawowych składników odżywczych dla kobiet w okresie ciąży*” <https://swiadamamama.pl/2019/04/05/zalecenia-zywieniowe-dotyczace-podstawowych-skladnikow-odzywczych-dla-kobiet-w-okresie-ciazy/> (data dostępu 25.03.2023).
- Zorganizowanie i udział w realizacji mini-wywiadu z ekspertem na temat interakcji leków z pożywieniem, wirtualny dzień otwarty UJ na Wydziale Farmaceutycznym, Kraków 26 marca 2022, <https://www.youtube.com/watch?v=Sqf6OM8Ji1A#menu>.

7. OPRÓCZ KWESTII WYMIENIONYCH W PKT. 1-6, WNIOSKODAWCA MOŻE PODAĆ INNE INFORMACJE, WAŻNE Z JEGO PUNKTU WIDZENIA, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ.

Współpraca z innymi jednostkami naukowymi została opisana w rozdziale 5.

Udział w kursach i szkoleniach podnoszących kompetencje dydaktyczne:

- warsztaty dydaktyczne Ars Docendii „Podstawy dydaktyki akademickiej”, Kraków 2013/2014 r. (29 h),
- konferencja Ars Docendii „Rozwijanie wybranych kwalifikacji zawodowych nauczycieli i doktorantów”, Kraków 2014 r.,
- szkolenie zorganizowane przez PWN „Jak interpretować prawo autorskie na uczelni”, Kraków 2014 r.,
- warsztaty dydaktyczne Ars Docendii „Sztuka komunikacji”, Kraków 2016 r. (15 h),
- warsztaty dydaktyczne Ars Docendii „Sceniczne techniki prowadzenia wykładów”, Kraków 2016 r. (10 h),
- kurs dydaktyczny Ars Docendii „Tworzenie sylabusów”, Kraków 2018 r. (15 h),
- warsztaty „Jak bez stresu przeprowadzić egzaminy zdalne na platformie Pegaz (system BigBlueButton)”, Kraków 2020 r. (3 h).

Udział w kursach i szkoleniach podnoszących kompetencje naukowe:

- zaawansowany kurs technik elektroforetycznych ze szczególnym uwzględnieniem izotachoforezy kapilarnej. Spišská Nová Ves, Słowacja 23 - 25 maja 2011 r.,
- szkolenie w ramach projektu ZintegrUJ „Prawo autorskie w działalności naukowej i dydaktycznej”, Kraków 2019 r. (6h),
- szkolenie realizowane przez StatSoft Polska, „Zastosowanie statystyki i Statistica w opracowaniu wyników empirycznych – kurs podstawowy”, Kraków 2018 r. (17 h),
- warsztaty z oprogramowania LabSolution (tworzenie metod analitycznych i obliczeniowych) przeprowadzone przez firmę Shim-Pol, Kraków 2017 r.,

- szkolenie zorganizowane przez PWN „Jak z sukcesem przygotować wniosek o grant”, Kraków 2015 r.

Nagrody i wyróżnienia:

- stypendium naukowe dla najlepszego doktoranta, Wydział Chemii UJ; 2008 r.,
- nagroda zespołowa Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za osiągnięcia naukowe; 2009 r.,
- nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego za osiągnięcia naukowe; 2015,
- nagroda zespołowa od studentów dietetyki WL CMUJ dla najlepszej jednostki dydaktycznej; 2018 i 2022,
- nagroda zespołowa Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za osiągnięcia dydaktyczne – III stopnia; 2021.

.....

(podpis wnioskodawcy)