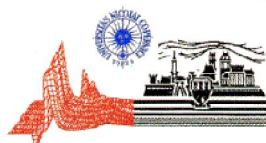


Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalizy

***Nowe podejście do chromatograficznej
analizy związków budujących kwasy
nukleinowe***

dr Sylwia Studzińska
Autoreferat



Toruń, 2015

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

1. Imię i nazwisko

Sylwia Kinga Studzińska (z domu: Kowalska)

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2002 – licencjat chemii, specjalność – chemia środowiska; tytuł pracy dyplomowej: *Teoria chromatografii. Procesy transportu membranowego*, promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski

2004 – magister chemii, specjalność – chemia środowiska; tytuł pracy dyplomowej: *Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie związków biologicznie aktywnych*, promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski

2009 – doktor nauk chemicznych w dziedzinie chemii; tytuł rozprawy doktorskiej: *Oznaczanie cieczy jonowych w próbkach biologicznych i środowiskowych za pomocą łączonych technik chromatograficznych*, promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1 października 2004 – 31 stycznia 2009 – doktorant w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydziału Chemii UMK w Toruniu

1 marca 2009 – 30 września 2010 – pracownik naukowo-techniczny w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydziału Chemii UMK w Toruniu

1 października 2010 – 31 stycznia 2013 – asystent w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydziału Chemii UMK w Toruniu

1 lutego 2013 – obecnie – adiunkt w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydziału Chemii UMK w Toruniu

4. Zainteresowania naukowe

Chromatografia cieczowa, spektrometria mas, kwasy nukleinowe i ich składowe (nukleozydy, nukleotydy, oligonukleotydy), cieczy jonowe, fazy stacjonarne do technik separacyjnych, opis mechanizmu retencji

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

5.1. Tytuł osiągnięcia

Nowe podejście do chromatograficznej analizy związków budujących kwasy nukleinowe

(Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl publikacji od H1 do H8, wymienionych w Załączniku 2A, których kopie znajdują się w Załączniku 4)

5.2. Autoreferat wraz z omówieniem osiągnięcia naukowego

Wprowadzenie

W 2002 roku ukończyłam studia licencjackie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu i rozpoczęłam studia magisterskie na specjalności chemia środowiska. Praca dyplomowa, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, dotyczyła analizy nukleozydów i ich potranskrypcyjnie zmodyfikowanych pochodnych za pomocą chromatografii cieczowej. Podczas realizacji pracy magisterskiej odbyłam miesięczny staż naukowy na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Pardubicach w grupie badawczej profesora Pavla Jandery, który jest specjalistą w zakresie chromatografii cieczowej. Podczas pobytu poszerzyłam swoją wiedzę z zakresu mechanizmu retencji w chromatografii cieczowej. Tytuł magistra uzyskałam w lipcu 2004 roku. Wyniki mojej pracy prezentowałam na konferencjach międzynarodowych. Ukazały się one także drukiem w formie publikacji naukowej [1].

W tym samym roku odbyłam kolejny staż naukowy w Laboratorium Bio-Nieorganicznej Chemii Analitycznej i Środowiska w Pau (Zakład Instytutu Chemii Analitycznej, Materiałowej i Środowiska, Francuskiego Ośrodka Badań Naukowych). Miałam możliwość pracować naukowo w grupie badawczej profesora Ryszarda Łobińskiego, specjalisty w zakresie analizy specyjalnej próbek biologicznych i środowiskowych. W czasie pobytu w Pau, poza badaniami ściśle związanymi z zastosowaniem spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* – ICP MS), zapoznałam się metodami pracy z próbkami biologicznymi (krew, osocze) oraz żywności (jaja kurze).

W 2004 roku, po zdaniu egzaminów wstępnych, zostałam słuchaczką Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii UMK. W pierwszym roku studiów moja działalność naukowa związana była głównie z badaniami mechanizmu retencji związków biologicznie aktywnych w chromatografii cieczowej. Wynikiem prowadzonych badań był szereg publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym [2-7].

W 2005 roku kierunek i cel moich badań uległy zmianie, co było konsekwencją wnikliwego przeglądu literaturowego oraz obserwowanym wśród naukowców rosnącym zainteresowaniem cieczami jonowymi, które miałyby stanowić m. in. zamienniki dla lotnych rozpuszczalników organicznych [8-12]. Związki te są powszechnie stosowane w wielu dziedzinach nauki [10-12]. Stąd niezbędne okazało się wprowadzenie metod analitycznych, które umożliwiłyby szybkie i precyzyjne oznaczanie tychże soli na niskich poziomach stężeń. Ich opracowanie stało się jednym z pierwszych celów mojej pracy doktorskiej. W efekcie prowadzonych badań opracowałam metodę oznaczania cieczy jonowych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), która stała się przedmiotem publikacji naukowej [13]. Jest to jedna z pierwszych prac na świecie poświęcona temu tematowi. Badania chromatograficzne rozszerzyłam celem pełnego poznania i określenia mechanizmu retencji kationów cieczy jonowych w chromatografii cieczowej, co stanowiło nowość na skalę światową. Z tego zakresu opublikowano dotychczas trzy prace, których jestem współautorką [14-16].

Obserwowana rosnąca ilość zastosowań cieczy jonowych stwarza zagrożenie ich szybkiego rozpowszechniania się i zarazem kumulacji w środowisku wodnym jak i glebowym. Konieczne zatem stało się zbadanie ich wpływu na środowisko. W czasie

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

kilkunastu miesięcy przeprowadziłam systematyczne badania kinetyki sorpcji oraz transportu trzech kationów imidazoliowych (różniących się długością łańcucha alkilowego w pierścieniu imidazoliowym) na pięciu typach gleb (o różnej zawartości całkowitego węgla organicznego). Uzyskane wyniki pozwoliły na kompleksowe poznanie mechanizmu rozprzestrzeniania się imidazoliowych cieczy jonowych w glebie. Procesy te bowiem uzależnione są od zawartości całkowitego węgla organicznego oraz lipofilowości analizowanych jonów. Efektywność procesu sorpcji rośnie ze wzrostem ilości materii organicznej w glebie oraz długości łańcucha alkilowego w pierścieniu imidazoliowym, podczas gdy odwrotne tendencje obserwowano w przypadku desorpcji i wymywania z gleb [17,18].

W trakcie realizacji badań nad cieczami jonowymi i ich wpływem na środowisko, w 2006 roku odbyłam trzymiesięczny staż naukowy na Wydziale Farmacji Uniwersytetu w Zagrzebiu. Współpraca z tym ośrodkiem zaowocowała licznymi pomysłami badawczymi, a przede wszystkim testami nad toksycznym potencjałem cieczy jonowych względem rzeżuchy ogrodowej *Lepidium sativum* L. Eksperymenty te kontynuowałam i rozszerzyłam ich zakres po powrocie do Torunia. Początkowo określono toksyczność wodnych roztworów imidazoliowych cieczy jonowych względem kiełków rzeżuchy. Następnie eksperymenty prowadzono w środowisku glebowym na pięciu typach gleb, stosowanych wcześniej do badania sorpcji i transportu. Uzyskane wyniki dowiodły, iż chlorki imidazoliowych cieczy jonowych są toksyczne dla rzeżuchy *Lepidium sativum* L., przy czym wielkość stężeń efektywnych (EC_{50}) uzależniona jest od środowiska, w którym były prowadzone testy [19].

Podjęta w rozprawie tematyka i kompleksowość przeprowadzonych eksperymentów były nowym kierunkiem w dziedzinie badań nad cieczami jonowymi. W realizacji badań dużą rolę odegrały granty, w których pełniłam funkcję wykonawcy. Był to m.in. grant KBN 2P04G08329, grant UMK 319-Ch oraz Stypendium Marszałka Województwa Kujawsko-Pomorskiego, które w 90 % przeznaczyłam na realizację badań. Rezultatem prowadzonych prac były m. in. trzy zgłoszenia patentowe oraz szereg publikacji naukowych.

Wspomniane prace złożyły się na przygotowaną pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego rozprawę doktorską zatytułowaną *Oznaczanie cieczy jonowych w próbkach biologicznych i środowiskowych za pomocą łączonych technik chromatograficznych*, którą z wyróżnieniem obroniłam 21 stycznia 2009 roku. Rozprawa doktorska uzyskała szereg nagród i wyróżnień. Do najważniejszych należą: nagroda firmy Merck i Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą rozprawę doktorską z chemii analitycznej oraz wyróżnienie Komisji Analizy Chromatograficznej KChA PAN dla młodych pracowników nauki w dziedzinie metod rozdzielania.

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk chemicznych, zostałam zatrudniona na Wydziale Chemii UMK na stanowisku naukowo-technicznym (w okresie od III.2009 do IX.2010). W tym okresie moim głównym obowiązkiem było opracowywanie nowych ćwiczeń laboratoryjnych do przedmiotów: *Chemia środowiska i Ekologia*, *Ekoanalitka*, *Podstawy metod separacyjnych*. Równocześnie brałam udział w badaniach, których celem było opracowanie metody oznaczania cieczy jonowych za pomocą chromatografii jonowej. Efektem było opublikowanie dwóch prac naukowych [20,21].

W kwietniu 2010 roku otrzymałam stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w ramach programu „Start”. Następnie w październiku tego roku zostałam przeniesiona na stanowisko asystenta i rozpoczęłam badania naukowe, które stanowią podstawę rozprawy habilitacyjnej.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Postanowiłam zmienić tematykę badawczą, co było związane z chęcią zdobycia nowej wiedzy i rozpoczęcia nowego etapu badań. W tym czasie w literaturze z obszaru chemii analitycznej można było zauważyć znaczący wzrost liczby publikacji z zakresu genomiki, a dokładnie – bioanalitiky kwasów nukleinowych i monomerów je budujących [22-24].

Cząsteczki budujące kwasy nukleinowe

Kwasy nukleinowe to związki pełniące funkcję źródła informacji o budowie i cechach każdego organizmu żywego [25]. Zarówno kwas deoksyrybonukleinowy (DNA), jak i kwas rybonukleinowy (RNA) są polimerami, zbudowanymi z mniejszych cząstek monomerów – nukleotydów. Te z kolei są zbudowane z nukleozydów połączonych z grupą fosforanową. Dla prawidłowego funkcjonowania organizmów, niezbędne są nie tylko kwasy nukleinowe, ale także związki je budujące, czyli: oligonukleotydy, nukleotydy i nukleozydy [25]. Obecnie kwasy nukleinowe, jak i cząsteczki wchodzące w ich skład stanowią istotne narzędzia, którymi posługuje się biologia molekularna przede wszystkim w medycynie. Określa się bowiem m.in. stężenie nukleozydów w moczu, nukleotydów w mleku matki lub płynie mózgowo-rdzeniowym, zawartość zmodyfikowanych oligonukleotydów w osoczu, itp.

Wykazano, że poziom stężenia potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów w moczu jest użytecznym parametrem w badaniu zmian RNA i metabolizmu białek. Zostały one uznane za markery chorób nowotworowych [26-28]. Natomiast obecność oraz poziom stężenia nukleotydów musi być monitorowany dla takich celów jak m. in.: ocena stanu układu sercowo-naczyniowego, oznaczanie biomarkerów stresu oksydacyjnego, badanie mikroorganizmów, żywności, suplementacji diety, mleka matek karmiących oraz płynu mózgowo-rdzeniowego [29-33]. Udowodniono ponadto, iż nukleotydy mają działanie immunostymulujące, poprawiające pracę i wydolność układu odpornościowego [34,35]. Osiągnięcia w dziedzinie syntezy organicznej umożliwiły wykorzystanie nukleotydów do otrzymywania oligonukleotydów o zmodyfikowanej strukturze [25,36]. Zmiany strukturalne egzogennych, syntetycznych cząsteczek oligonukleotydów mają na celu zwiększenie ich hydrofobowości oraz odporności na działanie enzymów hydrolitycznych [37,38]. Związki te są wykorzystywane jako środki terapeutyczne, ponieważ mogą blokować ekspresję genów, czyli procesy transkrypcji i translacji [37-38].

Jednostki budujące kwasy nukleinowe są zatem albo markerami stanu chorobowego (nukleozydy), albo substancjami zwiększającymi odporność organizmu (nukleotydy), bądź też lekami, które mają ten organizm przed chorobą bronić (oligonukleotydy).

Możliwość monitorowania zmian chorobowych, zachodzących w organizmie poprzez oznaczenie nukleozydów, jak również terapeutyczne zastosowanie oligonukleotydów powoduje, iż niezbędne staje się ich oznaczanie w różnego typu matrycach. Prowadzi to do poszukiwania nowych metod analizy. Powinny one charakteryzować się krótkim czasem analizy, selektywnością, czułością i powtarzalnością. W analizie związków budujących kwasy nukleinowe powszechnie stosowane są techniki separacyjne, a zwłaszcza chromatografia cieczowa [32,39-41]. W jej przypadku możliwy jest dobór warunków rozdzielania dzięki zmianom dokonywanym zarówno w obrębie fazy stacjonarnej, jak i ruchomej. Nukleozydy, nukleotydy, czy też oligonukleotydy analizowane są jednak przede wszystkim z wykorzystaniem oktadecylowego wypełnienia kolumny chromatograficznej [32,33,39-42]. Nie zawsze jednak przy tego typu fazach stacjonarnych udaje się uzyskać wystarczające rozdzielanie wszystkich biomolekuł w mieszaninie lub też krótki czas analizy [32,33,40-42]. Materiał ten nie jest odpowiedni do analiz małych,

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

polarnych cząsteczek (nukleozydy lub niektóre nukleotydy), ponieważ są one często wymywane blisko objętości martwej kolumny. Dotychczas stosowanym rozwiązaniem jest wykorzystanie kolumn o długości 250 mm, co prowadzi jednak do długiego czasu analizy [42,43]. W przypadku chromatograficznych badań oligonukleotydów, rozdzielanie mieszanin składających się ze związków o niewielkich różnicach w sekwencji (np. zamiana jednej zasady w danej pozycji sekwencji), wiąże się z uzyskiwaniem długich czasów analiz [44-46].

Cel badań, realizowanych w ramach habilitacji

Powodem podjęcia niniejszych badań realizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej stał się fakt istnienia problemów w chromatograficznej analizie jednostek budujących kwasy nukleinowe, spowodowanych przez niekorzystne oddziaływania analitów z najpopularniejszymi fazami stacjonarnymi. Istniała zatem przyczyna do podjęcia próby zastosowania innego typu faz stacjonarnych zawierających różne, chemicznie związane do powierzchni nośnika, grupy funkcyjne.

Mając na uwadze rolę kwasów nukleinowych oraz związków je budujących (nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów) we współczesnej nauce w aspekcie zdrowotnym, podjęto badania naukowe, których celem było:

1. udoskonalenie chromatograficznych metod analizy, ukierunkowanych na zwiększanie efektywności i selektywności rozdzielania, skrócenia czasu analizy i uzyskania wysokiej czułości dla jednostek budujących kwasy nukleinowe [H1-H7] [47-53];
2. kompleksowe testowanie różnych typów faz stacjonarnych oraz średnic ziaren wypełnień chromatograficznych pod kątem ich zastosowania w rozdzielaniu oraz analizie jakościowej i ilościowej nukleozydów, nukleotydów oraz oligonukleotydów [H2, H3, H4, H6] [48-50,52];
3. badanie mechanizmu retencji nukleozydów, nukleotydów oraz oligonukleotydów [H2, H3, H4, H6, H8] [48-50,52,54];
4. zastosowanie udoskonalonych metod chromatograficznego oznaczania nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów w różnego typu matrycach (np. osocze, mocz, żywność) [H1, H3, H4, H5, H7] [47,49-51,53];
5. próba wykorzystania spektrometrii mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie oraz za pomocą plazmy indukcyjnie sprzężonej w analizie oligonukleotydów [H7] [53];
6. opracowanie modelu ilościowych zależności struktura-retencja, który umożliwi oszacowanie współczynników retencji oligonukleotydów na bazie danych retencyjnych uzyskanych dla nukleotydów w układzie chromatografii par jonowych [H8] [54].

Wykorzystanie różnorodnych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej w analizie nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów

U podstaw prac H1 – H7, związanych z testowaniem różnorodnych faz stacjonarnych oraz ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej w analizie związków budujących kwasy

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

nukleinowe, leży koncepcja udoskonalenia istniejących już rozwiązań analitycznych, które umożliwią uzyskanie lepszych wyników w stosunku do prezentowanych dotychczas w literaturze. Jak zaprezentowano w pracach **H1**, **H2**, **H3**, **H4**, **H6**, **H8** analiza chromatograficzna nukleozydów, nukleotydów oraz oligonukleotydów poddana została szeroko rozumianej optymalizacji [47-50,52,54]. Zmian dokonywałam bowiem nie tylko w obrębie typu wypełnienia, ale także w składzie fazy ruchomej. Prace **H2**, **H4**, **H6** prezentują wyniki pierwszego etapu badań, w którym wykorzystano różnego typu fazy stacjonarne, w przypadku których do nośnika krzemionkowego związane na drodze chemicznej modyfikacji różne grupy funkcyjne [48,50,52]. Wykorzystałam aminopropylowe, alkiloamidowe, cholesterolowe, N,O-dialkilofosforoamidowe (fosfo-alkilowe) oraz fenyłowe wypełnienia kolumn chromatograficznych. W badaniach jako materiał porównawczy stosowano oktadecylową fazę stacjonarną. Każde z wymienionych wypełnień spreparowane zostało w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, dlatego też możliwa była kompleksowa charakterystyka fizyko-chemiczna uzyskanych materiałów. Pozwoliła ona na uzyskanie pełnej i satysfakcjonującej informacji o ich właściwościach. Należy podkreślić, że kolumny te (poza oktadecylową) *nie były nigdy wcześniej wykorzystywane w analizie tego typu biocząsteczek*. Ponadto, nie stosowano tak dużej grupy faz stacjonarnych, które zsyntezowano w jednym laboratorium badawczym na bazie tego samego nośnika, do analiz nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów.

W kolejnych etapach badań przeprowadziłam systematyczne analizy, mające na celu dobór warunków analiz chromatograficznych do rozdzielania badanych związków. W przypadku nukleozydów oraz nukleotydów badania te prowadzono dla każdej z kolumn w odwróconym układzie faz (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography - RP HPLC*), co omówione zostało w publikacjach **H2**, **H4** [48,50]. Badałam wpływ metanolu oraz octanu amonu, mrówczanu amonu i diwodorofosforanu potasu na chromatograficzne oznaczanie nukleozydów i nukleotydów. Wyniki zaprezentowane w **H2** i **H4** dowodzą, iż wraz ze wzrostem stężenia buforu wchodzącego w skład fazy ruchomej wartości współczynników retencji (k) nukleozydów i nukleotydów uległy redukcji, podobnie jak asymetria pików [48,50]. Do rutynowych oznaczeń obu grup związków wybrano bufor o stężeniu mieszczącym się w zakresie 20-30 mM. Interesujące efekty zaobserwowałam dla zmian dokonywanych w obrębie pH buforu fazy ruchomej [48,50]. Testowałam fazy ruchome o pH mieszczącym się w zakresie 4,0-7,0. Obniżenie pH powodowało wzrost wartości k nukleozydów i nukleotydów dla aminopropylowej, alkiloamidowej oraz cholesterolowej fazy stacjonarnej. Jak udowodniłam w publikacjach **H2** i **H4**, jest to związane ze stopniowym protonowaniem aminowych grup funkcyjnych, które znajdują się na powierzchni wymienionych trzech faz stacjonarnych [48,50]. Zyskują one bowiem ładunek dodatni i działają jako wymiennicze jonowy, co prowadzi do zwiększenia retencji np. ujemnie naładowanych nukleotydów (grupy fosforanowe), na skutek oddziaływań elektrostatycznych. Przeciwny efekt zmian pH fazy ruchomej odnotowałam dla wypełnienia fosfo-alkilowego, co jest konsekwencją ujemnego ładunku ligandów fazy stacjonarnej, związanych z powierzchnią krzemionki. Odczyn buforu, wchodzącego w skład fazy ruchomej miał natomiast mały wpływ na retencję nukleozydów i nukleotydów w przypadku oktadecylowej i fenyłowej fazy stacjonarnej [48,50]. W czasie prowadzonych badań udowodniłam, iż zarówno stężenie buforu, wchodzącego w skład fazy ruchomej, jak i jego pH mają duży wpływ na rozdzielczość mieszanin nukleotydów i nukleozydów. *Nowością prowadzonych badań jest wykazanie, iż odczyn jest w przypadku niekonwencjonalnych faz stacjonarnych istotnym parametrem, umożliwiającym sterowanie*

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

rozdzielczością, co jest niezwykle ważne w rutynowych analizach chromatograficznych tej grupy związków.

Wpływ pH badałam także w przypadku analiz niezmodyfikowanych oligonukleotydów. Do ich chromatograficznego oznaczania z całej grupy dostępnych kolumn wybrałam tylko wypełnienie cholesterolowe oraz alkiloamidowe. Wyboru tego dokonałam na podstawie wyników uzyskanych w pracach **H2** i **H4**. Analogicznie jak w przypadku testowanych wcześniej biocząsteczek, wartości k rosły wraz z obniżeniem pH buforu fazy ruchomej. Asymetria pików była jednak wysoka ($f_{AS}>2$), co uniemożliwiało prowadzenie dalszych analiz. Z tego względu zastosowałam chromatografię par jonowych (*Ion Pair Chromatography* – IPC), a uzyskane wyniki badań zamieściłam i omówiłam szczegółowo w publikacji **H6** [52].

Analizowałam grupę oligonukleotydów, które są izomerami strukturalnymi i pozycyjnymi (różniące się np. pozycją lub typem jednej zasady w sekwencji), ze względu na brak metod analitycznych, które umożliwiają rozdzielanie tych związków w krótkim czasie [44,45,55,56]. Na dodatkową uwagę zasługuje fakt, iż w sekwencji tych związków występują regiony komplementarne, a ich chromatograficzna analiza odbywała się w warunkach niedenaturujących, co pozwoliło mi na pełne określenie potencjału rozdzielczego cholesterolowej i alkiloamidowej fazy stacjonarnej [52]. We wstępnych etapach eksperymentów porównałam wpływ różnych odczynników do tworzenia par jonowych oraz ich stężenia na retencję oligonukleotydów, a otrzymane dane zestawiałam i omówiłam w pracy **H6** [52]. Retencja biocząsteczek na powierzchni fazy stacjonarnej zwiększa się ze wzrostem stężenia czynnika tworzącego pary jonowe. Wykonane eksperymenty pozwoliły mi na wniosek, iż do rutynowych analiz oligonukleotydów z wykorzystaniem cholesterolowej i alkiloamidowej fazy stacjonarnej należy stosować octan trietyloaminy lub trietyloaminę w mieszaninie z 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanolem [52].

Poza RP HPLC oraz IPC w badaniach zastosowałam także chromatografię jonową (*Ion Chromatography* – IC). Celem eksperymentów było ponowne zastosowanie nowego typu faz stacjonarnych w analizie nukleotydów. Były to *wypełnienia o strukturze dendrymerycznej, zawierające centra anionowymienne, które jako pierwsza zastosowałam w analizie tej grupy związków*. Wadą IC są fazy stacjonarne, które często cechuje słaba powtarzalność, oraz długie czasy analiz [31,32]. Wyniki badań, jakie uzyskałam dla tych faz stacjonarnych oraz nukleotydów zostały zebrane i omówione w pracy **H3** [49]. W celu doboru warunków do rutynowych analiz nukleotydów, badałam wpływ liczby warstw fazy anionowymiennej, wpływ pH oraz stężenia buforu, wchodzącego w skład fazy ruchomej, a także wpływ typu nośnika na retencję nukleotydów. Uzyskane wyniki pozwoliły mi stwierdzić, że wraz ze wzrostem ilości warstw fazy stacjonarnej na nośniku krzemionkowym i polimerowym, wzrasta czas retencji badanych związków. Efekt ten jest konsekwencją zwiększającej się liczby centrów anionowymiennych związanych z powierzchnią nośnika, oddziałujących z rozdzielanymi cząsteczkami. W publikacji **H3** wykazałam, że retencja nukleotydów na anionowymiennych wypełnieniach dendrymerycznych, uzależniona jest od dwóch efektów: liczby grup NR_3^+ (efekt dominujący) oraz możliwości wnikania analitów pomiędzy warstwy wypełnienia (efekt dodatkowy) [49]. Obserwowałam także wzrost wartości k ze wzrostem pH fazy ruchomej. Polimerowe, dendrymeryczne fazy stacjonarne stosowałam w analizie nukleotydów dla faz ruchomych o pH=11. Doprowadziło to do znacznego zwiększenia wartości współczynnika retencji, przy czym ze względu na wysoką asymetrię pików, nie uzyskałam rozdzielania mieszanin monofosforanów nukleotydów. Wyniki zaprezentowane w pracy **H3**, pozwoliły mi stwierdzić, że wypełnienia dendrymeryczne uzyskane na bazie polimeru charakteryzuje

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

mniejsza sprawność, w porównaniu do kolumn krzemionkowych z tym samym typem fazy stacjonarnej i nie są one odpowiednie do efektywnego rozdzielania i oznaczania badanej grupy związków [49].

Badanie mechanizmu retencji związków budujących kwasy nukleinowe

Istotnym etapem prowadzonych badań było rozważenie i zrozumienie mechanizmu retencji, jak i mechanizmu oddziaływań małych cząsteczek (nukleotydów i nukleozydów) oraz polimerów (oligonukleotydów) z powierzchnią adsorbentu. Tego typu *systematyczne badania dla dużej liczby faz stacjonarnych, syntezowanych na bazie jednego nośnika w jednym laboratorium i dla trzech grup związków, będących jednostkami strukturalnymi kwasów nukleinowych, nie były dotąd prowadzone*. Jak zaprezentowano w **H2** i **H4**, najniższe wartości k zarówno dla nukleozydów, jak i nukleotydów uzyskiwano dla fosfoalkilowej oraz aminopropylowej fazy stacjonarnej. Jest to konsekwencją polarności tych wypełnień, jak również obecności ujemnie naładowanej grupy fosforanowej w strukturze pierwszego z nich. Wyższe wartości k uzyskiwałam w przypadku alkiloamidowej fazy stacjonarnej, która posiada w swojej strukturze zarówno polarne grupy aminowe, amidowe, jak i hydrofobowe łańcuchy alkilowe. Analizowane nukleozydy i nukleotydy oddziałują z powierzchnią tego wypełnienia zarówno poprzez wiązania wodorowe z grupami polarnymi, jak i oddziaływania hydrofobowe z łańcuchami węglowodorowymi [48,50]. Hydrofobowo-hydrofilowy charakter tej fazy stacjonarnej prowadzi do uzyskania krótszych czasów retencji, w porównaniu do niepolarnego wypełnienia oktadecylowego. Z drugiej jednak strony udział oddziaływań wodorowych i elektrostatycznych (w zależności od pH fazy ruchomej) umożliwił zmianę selektywności w stosunku do najbardziej polarnych spośród badanych biocząsteczek. Resztkowe grupy aminopropylowe obecne są także na powierzchni wypełnienia cholesterolowego. Jednakże w tym przypadku wartości k są większe niż dla alkiloamidowej fazy stacjonarnej, co zostało przedstawione w pracach **H2** i **H4** [48,50]. W strukturze tej fazy stacjonarnej obecna jest jednak chemicznie związana z powierzchnią nośnika cząsteczka cholesterolu. Jej rozmiar ogranicza dostęp analizowanych związków do grup aminopropylowych, stąd też oddziaływanie poprzez wiązania wodorowe ma przypadku tej fazy stacjonarnej mniejszy wpływ na retencję w porównaniu z wypełnieniem alkiloamidowym. Grupy aminowe biorą jednak udział w mechanizmie retencji, przy czym jak udowodniono w pracach **H2** i **H4**, dominujące są oddziaływania hydrofobowe oraz $\pi\dots\pi$ [48,50]. Badania retencyjne wykonałam także dla fenylovej fazy stacjonarnej, w przypadku której nukleozydy i nukleotydy zatrzymywane są na powierzchni głównie poprzez oddziaływania typu $\pi\dots\pi$. Wykazałam, iż pomimo podobnej zawartości procentowej węgla na powierzchni alkiloamidowej oraz fenylovej fazy stacjonarnej, wartości k są wyższe w przypadku pierwszej z nich. Dowiodłam tym samym, że oddziaływania $\pi\dots\pi$ choć biorą udział w mechanizmie retencji, nie odgrywają w nim znaczącej roli w przypadku nukleozydów i nukleotydów. Podsumowując *wykazałam po raz pierwszy jednoznacznie, iż w mechanizmie retencji badanych biocząsteczek zasadniczą rolę odgrywają oddziaływania hydrofobowe, niemniej jednak wiązania polarne (wodorowe, elektrostatyczne) pozwalają na zmianę selektywności fazy stacjonarnej i możliwość pełnego rozdzielania wszystkich składników mieszaniny* [48,50].

W przypadku oligonukleotydów analizowanych w układzie IPC, na proces ich zatrzymywania na powierzchni fazy stacjonarnej wpływ mają przede wszystkim

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

oddziaływania hydrofobowe oraz jonowe między ujemnie naładowanymi oligonukleotydami, a protonowanymi grupami aminowymi. Struktura stosowanych w badaniach hydrofobowo-hydrofilowych faz stacjonarnych umożliwia zatrzymywanie oligonukleotydów poprzez dodatkowe typy oddziaływań, podobnie jak w przypadku nukleozydów i nukleotydów. W publikacji **H6** wykazałam m.in. że mechanizm retencji oligonukleotydów zależy od struktury chemicznej czynnika tworzącego pary jonowe: im dłuższy łańcuch *n*-alkilowy w strukturze modyfikatora, tym wyższe wartości *k* [52]. Proces zatrzymywania tych biocząsteczek na powierzchni nośnika, uzależniony jest także od struktury fazy stacjonarnej. Najniższe wartości *k* uzyskałam dla wypełnienia alkiloamidowego, najwyższe zaś dla fazy stacjonarnej ze związaną cząsteczką cholesterolu. Retencja oligonukleotydów w jej przypadku była wyższa niż dla wypełnienia oktadecylowego. Jest to efekt przeciwny w stosunku do odnotowanego dla nukleozydów i nukleotydów [48,50]. Publikacja **H6** dowodzi, że pomimo iż te małowartościowe związki są jednostkami budującymi oligonukleotydy, w mechanizmie retencji następuje zmiana i oligonukleotydy są zatrzymywane na powierzchni wypełnienia cholesterolowego w największym stopniu [52]. Zarówno wiązania wodorowe, jak i oddziaływania $\pi \dots \pi$ mają w przypadku oligonukleotydów większy udział w mechanizmie zatrzymywania tych związków na powierzchni faz stacjonarnej w porównaniu do nukleotydów i nukleozydów [48,50,52]. Udział mają jednak także oddziaływania hydrofobowe oraz elektrostatyczne (tworzenie par jonowych). Dane przedstawione w publikacji **H6** dowodzą jednak także, iż retencja oligonukleotydów zależy od ich sekwencji i nukleotydów ją budujących [52].

Zmiany retencji oligonukleotydów, które są izomerami sekwencyjnymi są zależne także od ich struktury drugorzędowej [52]. W przypadku testowanych oligonukleotydów dochodzi do międzycząsteczkowego tworzenia par zasad oraz tworzenia drugorzędowej struktury typu *szpilki do włosów*. Wyniki, jakie zestawiałam i omówiałam w pracy **H6** świadczą o tym, iż w przypadku oktadecylowej oraz alkiloamidowej fazy stacjonarnej wyższe wartości *k* uzyskano dla sekwencji różniących się typem zasady w pozycji terminalnej w porównaniu do zmian nukleotydów w obrębie drugorzędowej struktury typu *szpilki do włosów* [52]. Efekt ten jest konsekwencją łatwiejszego dostępu końców 3'- oraz 5'- oligonukleotydu do powierzchni obu faz stacjonarnych oraz ich wnikanie pomiędzy proste łańcuchy alkilowe. Nie jest to możliwe w przypadku tworzącej się struktury drugorzędowej w postaci pętli. Przeciwnie tendencje odnotowałam dla fazy cholesterolowej. Zmiany zarówno nukleotydów tworzących pętle struktury drugorzędowej, jak i nukleotydów zlokalizowanych na końcach 3' lub 5' sekwencji, powodują uzyskiwanie zbliżonych wartości *k*. Jak wykazałam w publikacji **H6**, *struktura drugorzędowa oligonukleotydu nie ma zatem w przypadku wypełnienia cholesterolowego zasadniczego wpływu na retencję badanych biocząsteczek i może być stosowana do ich pełnego rozdzielenia w nie denaturujących warunkach elucji* [52].

Mechanizm retencji oligonukleotydów ma w tym przypadku złożony charakter, oparty jest zarówno na oddziaływaniach hydrofobowych, jak i wymianie jonowej. Stanowi to ogromny potencjał analityczny, zwłaszcza przy doborze warunków chromatograficznych do rozdzielenia badanych biocząsteczek.

Tak kompleksowe i systematyczne badania retencyjne dla nukleotydów, nukleozydów i oligonukleotydów są nowością w analizie jednostek budujących kwasy nukleinowe. *Uzyskane wyniki mogą stanowić obecnie bazę danych przy wstępnym wyborze fazy stacjonarnej do rozdzielenia tych grup związków.*

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Rozdzielanie mieszanin nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów z zastosowaniem hydrofobowo-hydrofilowych faz stacjonarnych

Wyniki uzyskane w czasie realizacji badań w pracach **H2** i **H4** dowodzą, że wykorzystanie alkiloamidowej fazy stacjonarnej umożliwiło zatrzymanie na powierzchni wypełnienia oraz rozdzielenie polarnych, małowcząsteczkowych nukleozydów (cytozyna, urydyna). Nie udało się tego osiągnąć w przypadku wypełnienia oktadecylowego. Jednocześnie czas analizy był krótszy [48,50]. Zastosowana przez mnie cholesterolowa faza stacjonarna pozwala na uzyskanie analogicznych czasów retencji, jak w przypadku kolumny z wypełnieniem oktadecylowym. Selektywność natomiast jest inna i była wysoka w przypadku najbardziej polarnych nukleozydów i nukleotydów (cytozyna, urydyna, urydyno-5'-monofosforan, cytydino-5'-monofosforan). Zastosowanie fenylowego wypełnienia kolumny chromatograficznej prowadziło do uzyskania krótszych czasów rozdzieleń w stosunku do oktadecylowej fazy stacjonarnej, jednakże rozdzielanie urydino-5'-monofosforanu od cytydino-5'-monofosforanu nie było możliwe. Analogiczne tendencje zaobserwowałam i omówiłam w publikacji **H6** podczas prób rozdzielania mieszanin oligonukleotydów [52]. Czasy analiz były krótsze dla alkiloamidowej i cholesterolowej fazy stacjonarnej, w porównaniu do wypełnienia oktadecylowego. W jego przypadku konieczne było zastosowanie elucji gradientowej, podczas gdy wypełnienia hydrofobowo-hydrofilowe umożliwiały rozdzielanie oligonukleotydów w dobrą selektywnością w warunkach elucji izokratycznej [52].

Uzyskanymi w pracach **H2**, **H4**, **H6** wynikami wykazałam po raz pierwszy, że wykorzystanie alkiloamidowej oraz cholesterolowej fazy stacjonarnej jest bardzo dobrą alternatywą w stosunku do powszechnie stosowanej oktadecylowej [48,50,52]. Jej zastosowanie prowadzi do uzyskania dłuższych czasów analiz oraz braku rozdzielania wszystkich składników mieszanin, w przeciwieństwie do np. wypełnienia cholesterolowego [26-28,48,50,52]. Udoskonaliłam istniejące metody chromatograficznego rozdzielania jednostek budujących kwasy nukleinowe, poprzez zastosowanie układów chromatograficznych o większej selektywności i zdolności rozdzielczej. Poza hydrofobowo-hydrofilowymi fazami stacjonarnymi, wykorzystywałam także wypełnienia dendrymeryczne, a spodziewanym efektem był wzrost selektywności i sprawności rozdzielania. Jak przedstawiono w pracy **H3**, niezależnie od ilości warstw anionowymieniacza na nośniku krzemionkowym otrzymywałam zawsze pełne rozdzielanie mieszanin monofosforanów nukleotydów [49]. Niemniej jednak ze względu na krótki czas analiz (poniżej 10 minut) do rutynowych oznaczeń tej grupy związków wybrałam wypełnienia pokryte tylko jedną warstwą dendrymeru. Jest to bardzo dobry wynik, ze względu na prostszą i tańszą syntezę tych wypełnień (naniesienie tylko jednej warstwy fazy stacjonarnej) w porównaniu z fazami o większej ilości warstw. Zebrane w pracy **H3** wyniki świadczą o tym, iż zastosowanie nowego podejścia do rozdzielania nukleotydów za pomocą chromatografii jonowej, pozwala na uzyskanie lepszej rozdzielczości i skrócenia czasu analizy w stosunku do danych prezentowanych w literaturze [32,57-60]. *Dotychczas mieścił się on w zakresie 10-20 minut, podczas gdy w przypadku moich badań uległ on skróceniu do 6,5 minuty* [32,57-60].

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Rozdzielanie mieszanin nukleozydów i oligonukleotydów z wykorzystaniem ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Krótkie czasy analiz chromatograficznych są także domeną ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*Ultra High Performance Liquid Chromatography* – UHPLC). Ze względu na wykorzystywanie kolumn napakowanych fazami stacjonarnymi o zmniejszonej średnicy ziarna (<2 μm), możliwe jest uzyskanie dużej rozdzielczości w szerokim zakresie prędkości przepływu fazy ruchomej, skrócenie czasu analizy i wzrost czułości metody. Mimo to istnieje tylko kilka przykładów wykorzystania UHPLC w rozdzielaniu i oznaczaniu jednostek budujących kwasy nukleinowe [61]. Z tego względu podjęłam próbę zastosowania różnych średnic cząstek (1,3 – 2,0 μm) komercyjnych faz stacjonarnych (oktylowa, oktedecylowa, fenylova, pentafluorofenylova, niezmodyfikowany żel krzemionkowy) w analizie potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów oraz oligonukleotydów.

Wyniki uzyskane dla nukleozydów omówiłam w pracy **H1** [47]. Testowałam zarówno RP HPLC, jak i chromatografię oddziaływań hydrofilowych (*Hydrophilic Interaction Chromatography* – HILIC). Zasadniczym celem tego etapu badań było sprawdzenie czy duża sprawność układów UHPLC pozwoli na analizę polarnych nukleozydów bez konieczności stosowania buforów w fazie ruchomej. Z tego względu w czasie badań stosowałam wodno-organiczne fazy ruchome [47]. Najwyższe wartości k w RP HPLC otrzymałam dla wypełnienia oktadecylowego i fenylowego, co potwierdzają uzyskane w publikacji **H4** wyniki i dyskusja mechanizmu retencji [50]. W przypadku układów HILIC retencja nukleozydów była także wysoka. Niemniej jednak ograniczeniem jest asymetria pików, której wartości przekraczały 1,8, pomimo stosowania ziaren żelu krzemionkowego o zmniejszonej średnicy. Jak zaprezentowano w publikacji **H1**, przeciwne wyniki uzyskano dla wypełnień oktadecylowych, które w przypadku UHPLC okazały się być najlepszymi pod względem otrzymywanych rozdzielczości mieszanin badanych biocząsteczek [47]. *Uzyskałam całkowite rozdzielanie mieszaniny potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów w czasie 4 minut. Największym osiągnięciem jest jednak nie tylko redukcja czasu niezbędnego do uzyskania rozdzielania, ale modyfikacja składu fazy ruchomej.* Wszystkie metody separacyjne stosowane w analizie tych biocząsteczek wykorzystują bufory o różnych stężeniach, co jest często przyczyną ograniczonych możliwości zastosowań różnorodnych detektorów, zwłaszcza spektrometrów mas [26-28]. Z tego względu opracowana i opisana w pracy **H1** metoda oparta na wykorzystywaniu w fazie ruchomej tylko wody oraz metanolu, przy zachowaniu symetrycznych kształtów pików, znajdzie zastosowanie w rutynowej analizie jakościowej i ilościowej nukleozydów.

UHPLC wykorzystałam także w chromatograficznej analizie oligonukleotydów. W badaniach stosowałam dwie grupy oligonukleotydów: niezmodyfikowane, różniące się pozycją i typem zasad w sekwencji oraz zmodyfikowane atomami siarki oligonukleotydy tiofosforanowe. Są one wykorzystywane w terapii antysensowej oraz testowane jako leki (w różnych fazach badań klinicznych). W przypadku obu klas związków konieczne było ponowne zastosowanie IPC. W pracy **H5** omówiłam dobór warunków, porównanie różnych odczynników do tworzenia par jonowych oraz wpływ struktury drugorzędowej na mechanizm retencji [51]. Potwierdziłam wyniki, jakie uzyskałam w pracy **H6**, ponieważ wartości k osiągały były największe dla oktadecylowej oraz fenylowej fazy stacjonarnej [52]. Rozdzieliłam mieszaniny niezmodyfikowanych oligonukleotydów, różniących się pozycją

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

jednej i tej samej zasady w sekwencji; różniących się typem zasady w tej samej pozycji sekwencji oraz różniących się oboma parametrami. W każdym z opisanych przypadków otrzymałam *pełną separację biocząsteczek w czasie krótszym niż 10 minut z zastosowaniem oktadecylowej, fenylowej oraz pentafluorofenylowej fazy stacjonarnej*. Jest to znaczące osiągnięcie, ponieważ rozdzielenie mieszanin oligonukleotydów o tej samej ilości nukleotydów w nici, które są izomerami sekwencyjnymi wymaga długich czasów analiz (do 30 minut) [45,55,56]. Rozdzielanie tego typu mieszanin jest jednak ważne, ze względu na to, iż zanieczyszczeniami syntetycznych oligonukleotydów mogą być izomery sekwencyjne. Na podstawie wyników badań zebranych w pracy **H5**, do analiz oligonukleotydów tiofosforanowych wybrałam fenylową, pentafluorofenylową oraz oktadecylową fazę stacjonarną o zmniejszonej średnicy ziarna [51]. Wyniki otrzymane w czasie prowadzonych eksperymentów dowiodły, że do rutynowej analizy tej grupy biocząsteczek najlepszym pod względem czasu, selektywności i symetrii pików jest wypełnienie ze związaną cząsteczkę fenylu, przy czym składnikami fazy ruchomej był octan trietyloaminy oraz acetonitryl [51]. W publikacji **H7** podjęłam ponadto próbę rozdzielenia jednego z badanych *oligonukleotydów od jego metabolitów* [53]. Wykorzystanie UHPLC umożliwiło przeprowadzenie *analizy w czasie 7 minut* [53]. Podkreślić należy, iż zwiększenie prędkości przepływu fazy ruchomej prowadziło do kolejnego skrócenia całkowitego czasu rozdzielania. Są to wyniki lepsze od uzyskiwanych do tej pory przez innych badaczy [62,63].

Detekcja oligonukleotydów za pomocą spektrometrii mas z różnymi metodami jonizacji

W badaniach nad oligonukleotydami dokonałam także doboru odpowiedniej metody detekcji. We wstępnym etapie badań stosowałam detekcję spektrofotometryczną UV-Vis [47-52]. Ich oznaczanie jakościowe i ilościowe może zostać jednak przeprowadzone z wykorzystaniem spektrometrii mas, co stało się kolejnym celem badań. Testowałam dwie różne metody jonizacji: elektrorozpraszanie i plazmę indukcyjnie sprzężoną. W eksperymentach wykorzystywano opracowaną wcześniej metodę analizy za pomocą chromatografii par jonowych. W przypadku stosowania spektrometrii mas faza ruchoma składała się z mieszaniny metanolu z trietyloaminą (TEA) lub *N,N*-dimetylobutyloaminą (DMBA) i 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanolem (HFIP). Wykorzystanie tych rozpuszczalników pozwala na uzyskanie największej efektywności jonizacji oligonukleotydów oraz najwyższą czułość. W pierwszych próbach oznaczałam wybrane biocząsteczki za pomocą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS). Uzyskiwane granice wykrywalności oraz oznaczalności były wyższe niż np. w RP HPLC, co jest konsekwencją złożonego składu faz ruchomych stosowanych w IPC. Wykazałam, iż detekcja MS z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie jest metodą czulszą, niż UV-Vis. Umożliwia ponadto badania strukturalne badanych biocząsteczek. Podjęłam jednak próbę zastosowania kolejnego typu detekcji w celu określenia jej przydatności w oznaczaniu oligonukleotydów. Wykorzystałam spektrometrię mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* – ICP MS), z analizatorem kwadropolowym oraz o podwójnym ogniskowaniu (wysokorozdzielczy). Wyniki uzyskane w ramach tych badań opisałam i przedstawiłam w publikacji **H7** [53]. W pierwszych próbach badałam wpływ poszczególnych parametrów chromatograficznych na stabilność plazmy, wartości t_{la}, obecność interferentów w plazmie, czułość ICP MS w analizie oligonukleotydów. Uzyskane dane zebrane w publikacji **H7**

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

wskazują, iż mieszaniny metanolu, HFIP oraz TEA i DMBA są kompatybilne z wybraną metodą detekcji. Istotne znaczenie ma jednak stężenie zarówno HFIP, jak i TEA. Z tego względu *sprężenie IPC z ICP MS wymaga kompromisu między stężeniem odczynnika do tworzenia par jonowych, które umożliwi zarówno rozdzielanie mieszanin oligonukleotydów, jak i zadowalającą czułość*. Mimo to wartości LOD i LOQ dla tej grupy związków były niższe niż w przypadku detekcji UV-Vis, czy MS/MS [53]. Detekcja ICP MS z zastosowaniem podwójnego ogniskowania umożliwiła analizę badanych biocząsteczek na poziomie 0,06-0,100 µg/ml [53]. *Jest to najczulsza ze stosowanych w czasie badań metod detekcji*. Czułość ta jest większa w stosunku do danych uzyskanych dotychczas i zaprezentowanych w literaturze. Dotąd ukazały się jedynie dwie publikacje z tego zakresu, których autorzy uzyskali wartości granicy oznaczalności na poziomie 0,3 µg/ml oraz 300 µg/ml [62,63]. Wadą ICP MS jest jednak brak możliwości badań strukturalnych.

Kontynuowałam także badania nad zmodyfikowanymi oligonukleotydami tiofosforanowymi, w przypadku których możliwe jest równoczesne oznaczenie siarki i fosforu za pomocą ICP MS. Skorzystałam z wyników uzyskanych w pracy **H5** i do rutynowych analiz zastosowałam po raz kolejny UHPLC, co pozwoliło na zmniejszenie prędkości przepływu fazy ruchomej i równoczesne obniżenie wartości LOD i LOQ [51,53]. *Oznaczanie siarki za pomocą ICP MS w przypadku oligonukleotydów było prowadzone po raz pierwszy*. Uzyskane i zaprezentowane w publikacji **H7** wyniki dowiodły jednak, że wartości LOD dla siarki są kilkanaście razy wyższe w porównaniu z fosforem (na poziomie 200-300 µg/ml) [53]. Z tego względu w analizie ilościowej monitorowano jedynie drugi pierwiastek. W przypadku *analizy jakościowej równoczesna analiza siarki i fosforu okazała się być jednak bardzo przydatna w szybkim określeniu, które z sygnałów na chromatogramie pochodzą od oligonukleotydów antysensowych, a które od kwasów nukleinowych lub niezmodyfikowanych oligonukleotydów*.

Zastosowanie udoskonalonych metod chromatograficznego oznaczania nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów w różnego typu matrycach

Badania, które prowadziłam cechuje kompleksowość i systematyczność. Analityka biocząsteczek, będących przedmiotem realizowanych badań, pozwoliła na uzyskanie bardzo dużej liczby wyników retencyjnych. Kilkanaście nukleozydów i ich pochodnych, siedem nukleotydów, kilkanaście oligonukleotydów analizowano z wykorzystaniem kilkunastu różnych kolumn w różnych układach chromatograficznych. Umożliwiło to *utworzenie laboratoryjnej bazy danych retencyjnych analizowanych związków, która może być wykorzystywana w ich rutynowych analizach przy wyborze kolumny chromatograficznej do oznaczania*, np. oligonukleotydów w próbkach osocza. Ostatecznym etapem eksperymentów było jednak opracowanie ulepszonych metod rozdzielania oraz ilościowego oznaczania nukleozydów, nukleotydów lub oligonukleotydów w próbkach biologicznych. Znajdą one zastosowanie genomice, w sekwencjonowaniu DNA i RNA, w diagnostyce medycznej i biotechnologii. W każdym z wymienionych obszarów istotna jest kontrola procesu syntezy biocząsteczek, oznaczanie ich czystości, rozdzielanie, oznaczanie ilościowe i jakościowe w próbkach biologicznych i innych. W publikacjach **H1**, **H3**, **H4**, **H5**, **H7** przedstawiłam wyniki zastosowania opracowanych metod do analizy związków budujących kwasy nukleinowe w próbkach moczu, osocza oraz żywności [47,49,50,51,53].

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

W pracach **H1** i **H4** ujęłam dane dotyczące oznaczania nukleozydów i ich zmodyfikowanych pochodnych w moczu [47,50]. W tym celu zastosowałam po raz pierwszy cholesterolową fazę stacjonarną, która umożliwiła uzyskanie lepszej selektywności w stosunku do powszechnie wykorzystywanej fazy oktadecylowej. Z powodzeniem rozdzieliłam mieszaninę dziewięciu związków w czasie 20 minut i dokonałam ich ilościowej analizy, co jest czasem stosunkowo krótkim w porównaniu do danych prezentowanych w literaturze w HPLC [26-28]. Uzyskałam granice oznaczalności mieszczące się w zakresie 0,9-1,2 µg/ml. Metodę, którą opracowałam w kolejnym etapie badań, a która została opisana w pracy **H1**, cechuje krótszy czas analizy oraz prostszy skład fazy ruchomej, która nie zawierała buforu [47]. W tym przypadku zastosowałam UHPLC, za pomocą którego oznaczałam mieszaninę ośmiu nukleozydów w próbkach moczu i osocza. Wykorzystanie zarówno zmniejszonych średnic ziaren wypełnienia, jak również elucji gradientowej umożliwiło mi wykonanie analiz w czasie zaledwie 4 minut [47]. Zastosowanie tej techniki pozwoliło mi ponadto na obniżenie wartości granic oznaczalności. UHPLC zastosowałam także w oznaczaniu oligonukleotydów w osoczu, co zostało omówione w publikacji **H5** [51]. Podobnie, jak w przypadku nukleozydów wykorzystanie tej techniki umożliwiło znaczące skrócenie czasu analizy w stosunku do metod chromatograficznych stosowanych dotychczas. Równocześnie uzyskano granice oznaczalności na poziomie 0,5 µg/ml. Wyższe wartości LOQ dla oligonukleotydów w stosunku do nukleozydów są konsekwencją bardziej złożonego składu fazy ruchomej (wykorzystanie IPC) [51].

Większą czułość oznaczeń ilościowych oligonukleotydów otrzymałam dzięki zastosowaniu UHPLC oraz detekcji MS z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej. Opracowana przez mnie metoda została opisana w publikacji **H7** i była zastosowana do oznaczania tej klasy biocząsteczek oraz ich metabolitów w osoczu [53]. W czasie 7 minut rozdzielono oligonukleotyd tiofosforanowy od jego 4 metabolitów, a następnie związki te oznaczono ilościowo na poziomie stężeń 0,2-0,3 µg/ml [53]. Zarówno czas analizy jak i czułość zoptymalizowanej przeze mnie metody to parametry, które są lepsze w porównaniu do danych prezentowanych w literaturze [62-66]. Rozdzielenie metabolitów oligonukleotydów od związku wyjściowego trwa zazwyczaj od 15 do 30 minut, przy czym granice oznaczalności tych związków w próbkach osocza analizowanych za pomocą ICP MS wyznaczyłam po raz pierwszy na świecie [62,63]. Nadmienić należy jedynie, iż powszechnie wykorzystywana jest spektrometria mas z jonizacją przez elektrorozpraszanie, jednakże czułość jest w tym wypadku niższa niż w przypadku ICP, co także badałam i udowodniłam w trakcie swojej pracy.

Omówione powyżej *udoskonalone metody cechuje liniowość w szerokim zakresie stężeń, wysoka dokładność i precyzja*. Mogą one być z powodzeniem stosowane w rutynowych analizach nukleozydów i oligonukleotydów, jak i ich zmodyfikowanych pochodnych w próbkach biologicznych [47,50,51].

Prowadziłam także badania mające na celu zastosowanie opracowanej metody rozdzielania nukleotydów do oznaczania poziomu ich stężenia w zmodyfikowanym mleku dla niemowląt. Wyniki badań omówiłam w publikacji **H3** [49]. Uzyskałam rozdzielanie, a następnie przeprowadziłam oznaczenie *ilościowe czterech monofosforanów nukleotydów, wyekstrahowanych próbek mleka, w czasie zaledwie 6 minut*. Granice oznaczalności badanych biocząsteczek były na poziomie 0,4 µg/ml. Zastosowane przeze mnie udoskonalenia (faza stacjonarna, faza ruchoma) w stosunku do metod stosowanych

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

komercyjnie do analiz nukleotydów w próbkach żywności umożliwiły uzyskanie wyższej czułości, krótszych czasów analiz, dużej dokładności i precyzji oraz liniowości w szerokim zakresie stężeń. Opracowana przeze mnie metoda może być wykorzystywana w rutynowych analizach nukleotydów w mleku ludzkim lub modyfikowanym dla niemowląt [49].

Ilościowe zależności struktura-retencja w badaniu oligonukleotydów

W efekcie prowadzonych w czasie trzech lat badań uzyskałam dużą liczbę danych retencyjnych dla deoksynukleotydów oraz 24 oligonukleotydów w układzie par jonowych w warunkach nie denaturujących. Wyniki te wykorzystałam m. in. w próbie opracowania matematycznych modeli, pozwalających na wyznaczenie retencji oligonukleotydów na podstawie współczynników retencji nukleotydów. W tym celu zastosowałam ilościowe zależności struktura – retencja (*Quantitative Structure Retention Relationships – QSRR*), a wyniki badań omówiłam w publikacji **H8** [54]. Spośród grupy wszystkich kolumn, do ostatecznych kalkulacji wybrałam tylko dwie oktadecylowe fazy stacjonarne oraz wypełnienie cholesterolowe i alkiloamidowe, gdyż dla tych typów faz stacjonarnych uzyskałam wcześniej najlepsze wyniki pod względem rozdzielczości i zastosowania w badaniach rutynowych. Dla każdego analizowanego oligonukleotydu wyznaczono deskryptory strukturalne, które są związane z powierzchnią cząsteczek, ich hydrofobowością i właściwościami zasad azotowych.

We wstępnych etapach badań wyznaczyłam zależności współczynnika podziału *n*-oktanol/woda ($\log P$) od logarytmu ze współczynnika retencji ($\log k$) dla badanych oligonukleotydów. Zależności te pozwalają chromatografistom oszacować przenikanie biocząsteczek lub leków przez błony biologiczne. Zazwyczaj w tym celu stosowane są oktadecylowe wypełnienia kolumn chromatograficznych. Najwyższą korelację między oboma parametrami uzyskałam jednak dla cholesterolowej i alkiloamidowej fazy stacjonarnej. Oligonukleotydy mają jonowy charakter, a w konsekwencji ich oddziaływanie w układach naturalnych są bardziej złożone niż podział bazujący na hydrofobowości. Ich przenikanie przez bariery biologiczne związane jest także z oddziaływaniami polarnymi i jonowymi, które z kolei (jak wykazałam w pracach **H2** i **H6**) biorą udział w mechanizmie retencji w przypadku cholesterolowej i alkiloamidowej fazy stacjonarnej [48,52]. *W efekcie końcowym udowodniłam przydatność obu wypełnień nie tylko w rozdzielaniu jednostek składowych kwasów nukleinowych, ale także w chromatograficznym określaniu ich hydrofobowości i biodostępności. Badania tego typu dla hydrofobowo-hydrolifowych faz stacjonarnych prowadziłam jako pierwsza i zostały one ujęte w pracy H8 [54].*

W kolejnym etapie wyznaczyłam równania QSRR korelujące retencję oligonukleotydów z ich deskryptorami, wyznaczonymi za pomocą metod modelowania molekularnego. W przypadku oktadecylowych faz stacjonarnych uzyskałam jednak równania o niskich wartościach współczynnika determinacji (R^2), a oszacowany według równań współczynnik retencji może zostać obciążony dużym błędem [54]. Statystycznie istotne równania o wysokim potencjale predykcyjnym otrzymałam dla dwóch pozostałych wypełnień, przy czym deskryptorami mającymi największy wpływ była energia całkowita, powierzchnia van der Waalsa oraz energia hydratacji oligonukleotydu. Następnie dane retencyjne wyznaczone w czasie wielomiesięcznych *badania nukleotydów, wykorzystałam po raz pierwszy do wyznaczenia nowego typu deskryptora oligonukleotydów, co zostało omówione w pracy H8 [55]. Nie bazuje on na metodach chemii obliczeniowej, a stanowi logarytm z sumy*

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

wartości k nukleotydów, budujących dany oligonukleotyd ($\log \text{sum}k_N$). Deskryptor ten ilościowo charakteryzuje strukturę oligonukleotydu i umożliwia oszacowanie retencji/elucji w oparciu o jego sekwencję. W pracy **H8** wyznaczyłam kolejne równania QSRR dla każdej z faz stacjonarnych, w efekcie czego dowiodłam, iż eksperymentalnie wyznaczony deskryptor $\log \text{sum}k_N$ w największym stopniu wpływa i determinuje wartości k oligonukleotydów [54]. Udział pozostałych deskryptorów, takich jak objętość cząsteczki, powierzchnia dostępna dla cząsteczek wody, energia całkowita i hydratacji, był mały. W wyznaczonych równaniach QSRR stanowiły one swego rodzaju współczynniki korekcyjne korelacji $\log k$ oligonukleotydów z $\log \text{sum}k_N$. Wyznaczone równania QSRR umożliwiają przewidywanie wartości k oligonukleotydów na podstawie ich sekwencji i danych wyznaczonych wcześniej dla nukleotydów i wybranych faz stacjonarnych. Analogicznie jak w przypadku równań QSRR, otrzymanych jedynie na bazie deskryptorów wyznaczonych metodami mechaniki kwantowej dla wypełnień oktadecylowych nie uzyskałam równań o wysokich wartościach R^2 oraz małym odchyleniu standardowym modelu. Przeciwny efekt odnotowałam ponownie dla cholesterolowej i alkiloamidowej fazy stacjonarnej. *Modele QSRR pozwalają na precyzyjne przewidywanie retencji badanych biocząsteczek tylko dla wypełnień hydrofobowo-hydrofilowych*. Efekt ten związany jest albo z koniecznością wyznaczenia innych deskryptorów lub też ze specyficznymi oddziaływaniami między oligonukleotydami, a fazą cholesterolową i alkiloamidową.

Wyznaczone w publikacji **H8** równania QSRR dla oligonukleotydów umożliwiają nie tylko oszacowanie i przewidywanie retencji tych biocząsteczek na wybranych typach wypełnień kolumn chromatograficznych [54]. Bazując na metodologii QSRR *możliwe jest zidentyfikowanie oddziaływań, jakie mają wpływ na zatrzymywanie oligonukleotydów na powierzchni fazy stacjonarnej*, a w konsekwencji można przeprowadzić teoretyczną dyskusję mechanizmu retencji [54].

Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego

Rezultaty uzyskane w cyklu ośmiu monotematycznych prac pozwalają na następujące podsumowanie mojego osiągnięcia naukowego:

1. Po raz pierwszy zbadalam wpływ różnego typu faz stacjonarnych na chromatograficzne rozdzielanie i oznaczanie cząsteczek budujących kwasy nukleinowe (nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów). Równocześnie wskazałam te z wypełnień kolumn chromatograficznych, które umożliwiają uzyskanie wyników o większej selektywności w stosunku do danych prezentowanych w literaturze.
2. Dokonałam kompleksowego i systematycznego badania mechanizmu retencji nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów w różnych układach chromatografii cieczowej (odwrócony układ faz, chromatografia par jonowych, chromatografia oddziaływań hydrofilowych i chromatografia jonowa). Określiłam oddziaływania tych grup związków z powierzchnią faz stacjonarnych, zawierających różne grupy funkcyjne oraz ich wpływ na retencję. Uzyskane dane mogą być z powodzeniem stosowane w rutynowej analizie tych grup związków, przy wyborze kolumny chromatograficznej do ich końcowego oznaczania.
3. Opracowałam ulepszone, selektywne i precyzyjne metody oznaczania i rozdzielania nukleozydów, nukleotydów, oligonukleotydów z zastosowaniem alkiloamidowej oraz

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

cholesterolowej fazy stacjonarnej. W efekcie po raz pierwszy otrzymałam układy chromatograficzne o większej zdolności rozdzielczej, które pozwalają na jednoczesne skrócenie czasu analizy w porównaniu do wyników uzyskiwanych dotychczas.

4. Wykazałam możliwość zastosowania ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej w rozdzielaniu i analizie ilościowej nukleozydów. Jest to oryginalna metoda, w której związki te są analizowane za pomocą chromatografii w układzie faz odwróconych bez stosowania buforów w fazie ruchomej.
5. Zastosowałam opracowane przeze mnie oryginalne procedury analityczne w oznaczaniu nukleozydów w moczu i osoczu, nukleotydów w mleku, oligonukleotydów w osoczu.
6. Porównałam czułość detekcji spektrofotometrycznej (UV-Vis) oraz spektrometrii mas z różnymi metodami jonizacji w analizie jednostek budujących kwasy nukleinowe. Jednoznacznie wykazałam, iż spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej umożliwia uzyskanie najniższych wartości granicy oznaczalności w przypadku oligonukleotydów, jednakże stosowanie jonizacji przez elektrorozpraszanie pozwala na analizę jakościową.
7. Opracowałam nowe, oryginalne modele ilościowych zależności struktura – retencja, które umożliwiają obliczenie retencji oligonukleotydów na podstawie deskryptorów strukturalnych oraz współczynników retencji nukleotydów, wyznaczonych dla poszczególnych faz stacjonarnych uzyskanych w trakcie realizacji badań. W tym celu wyznaczyłam nowy typ deskryptora dla oligonukleotydów, który bazuje na danych eksperymentalnych. Wykazałam, że QSRR może zostać z powodzeniem wykorzystane do przewidywania i badania retencji oligonukleotydów.

Zakończenie

Realizacja powyższych badań nie byłaby możliwa bez uzyskiwania odpowiednich środków finansowych. Przygotowałam trzy projekty poświęcone udoskonalaniu metod chromatograficznej analizy nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów: grant Dziekana Wydziału Chemii UMK 9/2011, grant Narodowego Centrum Nauki 2011/01/D/ST4/04142 oraz projekt POMOST/2011-3/9 Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Wszystkie zostały pozytywnie ocenione, dzięki czemu mogłam prowadzić sukcesywne badania, będące podstawą niniejszej rozprawy habilitacyjnej. W każdym z grantów pełniłam funkcję kierownika, przy czym projekt POMOST był prowadzony we współpracy z ośrodkiem naukowym z Francji. Jego realizacja była związana ze stażem naukowym odbytym przeze mnie w Laboratorium Bio-Nieorganicznej Chemii Analitycznej i Środowiska (Zakład Instytutu Chemii Analitycznej, Materiałowej i Środowiska, Francuskiego Ośrodka Badań Naukowych), którego głównym celem było prowadzenie badań naukowych. W czasie jego trwania przygotowano ponadto wspólną publikację naukową, będącą efektem kilkuletniej współpracy [54].

W latach 2010-2015 brałam także udział w badaniach z zakresu analizy kationów cieczy jonowych, karotenoidów, hormonów płciowych, charakterystyki faz stacjonarnych. Wyniki tych badań były regularnie publikowane w czasopiśmie o zasięgu ogólnonaukowym.

W latach 2011-2013 regularnie uzyskiwałam nagrody zespołowe JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo –

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

badawczej. Natomiast w 2013 roku zostałam wyróżniona Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców.

Literatura

- [1] S. Kowalska, K. Krupczyńska, B. Buszewski, *The influence of the mobile phase pH and the stationary phase type on the selectivity tuning in high performance liquid chromatography nucleosides separation*. Journal of Separation Science, 28 (2005) 1502-1511.
- [2] B. Buszewski, S. Kowalska, K. Krupczyńska, *New generation of chromatographic packings and columns for determination of biologically active compounds*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 35 (2005) 89-116.
- [3] S. Kowalska, K. Krupczyńska, B. Buszewski, *Some remarks on characterization and application of stationary phases for RP-HPLC determination of biologically important compounds*. Biomedical Chromatography, 20 (2006) 4-22.
- [4] G. Karasová, S. Kowalska, J. Lehotay, B. Buszewski, *Mobile phase pH influence on the retention of some benzoic acid derivatives in reversed-phase chromatography*. Journal of Separation Science, 29 (2006) 1074-1081.
- [5] B. Buszewski, S. Kowalska, G. Karasová, J. Lehotay, *Influence of pH on benzoic acids derivatives retention and RP HPLC columns classification*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 29 (2006) 1-13.
- [6] B. Buszewski, S. Kowalska, K. Rozpędowska, T. Kowalkowski, M. Michel, T. Jonsson, *HPLC columns partition by chemometric methods based on peptides retention*. Journal of Chromatography B, 845 (2007) 253-260.
- [7] M. Michel, T. Bączek, S. Studzińska, K. Bodzioch, T. Jonsson, R. Kaliszan, B. Buszewski, *Comparative evaluation of high-performance liquid chromatography stationary phases used for the separation of peptides in terms of quantitative structure-retention relationships*. Journal of Chromatography A, 1175 (2007) 49-54.
- [8] A. Pérez de los Ríos, A. Irabien, F. Hollmann, F.J. Hernández Fernández, *Ionic Liquids: Green Solvents for Chemical Processing*. Journal of Chemistry, 2013 (2013) 1-2.
- [9] *Ionic Liquids: Green Solvents for the Future*, ACS Symposium Series, Vol. 819, ISBN13: 9780841237797, 2009, 10-25.
- [10] N. Muhammad, Y. A. Elsheikh, M. Ibrahim, A. Mutalib, A. A. Bazmi, R. A. Khan, H. Khan, S. Rafiq, Z. Man, I. Khan, *An overview of the role of ionic liquids in biodiesel reaction*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 21 (2015) 1-10.
- [11] Q. P. Li, J. Z. Li, F. Z. Hui, E. W. Xue, D. C. Xiao, *Grafting of ionic liquidson stainless steel surface for antibacterial application*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 126 (2015) 162-168.
- [12] B. Buszewski, S. Studzińska, *A review of ionic liquids in chromatographic and electromigration techniques*. Chromatographia, 68 (2008) 1-10.
- [13] B. Buszewski, S. Kowalska, P. Stepnowski, *The influence of stationary phase properties on ionic liquids cations separation in RP-HPLC*. Journal of Separation Science, 29 (2006) 1116-1125.
- [14] S. Kowalska, B. Buszewski, *Effect of stationary phase polarity on the ionic liquid cations retention in reversed phase liquid chromatography*. Journal of Separation Science, 29 (2006) 2625-2634.
- [15] S. Studzińska, B. Buszewski, *Study of retention mechanism of imidazolium-based ionic liquids in high performance liquid chromatography*. Journal of Separation Science, 33(9) (2010) 1264-73.
- [16] S. Studzińska, B. Buszewski, *Chromatographic determination of hydrophobicity of dialkylimidazolium ionic liquids using selected stationary phase*. Journal of Separation Science, 35 (2012) 1123-1131.
- [17] S. Studzińska, M. Sprynskyy, B. Buszewski, *Study of sorption kinetics of some ionic liquids on different soil types*. Chemosphere, 71 (2008) 2121-2128.
- [18] S. Studzińska, T. Kowalkowski, B. Buszewski, *Study of ionic liquid cations transport in soil*. Journal of Hazardous Materials, 168 (2009) 1542-1547.
- [19] S. Studzińska, B. Buszewski, *Study of toxicity of imidazolium ionic liquids to garden cress (Lepidium Sativum L.)*. Analytical Bioanalytical Chemistry, 393(3) (2009) 983-990.
- [20] M. Molíková, S. Studzińska, P. Kosobucki, P. Jandera, B. Buszewski, *Determination of imidazolium and pyridinium ionic liquid cations by ion chromatography*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 33 (2010) 225-238.
- [21] S. Studzińska, M. Molíková, P. Kosobucki, P. Jandera, B. Buszewski, *Study of ionic liquids interactions in IC by QSRR*, Chromatographia, 73 (2011) 35-44.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

- [22] P. R. Brown, C. S. Robb, S. E. Geldart, *Perspectives on analyses of nucleic acid constituents: the basis of genomics*. Journal of Chromatography A, 965 (2002) 163–173.
- [23] Y. Baba, L. Zhang, *Nucleic acids and their constituents, chromatographic methods*, w: E. Heftmann (edytor) Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part A: Fundamentals and techniques, Elsevier Science; 6 wydanie, 2004.
- [24] D. Farbis, P. A. Limbach, *From Structural Biology to Drug Discovery: New Roles for Mass Spectrometry of Nucleic Acids*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 21 (2010) R1-R4.
- [25] G. M. Blackburn, *Nucleic Acid in Chemistry and Biology*. The Royal Society of Chemistry, Wielka Brytania, 2006.
- [26] W. Struck, M. Waszczuk-Jankowska, R. Kaliszan, M. J. Markuszewski, *The state-of-the-art determination of urinary nucleosides using chromatographic techniques “hyphenated” with advanced bioinformatic methods*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 401 (2011) 2039-2050.
- [27] M. J. Markuszewski, W. Struck, M. Waszczuk-Jankowska, R. Kaliszan, *Metabolomic approach for determination of urinary nucleosides as potential tumor markers using electromigration techniques*. Electrophoresis, 31 (2010) 2300-2310.
- [28] W. Struck-Lewicka, R. Kaliszan, M. J. Markuszewski, *Analysis of urinary nucleosides as potential cancer markers determined using LC-MS technique*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 101 (2014) 50-57.
- [29] P. Yeung, L. Ding, W. L. Casley, *HPLC assay with UV detection for determination of RBC purine nucleotide concentrations and application for biomarker study in vivo*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 47 (2008) 377-382.
- [30] C. Bolin, F. Cardozo-Pelaez, *Assessing biomarkers of oxidative stress: Analysis of guanosine and oxidized guanosine nucleotide triphosphates by high performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Journal of Chromatography B, 856 (2007) 121-130.
- [31] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, S. Martínez-López, I. Vasallo, M. Hernández-Córdoba, *Anion exchange liquid chromatography for the determination of nucleotides in baby and/or functional foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(16) (2009) 7245-7249.
- [32] N. Yamaoka, Y. Kudo, K. Inazawa, S. Inagawa, M. Yasuda, K. Mawatari, K. Nakagomi, K. Kaneko, *Simultaneous determination of nucleosides and nucleotides in dietary foods and beverages using ion-pairing liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 878 (2010) 2054-2060
- [33] J. Czarnecka, M. Cieślak, M. Komoszyński, *Application of solid phase extraction and high-performance liquid chromatography to qualitative and quantitative analysis of nucleotides and nucleosides in human cerebrospinal fluid*. Journal of Chromatography B, 822 (2005) 85-90.
- [34] A. Gil, *Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides*. European Journal of Clinical Nutrition, 56 (2002) 1-4.
- [35] J. R. Hess, N. A. Greenberg, *The role of nucleotides in the immune and gastrointestinal systems: potential clinical applications*. Nutrition in Clinical Practice, 27(2) (2012) 281-294.
- [36] C. B. Rees, *Oligo- and poly- nucleotides: 50 years of chemical synthesis*. Organic Biomolecular Chemistry, 3 (2005) 3851-3868.
- [37] E. Urban, C. R. Noe, *Structural modifications of antisense oligonucleotides*. Il Farmaco, 58 (2003) 243-258.
- [38] N. Dias, C. A. Stein, *Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms*. Molecular Cancer Therapeutics, 1 (2002) 347–355.
- [39] D. Pan, C. Xiaoyan, Z. Guodong, Z. Dafang, *Bioanalysis of an oligonucleotides and its metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 52 (2010) 571–579.
- [40] A. C. McGinnis, B. Chen, M. G. Bartlett, *Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides*. Journal of Chromatography B, 883-884 (2012) 76-94.
- [41] P. Viñas, N. Campillo, G. Férrez Melgarejo, M. I. Vasallo, Ignacio López-García, M. Hernández-Córdoba, *Ion-pair high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to dual electrospray atmospheric pressure chemical ionization time-of-flight mass spectrometry for the determination of nucleotides in baby foods*. Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 5197-5203.
- [42] W. Y. Hsu, W. D. Lin, Y. Tsai, C. T. Lin, H. C. Wang, L. B. Jeng, C. C. Lee, Y. C. Lin, C. C. Lai, F. J. Tsai, *Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human breast cancer*

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

- by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Clinica Chimica Acta*, 412 (2011) 1861-1866.
- [43] Z. M. Qian, J. B. Wan, Q. W. Zhang, S. P. Li, *Simultaneous determination of nucleobases, nucleosides and saponins in Panax notoginseng using multiple columns high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48 (2008) 1361–1367.
- [44] L. Gong, J. S. O. McCullagh, *Comparing ion-pairing reagents and sample dissolution solvents for ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis of oligonucleotides. Rapid Commun Mass Spectrom*, 28 (2014) 339-350.
- [45] A. C. McGinnis, E. C. Grubb, M. G. Bartlett, *Systematic optimization of ion-pairing agents and hexafluoroisopropanol for enhanced electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotides. Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27 (2013) 2655-1664.
- [46] M. B. Beverly, *Applications of mass spectrometry to the study of siRNA. Mass Spectrometry Reviews*, 30 (2011) 979-998.
- [47] [H1] S. Studzińska, B. Buszewski, *A new way to fast and high resolution determination of modified nucleosides. Journal of Chromatography B*, 887 (2012) 93-101.
- [48] [H2] S. Studzińska, B. Buszewski, *Effect of mobile phase pH on the retention of nucleotides on different stationary phases for high performance liquid chromatography. Analytical Bioanalytical Chemistry*, 405(5) (2013) 1663-72.
- [49] [H3] S. Studzińska, R. Rola, B. Buszewski, *Determination of nucleotides in infant milk formulas using novel dendrimer ion-exchangers. Journal of Chromatography B*, 949-950 (2014), 87-93.
- [50] [H4] S. Studzińska, B. Buszewski, *Analysis of normal and modified nucleosides in urine samples by high-performance liquid chromatography with different stationary phases. Biomedical Chromatography*, 28 (2014) 1140-1146.
- [51] [H5] S. Studzińska, B. Buszewski, *Evaluation of ultra high performance liquid chromatography columns for the analysis of unmodified and antisense oligonucleotides. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 7127-7136.
- [52] [H6] S. Studzińska, L. Pietrzak, B. Buszewski, *The effects of stationary phases on retention and selectivity of oligonucleotides in IP-RP-HPLC. Chromatographia*, 77 (2014) 1589-1596.
- [53] [H7] S. Studzińska, S. Mounicou, J. Szpunar, R. Łobiński, B. Buszewski, *New approach to the determination phosphorothioate oligonucleotides by ultra high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. Analytica Chimica Acta*, 855 (2015) 13-20.
- [54] [H8] S. Studzińska, B. Buszewski, *Different approaches of Quantitative Structure-Retention Relationships in the prediction of oligonucleotides retention. Journal of Separation Science*, 2015, DOI: 10.1002/jssc.201401395
- [55] C. L. Andrews, A. Harsch, P. Vouros, *Analysis of the in vitro digestion of modified DNA to oligonucleotides by LC-MS and LC-MS/MS. International Journal of Mass Spectrometry*, 231 (2004) 169-177.
- [56] M. J. Dickman, *Effects of sequence and structure in the separation of nucleic acids using ion pair reverse phase liquid chromatography. Journal of Chromatography A*, 1076 (2005) 83-89.
- [57] C. Perrin, L. Meyer, C. Mujahid, C.J. Blake, *The analysis of 5'-mononucleotides in infant formulae by HPLC. Food Chemistry*, 74 (2001) 245.
- [58] J. Aussenac, D. Chassagne, C. Claparols, M. Charpentier, B. Duteurtre, M. Feuillat, C. Charpentier, *Purification method for the isolation of monophosphate nucleotides from Champagne wine and their identification by mass spectrometry. Journal of Chromatography A*, 907 (2001) 155.
- [59] M. Cichna, M. Raab, H. Daxecker, A. Griesmacher, M. M. Müller, P. Markl, *Determination of fifteen nucleotides in cultured human mononuclear blood and umbilical vein endothelial cells by solvent generated ion-pair chromatography. Journal of Chromatography B*, 787 (2003) 381.
- [60] J. J. Pesek, M. T. Matyska, M. T. W. Hearn, R. I. Boysen, *Aqueous normal-phase retention of nucleotides on silica hydride columns. Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 1140.
- [61] L. Coulier, H. Gerritsen, J. J. A. van Kampen, M. L. Reedijk, T. M. Luider, A. D. M. E. Osterhaus, R. A. Gruters, L. Brüll, *Simultaneous Quantification of Intracellular Natural and Antiretroviral Nucleosides and Nucleotides by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 2772.
- [62] K. E. Lokits, P. A. Limbach, J. A. Caruso, *Interfaces for capillary LC with ICPMS detection: a comparison of nebulizers/spray chamber configurations. Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24 (2009) 528-534.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

- [63] R. N. Easter, K. K. Kreoning, J. A. Caruso, P. A. Limbach, *Separation and identification of oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)–inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS)*. *Analyst*, 135 (2010) 2560-2565.
- [64] P. Deng, X. Chen, G. Zhang, D. Zhong, *Bioanalysis of an oligonucleotide and its metabolites by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52 (2010) 571-579.
- [65] Z. J. Lin, W. Li, G. Dai, *Application of LC–MS for quantitative analysis and metabolite identification of therapeutic oligonucleotides*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (2007) 330-341.
- [66] X. Wei, G. Dai, Z. Liu, H. Cheng, Z. Xie, R. Klisovic, G. Marcucci, K. K. Chan, *Enzyme Kinetics of GTI-2040, a Phosphorothioate Oligonucleotide Targeting Ribonucleotide Reductase*. *Drug Metabolism and Disposition*, 36 (2008) 2227-2233.

Sylwia Studnińska