



**Politechnika
Śląska**

Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii

ROZPRAWA DOKTORSKA

Dyscyplina nauki chemiczne

Zmiany metabolizmu wtórnego wybranych organizmów żywych
jako źródło sygnału w pomiarach analitycznych

Przewodnik po monotematycznym cyklu publikacji

mgr inż. Marianna Kostina-Bednarz

Promotor: **dr hab. inż. Hanna Barchańska, prof. PŚ**

Promotor pomocniczy: **dr inż. Joanna Płonka**

GLIWICE 2025

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej. Ukończenie tej pracy nie byłoby możliwe bez ich wsparcia, życzliwości i zaangażowania.

*Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do **Pani promotor, dr hab. inż. Hanny Barchańskiej, prof. PŚ.** Dziękuję za nieocenione wsparcie merytoryczne, cenne wskazówki, inspirujące dyskusje oraz zaangażowanie na każdym etapie realizacji tej pracy. Pani Profesor, dziękuję za okazaną mi cierpliwość, życzliwość i wiarę w powodzenie tego projektu badawczego.*

*Równie gorąco dziękuję **Pani Promotor, dr inż. Joannie Płonce.** Jestem wdzięczna za Pani merytoryczny wkład, cenne uwagi analityczne oraz nieustające zaangażowanie w rozwiązywanie problemów badawczych. Pani wsparcie i wnikliwość stanowiły nieocenioną pomoc w przezwyciężaniu napotkanych trudności.*

*Serdeczne podziękowania składam również wszystkim **Koleżankom, Kolegom oraz Pracownikom Politechniki Śląskiej i Politechniki Krakowskiej,** których spotkałam na swojej drodze naukowej. Dziękuję za stworzenie twórczej i inspirującej atmosfery, za wszelką życzliwość i gotowość do pomocy.*

*Najcieplejsze podziękowania składam moim **Rodzicom, Teściom, całej Rodzinie oraz Przyjaciółom.** Dziękuję za Waszą bezwarunkową miłość, wsparcie, zrozumienie i nieustanną wiarę w moje możliwości. Wasza cierpliwość i pomoc w codziennych obowiązkach dały mi przestrzeń niezbędną do ukończenia tego ważnego etapu w moim życiu.*

*Pracę tę dedykuję dwóm najważniejszym mężczyznom w moim życiu – **synkowi Remigiuszowi i mężowi Jackowi.** Dziękuję Wam za miłość, cierpliwość i wyrozumiałość, które były dla mnie najcenniejszym wsparciem i pozwalały zachować równowagę podczas tej wieloletniej naukowej podróży.*

Streszczenie

Przedłożona dysertacja podejmuje współczesne wyzwania chemii analitycznej w obszarze oceny skutków narażenia organizmów żywych na związki egzogenne, redefiniując podejście z tradycyjnego pomiaru przyczyny (stężenia ksenobiotyku) na analizę skutku (odpowiedzi metabolicznej organizmu). Stanowi to uzupełnienie klasycznych metod analitycznych, które, choć dostarczają dokładnych danych ilościowych, nie odzwierciedlają pełnej złożoności interakcji na poziomie metabolomu. Główna teza badawcza zakłada, że profil metaboliczny, a w szczególności wzorzec zmian w metabolizmie wtórnym, stanowi czułe i wiarygodne źródło sygnału analitycznego, pozwalające na wszechstronną ocenę skutków ekspozycji na ksenobiotyki. Weryfikację tej tezy, stanowiącą główny cel pracy, przeprowadzono w ramach wieloetapowej strategii badawczej, integrującej zaawansowane techniki oparte na platformie LC-MS z narzędziami chemometrycznymi. Wstępne badania, zrealizowane na organizmie modelowym *Saccharomyces cerevisiae* potwierdziły, że kontakt z ksenobiotykami i ich produktami przemian indukuje charakterystyczne i mierzalne zmiany w profilu metabolicznym. W kolejnym etapie badania rozszerzono na rośliny uprawne (pszenicę i jęczmień), porównując działanie biopestycydów (hinokitiol, skopoletyna, umbeliferon) z pestycydami syntetycznymi (tebukonazol, kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy). Analiza metabolomiczna okazała się narzędziem o wysokiej czułości, zdolnym do różnicowania subtelnych skutków biologicznych wywołanych przez związki o odmiennych mechanizmach działania. Dodatkowo, śledzenie losów substancji macierzystych i ich produktów transformacji w tkankach roślin potwierdziło skuteczność przyjętego podejścia także w odniesieniu do złożonych matryc biologicznych. Opracowane metodyki posłużyły jako podstawa do stworzenia i zastosowania metody przesiewowej do analizy rzeczywistych próbek roślin jadalnych, co pozwoliło na walidację jej potencjału diagnostycznego. W rezultacie, niniejsza rozprawa doktorska, której fundament stanowi cykl pięciu publikacji naukowych, dostarcza nauce i praktyce zwalidowane procedury analityczne o szerokim zastosowaniu w toksykologii środowiskowej, zrównoważonym rolnictwie i ochronie zdrowia publicznego, wnosząc tym samym znaczący wkład w rozwój badań interdyscyplinarnych.

Abstract

The presented dissertation addresses the contemporary challenges of analytical chemistry in assessing the effects of exposing living organisms to exogenous compounds, redefining the approach from the traditional measurement of the cause (xenobiotic concentration) to the analysis of the effect (the organism's metabolic response). This complements classical analytical methods, which, although providing precise quantitative data, do not capture the full complexity of interactions at the metabolome level. The main research hypothesis posits that the metabolic profile, and in particular the pattern of changes in secondary metabolism, constitutes a sensitive and reliable source of an analytical signal, enabling a comprehensive assessment of the effects of xenobiotic exposure. The verification of this hypothesis, which was the main objective of the work, was conducted through a multi-stage research strategy that integrated advanced techniques based on the LC-MS platform with chemometric tools. Preliminary studies on the model organism *Saccharomyces cerevisiae* confirmed that contact with xenobiotics and their transformation products induces characteristic and measurable changes in the metabolic profile. In the subsequent stage, the research was extended to crop plants (wheat and barley), comparing the effects of biopesticides (hinokitiol, scopoletin, umbelliferone) with synthetic pesticides (tebuconazole, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid). Metabolomic analysis proved to be a highly sensitive tool capable of differentiating the subtle biological effects caused by compounds with different mechanisms of action. Furthermore, tracking the fate of the parent substances and their transformation products within plant tissues confirmed the effectiveness of the adopted approach, even in complex biological matrices. The developed methodologies served as the basis for creating and applying a screening method for the analysis of real samples of edible plants, which allowed for the validation of its diagnostic potential. As a result, this doctoral dissertation, founded on a series of five scientific publications, provides science and practice with validated analytical procedures for broad application in environmental toxicology, sustainable agriculture, and public health, thereby making a significant contribution to the advancement of interdisciplinary research.

Spis treści

Streszczenie	3
Abstract	4
Spis treści	5
Wykaz skrótów i akronimów.....	6
Lista jednotematycznych publikacji	8
Wkład autorski.....	9
Rozdział 1. Wprowadzenie	10
1.1. Tło i znaczenie badań	10
1.2. Zadania badawcze i hipotezy weryfikowane w toku badań.....	12
Rozdział 2. Przegląd literatury.....	19
2.1. Odpowiedź metaboliczna organizmów na stres ksenobiotyczny	19
2.2. Metabolity wtórne jako biomarkery narażenia	23
2.3. Zaawansowane strategie analityczne w badaniach metabolomicznych	24
2.4. Metodologia analityczna w badaniach metabolomicznych	28
2.5. Chemometria w analizie metabolomicznej	32
Rozdział 3. Omówienie wyników badań własnych	36
3.1. Badanie biotransformacji farmaceutyków i ich wpływu na metabolom drożdży	38
3.2. Porównanie odpowiedzi metabolicznej zbóż na pestycydy syntetyczne i naturalne	41
3.3. Identyfikacja biomarkerów narażenia na pestycydy w roślinach jadalnych.....	46
Rozdział 4. Podsumowanie i wnioski końcowe.....	59
Bibliografia.....	63
Wykaz rysunków i tabel.....	69
Wykaz dorobku naukowego	70

Wykaz skrótów i akronimów

Akronim/skrót	Termin w języku polskim	Termin w języku angielskim
2,4-D	kwask 2,4-dichlorofenoksyoctowy	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
5-HIAA	kwask 5-hydrokxyindolooctowy	5-hydroxyindole-3-acetic acid
5-HT	5-hydrokxytryptamina	5-hydroxytryptamine
AMT	amantadyna	amantadine
ATFA	kwask 2-amino-4-(trifluorometylo)benzoesowy	2-amino-4-(trifluoromethyl)benzoic acid
CHD	cykloheksano-1,3-dion	cyclohexane-1,3-dione
DA	dopamina	dopamine
DAM	metabolit o różnicowanej zawartości	differentially abundant metabolite
DDA	akwizycja zależna od danych	data-dependent acquisition
DSPC	algorytm rzadkich korelacji cząstkowych z korektą obciążenia	debiased sparse partial correlation
E	epinefryna	epinephrine
EMC	wzmocnione skanowanie jonów wielokrotnie naładowanych	enhanced multiple charge
EMS	wzmocnione skanowanie MS	enhanced MS scan
EPI	wzmocnione skanowanie jonów potomnych	enhanced product ion
ER	skanowanie w podwyższonej rozdzielczości	enhanced resolution
ESI	jonizacja przez elektrozropraszanie	electrospray ionization
FC	krotność zmiany	fold change
FDR	współczynnik fałszywych odkryć	false discovery rate
GC	chromatografia gazowa	gas chromatography
HIN	hinokitiol	hinokitiol
HRMS	spektrometria mas wysokiej rozdzielczości	high resolution mass spectrometry
KEGG	Encyklopedia Genów i Genomów z Kioto	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L-Arg	L-arginina	L-arginine
LC	chromatografia cieczowa	liquid chromatography
LC-MS/MS	chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LIT	liniowa pułapka jonowa	linear ion trap
LLE	ekstrakcja ciecz-ciecz	liquid-liquid extraction
LOD	granica wykrywalności	limit of detection
LOQ	granica oznaczalności	limit of quantification
L-Phe	L-fenylalanina	L-phenylalanine
L-Trp	L-tryptofan	L-tryptophan

L-Tyr	L-tyrozyna	L-tyrosine
ME	efekt matrycowy	matrix effect
MRL	najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości	maximum residue level
MRM	monitorowanie reakcji wielokrotnych	multiple reaction monitoring
MS	spektrometria mas	mass spectrometry
MS/MS	tandemowa spektrometria mas	tandem mass spectrometry
nDATA	niecelowana akwizycja danych do analizy celowanej	non-target data acquisition for target analysis
NE	norepinefryna	norepinephrine
NL	utrata cząsteczki obojętnej	neutral loss
NMN	normetanefryna	normetanephrine
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy	nuclear magnetic resonance
NTBC	nityzynon 2-[2-nitro-4-(trifluorometylo)benzoilo]cykloheksano-1,3-dion	nitisinone 2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]cyclohexane-1,3-dione
NTFA	kwas 2-nitro-4-(trifluorometylo)benzoesowy	2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoic acid
OPLS-DA	ortogonalna analiza dyskryminacyjna metodą częściowych najmniejszych kwadratów	orthogonal partial least squares discriminant analysis
PCA	analiza składowych głównych	principal component analysis
PI	skanowanie jonów pierwotnych	precursor ion scan
PLS-DA	analiza dyskryminacyjna metodą częściowych najmniejszych kwadratów	partial least squares discriminant analysis
Q	kwadrupol	quadrupole
QC	kontrola jakości	quality control
QqQ	potrójny kwadrupol	triple quadrupole
RMT	rymantadyna	rimantadine
SCOP	skopoletyna	scopoletin
SPE	ekstrakcja do fazy stałej	solid phase extraction
SPME	mikroekstrakcja do fazy stałej	solid phase microextraction
TBC	tebukonazol	tebuconazole
TOF	czas przelotu	time-of-flight
TRA	tyramina	tyramine
TRYP	tryptamina	tryptamine
UMB	umbeliferon	umbelliferone
VIP	wskaźnik istotności zmiennej w projekcji	variable importance in projection
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia	World Health Organization

Lista jednotematycznych publikacji

Niniejszą rozprawę stanowi monotematyczny cykl artykułów naukowych opublikowanych w latach 2023–2025 w czasopismach rejestrowanych w bazie Journal Citation Records (JCR).

[P1] **Kostina-Bednarz, M.***; Płonka, J.; Barchańska, H. Allelopathy as a source of bioherbicides: challenges and prospects for sustainable agriculture. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **2023**, 22, 471–504, doi: 10.1007/s11157-023-09656-1. **(140 pkt MEiN, IF: 14.4)**

[P2] Płonka J.; **Kostina-Bednarz, M.**; Barchańska, H.* Targeted analysis, metabolic profiling, and fingerprinting based on an LC(GC)-MS approach for the comprehensive evaluation of pesticide content in edible plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2025**, 1–26, doi: 10.1080/10408347.2024.2449062 **(100 pkt MEiN, IF: 5.2)**

[P3] Barchańska, H.; Płonka, J.; Nowak, P.; **Kostina-Bednarz, M.*** Metabolic profiles and fingerprints for the investigation of the influence of nitisinone on the metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific Reports* **2023**, 13, 1473, doi: 10.1038/s41598-023-28335-3. **(140 pkt MEiN, IF: 4.6)**

[P4] **Kostina-Bednarz, M.***; Płonka, J.; Barchańska H. Metabolic profiling to evaluate the impact of amantadine and rimantadine on the secondary metabolism of a model organism. *Scientific Reports* **2023**, 13, 16822, doi: 10.1038/s41598-023-43540-w. **(140 pkt MEiN, IF: 4.6)**

[P5] **Kostina-Bednarz, M.***; Płonka, J.; Perkons, I.; Bartkevics, V.; Barchańska, H. Pesticides of natural origin as safer alternatives to synthetic pesticides: Identification of hinokitiol, tebuconazole and 2,4-D metabolites and evaluation of their impact on cereals. *Science of The Total Environment* **2025**, 973, 179177, doi: 10.1016/j.scitotenv.2025.179177. **(200 pkt MEiN, IF: 8.0)**

* autor korespondencyjny

$$\sum_{IF(P1-P5)} = 36.8 \qquad \sum_{MEiN(P1-P5)} = 720$$

$$\sum_{\text{liczba cytowań } (P1-P5)} = 81 \qquad \text{h-index} = 2$$

Wkład autorski

Oświadczam, że jestem współautorem przedstawionego cyklu publikacji [P1–P5], w publikacjach [P1, P3–P5] jestem autorem wiodącym. Mój udział obejmował wszystkie etapy procesu badawczego od opracowania koncepcji i metodologii, poprzez realizację badań i walidację metod, aż po analizę, interpretację oraz wizualizację uzyskanych wyników. Jako autor korespondencyjny byłam odpowiedzialna za przygotowanie manuskryptów, prowadzenie korespondencji z edytorami czasopism oraz wprowadzanie poprawek redakcyjnych zgodnie z sugestiami recenzentów. Do moich obowiązków należało także pozyskiwanie środków finansowych na realizację badań.

Szczegółowe oświadczenia pozostałych współautorów publikacji wchodzących w skład wspomnianego cyklu, określające ich indywidualny wkład, znajdują się w załącznikach do niniejszej rozprawy.

Rozdział 1. Wprowadzenie

1.1. Tło i znaczenie badań

Współczesne nauki chemiczne stoją wobec narastających wyzwań, które wynikają z intensyfikacji przemian środowiskowych, postępu technologicznego oraz rosnących wymagań w zakresie ochrony zdrowia publicznego, bezpieczeństwa żywności i jakości środowiska naturalnego. Procesy te generują złożone problemy badawcze, których rozwiązanie wymaga rozwoju i wdrażania coraz bardziej zaawansowanych procedur analitycznych, umożliwiających precyzyjne wykrywanie i oznaczanie substancji chemicznych w złożonych matrycach. W klasycznym ujęciu, ich zadaniem jest generowanie sygnału analitycznego – mierzalnej odpowiedzi instrumentu pomiarowego, która w idealnych warunkach jest jednoznacznie powiązana z rodzajem lub ilością analitu w próbce [1]. Pozycja tego sygnału, traktowana jako wielkość statyczna określająca stałe lub chwilowe warunki w jakich sygnał jest wyzwalany, świadczy o tożsamości związku, a jego intensywność, jako wielkość dynamiczna (związana ze zjawiskami energetycznymi typowymi dla danej techniki pomiarowej), jest proporcjonalna do jego stężenia [2]. Jednakże w rzeczywistych, złożonych układach, takich jak żywność pochodząca od organizmów żywych oraz próbki biologiczne, ten prosty związek przyczynowo-skutkowy ulega zaburzeniu. Sygnał analityczny nie jest jednoznacznym wskaźnikiem obecności poszukiwanego związku, a jego intensywność może być modulowana przez liczne czynniki instrumentalne, zmienność fizykochemiczną matrycy oraz obecność licznych substancji przeszkadzających. Ponadto w ocenie bezpieczeństwa żywności i środowiska, kluczowe staje się zrozumienie, że nie samo stężenie znanej toksyny, lecz sumaryczny efekt biologiczny wywołany przez nią i jej, często nieznane, produkty transformacji, stanowi rzeczywistą miarę zagrożenia [3]. Powszechnie stosowane procedury analityczne, ukierunkowane na wykrywanie z góry zdefiniowanej listy związków, okazują się w tym przypadku niewystarczające, gdyż ignorują metaboliczny skutek narażenia organizmu na różnego rodzaju ksenobiotyki. W rezultacie, zasadniczym aspektem nowoczesnych badań analitycznych staje się nie tylko opracowanie skutecznych procedur przygotowania próbek i wykorzystanie zaawansowanych technik instrumentalnych, ale również redefinicja samego źródła informacji analitycznej.

Jednym z istotnych obszarów współczesnych badań jest analiza mechanizmów metabolizmu wtórnego, aktywowanych jako odpowiedź organizmu na różnorodne bodźce środowiskowe i chemiczne [4]. W odróżnieniu od metabolitów podstawowych, metabolity wtórne – takie jak alkaloidy, flawonoidy, lignany, fenole, aminy biogenne oraz pochodne szlaku kwasu szikimowego – nie uczestniczą bezpośrednio w podstawowych procesach życiowych, lecz pełnią funkcje sygnałowe, obronne oraz regulacyjne, wpływając na zdolność organizmu do adaptacji i utrzymania homeostazy. Ich profil ulega znacznym zmianom w odpowiedzi na działanie substancji egzogennych, takich jak pestycydy, farmaceutyki oraz inne ksenobiotyki obecne w środowisku [5]. Odczytanie i zinterpretowanie tak złożonego sygnału wymaga integracji zaawansowanych technik instrumentalnych z metodami bioinformatycznymi i chemometrycznymi. Nowoczesne podejście metabolomiczne obejmuje nie tylko identyfikację obecnych w próbce metabolitów, ale także ocenę zmian ich stężeń w czasie, analizę współwystępowania oraz modelowanie zależności pomiędzy szlakami metabolicznymi. Wykorzystanie profili metabolomicznych jako narzędzia do identyfikacji biomarkerów narażenia, oceny wpływu substancji chemicznych na organizmy żywe a także projektowania bezpiecznych środków ochrony roślin stanowi obecnie interdyscyplinarny front badań w toksykologii środowiskowej, naukach o żywności i zrównoważonym rolnictwie.

Niniejsza rozprawa doktorska, oparta na cyklu pięciu publikacji naukowych, stanowi spójną i wieloaspektową odpowiedź na potrzebę interdyscyplinarnego ujęcia problematyki zmian w metabolizmie wtórnym organizmów żywych w odpowiedzi na działanie związków egzogennych. W pracy tej zaproponowałam nowatorskie podejście, integrujące zaawansowane techniki instrumentalne z modelowaniem chemometrycznym, w celu wyjaśnienia złożonych oddziaływań biologiczno-chemicznych na poziomie metabolicznym. Przedstawiony tok badawczy – od badań podstawowych na organizmach modelowych po analizy próbek rzeczywistych – pokazuje, że zmiany metaboliczne mogą stanowić czułe i wiarygodne źródło sygnału analitycznego. Otwiera to nowe perspektywy dla oceny ryzyka środowiskowego i zdrowotnego oraz dla rozwoju technologii wspierających zrównoważone systemy produkcji żywności.

1.2. Zadania badawcze i hipotezy weryfikowane w toku badań

Współczesne wyzwania chemii analitycznej, zwłaszcza w kontekście bezpieczeństwa żywności, zdrowia publicznego oraz ochrony środowiska, wymagają pogłębionych i interdyscyplinarnych badań nad oddziaływaniem potencjalnie toksycznych substancji egzogennych na metabolizm wtórny organizmów żywych. Kluczowe znaczenie mają tu zarówno leki, jak i środki ochrony roślin, których obecność w środowisku i produktach spożywczych może prowadzić do złożonych zmian biochemicznych i fizjologicznych w narażonych organizmach [6]. Powszechne podejścia analityczne, koncentrujące się wyłącznie na oznaczaniu związków macierzystych, często okazują się jednak niewystarczające do pełnej oceny ryzyka, pomijając złożony wpływ metabolitów i produktów transformacji tych związków. W odpowiedzi na te ograniczenia, w niniejszej rozprawie doktorskiej zaproponowałam przesunięcie punktu ciężkości w podejściu analitycznym: od pomiaru *przyczyny* (stężenia ksenobiotyku) do pomiaru *skutku* (odpowiedzi metabolicznej organizmu). W tym nowatorskim podejściu to właśnie odpowiedź metaboliczna organizmu, a w szczególności zmiany w profilu metabolizmu wtórnego, stają się źródłem sygnału analitycznego. Na podstawie tej koncepcji sformułowałam następującą hipotezę główną, stanowiącą oś przewodnią całej mojej pracy:

Profil metaboliczny organizmu, a w szczególności wzorzec zmian w metabolizmie wtórnym, stanowi czułe i wiarygodne źródło sygnału analitycznego. Umożliwia on kompleksową ocenę skutków ekspozycji na ksenobiotyki, która wykracza poza tradycyjny pomiar stężenia substancji macierzystej i jej znanych produktów transformacji.

Wspólnym mianownikiem, który spaja wszystkie etapy niniejszej pracy, jest ukierunkowanie badań na przemiany aminokwasów i amin biogennych zachodzące w wybranych organizmach żywych w odpowiedzi na narażenie na ksenobiotyki. Wybór tej grupy związków stanowił fundament koncepcyjny, podyktowany ich kluczową rolą jako prekursorów cząsteczek sygnałowych (m.in. neuroprzekaźników, hormonów, fitoaleksyn) oraz ich wysoką wrażliwością na działanie ksenobiotyków. Dzięki tej właściwości, zmiany w profilu tych związków stały się doskonałym wskaźnikiem do oceny rzeczywistego skutku biologicznego, pozwalając na spójną analizę wpływu zróżnicowanych substancji – od farmaceutyków po pestycydy – i weryfikację głównej tezy rozprawy.

Koncepcja i etapy badań

Przejście od koncepcji do jej empirycznej weryfikacji wymagało opracowania wieloetapowego planu badawczego, którego konstrukcja odzwierciedlała logiczny postęp od badań fundamentalnych do aplikacyjnych. Ewolucja ta pozwoliła na systematyczne budowanie wiedzy, odpowiedni dobór i walidację stosowanych narzędzi i stopniowe potwierdzanie hipotez częściowych.

Etap I: Badania podstawowe na organizmie modelowym.

Pierwszy etap badań, obejmujący opracowanie i walidację podejścia analitycznego, zrealizowałam w uproszczonym, wysoce kontrolowanym systemie biologicznym. Jako eukariotyczny organizm modelowy wykorzystałam drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, oceniając ich odpowiedź na farmaceutyki o dobrze poznanym mechanizmie działania: nityzynon (2-[2-nitro-4-(trifluorometylo)benzoilo]cykloheksano-1,3-dion, NTBC) oraz leki przeciwwirusowe – amantadynę (AMT) i rymantadynę (RMT). Dobór tych substancji był podyktowany ich udokumentowanym wpływem na szlaki metaboliczne obejmujące biosyntezę aminokwasów aromatycznych i amin biogennych, co pozwoliło na celowaną weryfikację założeń badawczych [7,8]. Moim celem było potwierdzenie fundamentalnego założenia, że analiza zmian w profilu metabolitów wtórnych może być czułym wskaźnikiem stresu chemicznego i umożliwia odróżnienie efektów wywołanych przez substancję macierzystą i jej metabolity.

Etap II: Badania aplikacyjne – poszukiwanie alternatyw dla pestycydów syntetycznych.

Po potwierdzeniu poprawności podejścia w systemie modelowym, kontynuowałam moje badania na organizmach o znacznie większej złożoności i praktycznym znaczeniu – roślinach uprawnych. Na tym etapie moim głównym celem była ocena porównawcza wpływu pestycydów konwencjonalnych i naturalnych na metabolizm pszenicy zwyczajnej *Triticum aestivum* i jęczmienia zwyczajnego *Hordeum vulgare*. Jako reprezentantów powszechnie stosowanych pestycydów syntetycznych wybrałam fungicyd tebukonazol (TBC) i herbicyd kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D). Z kolei za ich bezpieczniejsze, naturalne odpowiedniki posłużyły hinokitiol (HIN), umbeliferon (UMB) i skopoletyna (SCOP). Na tym etapie, dzięki nawiązaniu współpracy naukowej, znacząco rozszerzyłam stosowaną metodykę badawczą. Oprócz profilowania metabolicznego i analizy metabolicznego odcisku palca z wykorzystaniem

chromatografii cieczowej (ang. *liquid chromatography*, LC) sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (ang. *tandem mass spectrometry*, MS/MS) oraz spektrometrią mas wysokiej rozdzielczości (ang. *high resolution mass spectrometry*, HRMS). Technika ta umożliwiła identyfikację nieznanych dotąd produktów transformacji pestycydów w tkankach roślinnych, a także znaczące poszerzenie zakresu analizowanych związków endogennych.

Etap III: Weryfikacja metody w próbkach rzeczywistych i identyfikacja biomarkerów narażenia.

Końcowym etapem moich badań, pozwalającym na ocenę skuteczności opracowanej metodyki, było jej zastosowanie do analizy rzeczywistych próbek pochodzenia roślinnego. Materiał badawczy, uzyskany we współpracy z akredytowanym laboratorium analitycznym, stanowiły rośliny jadalne dostępne w handlu. próbki podzieliłam na dwie kategorie. Grupę badaną stanowiły próbki z potwierdzonymi przekroczeniami najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości (ang. *maximum residue levels*, MRL), natomiast grupę kontrolną – próbki, w których stężenia pestycydów mieściły się poniżej MRL. Celem tego etapu było zweryfikowanie, czy w badanych próbkach można zidentyfikować uniwersalny wzorzec zaburzeń metabolicznych, który służyłby jako sygnał analityczny pozwalający na wykrycie narażenia na pestycydy, bez konieczności oznaczania pozostałości tych ksenobiotyków. Badania te pozwoliły zidentyfikować spójny zestaw biomarkerów, wspólnych dla różnych matryc roślinnych.

Ogólna koncepcja badawcza oraz sekwencja zrealizowanych etapów, prowadzących od badań na prostych organizmach modelowych do weryfikacji w złożonych matrycach roślin jadalnych, zostały schematycznie przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie etapów badawczych, zastosowanych strategii i kluczowych wyników

Etap	Czynnik stresowy	Materiał badawczy	Strategia analityczna	Wynik
Etap I	AMT, RMT	drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- analiza celowana (profilowanie metaboliczne z użyciem LC-MS/MS) - analiza niecelowana (metaboliczny odcisk palca z użyciem LC-MS/MS)	Wykazanie, że wolniej metabolizowana AMT wywołuje silniejszy i trwalszy efekt metaboliczny niż RMT. Identyfikacja specyficznych markerów chemicznych dla obu leków.
Etap II	NTBC, NTFA, ATFA, CHD	drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- analiza celowana (profilowanie metaboliczne z użyciem LC-MS/MS) - analiza niecelowana (metaboliczny odcisk palca z użyciem LC-MS/MS)	Potwierdzenie, że produkty transformacji (głównie CHD) wywierają znacznie silniejszy wpływ na metabolizm wtórny niż substancja macierzysta (NTBC), co waliduje hipotezę o kluczowej roli metabolitów.
	HIN, UMB, SCOP, TBC, 2,4-D	pszenica <i>Triticum aestivum</i> jęczmień <i>Hordeum vulgare</i>	- analiza celowana (profilowanie metaboliczne z użyciem LC-MS/MS) - analiza niecelowana (metaboliczny odcisk palca z użyciem LC-MS/MS) - identyfikacja produktów transformacji z użyciem LC-HRMS	Udowodnienie, że pestycydy syntetyczne (TBC, 2,4-D) indukują silne i trwałe zaburzenia metaboliczne, podczas gdy pestycydy naturalne (HIN, UMB) wywołują znacznie słabsze i odmienne jakościowo zmiany. Zidentyfikowano nowe produkty transformacji TBC, 2,4-D, HIN, SCOP i UMB.
Etap III	Pestycydy	jabłka, truskawki, pomarańcze, cytryny, mandarynki, ogórki, pomidory, papryka, chili	- analiza celowana (profilowanie metaboliczne z użyciem LC-MS/MS) - analiza niecelowana (metaboliczny odcisk palca z użyciem LC-MS/MS) - analiza przesiewowa (identyfikacja biomarkerów z użyciem LC-MS/MS)	Identyfikacja uniwersalnego panelu 15 biowskaźników (m.in. fitohormony, poliaminy, fenole), których wzorzec zmian stanowi spójny sygnał analityczny świadczący o stresie pestycydowym, niezależnie od rodzaju matrycy i pestycydu.

Hipotezy szczegółowe

Realizacja tak zdefiniowanego programu badawczego pozwoliła na sformułowanie i weryfikację następujących hipotez szczegółowych:

1. Celowana ekspozycja organizmu modelowego *Saccharomyces cerevisiae* na leki (NTBC, AMT, RMT) i ich metabolity indukuje charakterystyczne, mierzalne i powtarzalne zmiany w profilu metabolizmu wtórnego, obejmujące szlaki aminokwasów aromatycznych i amin biogennych, co pozwala na walidację podejścia metabolomicznego jako narzędzia do różnicowania skutków działania poszczególnych substancji.
2. Pestycydy pochodzenia naturalnego (HIN, UMB, SCOP) wywołują w tkankach roślin uprawnych (pszenica, jęczmień) znacząco słabsze i odmienne jakościowo zaburzenia metaboliczne w porównaniu do powszechnie stosowanych pestycydów syntetycznych (TBC, 2,4-D), co potwierdza ich potencjał jako bezpieczniejszych alternatyw w zrównoważonej ochronie roślin.
3. Zastosowanie techniki LC-HRMS pozwala na identyfikację nieznaną dotąd produktów transformacji ksenobiotyków w organizmie modelowym, a analiza zmian ich zawartości w czasie umożliwia pełniejszą ocenę wywołanego przez nie skutku biologicznego.
4. W próbkach rzeczywistych produktów roślinnych, obciążonych pozostałościami różnorodnych pestycydów, możliwe jest zidentyfikowanie zbioru potencjalnych biomarkerów narażenia, które tworzą spójny sygnał analityczny świadczący o ogólnym stresie metabolicznym, niezależnym od rodzaju ksenobiotyku i matrycy roślinnej.

Zadania badawcze

Weryfikacja powyższych hipotez wymagała realizacji następujących, precyzyjnie zdefiniowanych przeze mnie zadań badawczych:

1. Przeprowadzenie krytycznej analizy literatury, która pozwoliła na określenie zadań badawczych i ukierunkowanie prac eksperymentalnych. Wnioski z tych studiów literaturowych zostały ujęte w formie dwóch opublikowanych artykułów przeglądowych, stanowiących teoretyczne podstawy rozprawy. Pierwszy z nich dotyczył potencjału zjawiska allelopatii w rozwoju biopestycydów, natomiast drugi zastosowania zintegrowanych technik analitycznych w badaniach metabolomicznych nad wpływem ksenobiotyków [P1, P2].
2. Opracowanie i walidacja zintegrowanego podejścia analitycznego, łączącego LC-MS/MS oraz wielowymiarową analizę danych, w celu ilościowej oceny wpływu wybranych leków (NTBC, AMT, RMT) na metabolizm wtórny organizmu modelowego (*S. cerevisiae*) [P3, P4].
3. Zastosowanie i rozszerzenie opracowanej metodyki, poprzez włączenie techniki LC-HRMS, do przeprowadzenia porównawczej oceny wpływu pestycydów naturalnych (HIN, UMB, SCOP) i syntetycznych (TBC, 2,4-D) na metabolizm zbóż (pszenica, jęczmień) [P5].
4. Identyfikacja i charakterystyka strukturalna kluczowych produktów transformacji badanych pestycydów oraz endogennych biomarkerów efektu w tkankach roślinnych, w celu pogłębionego zrozumienia mechanizmów biochemicznych leżących u podstaw obserwowanej odpowiedzi metabolicznej [P5].
5. Weryfikacja skuteczności i praktycznej użyteczności podejścia metabolomicznego jako narzędzia do badań przesiewowych w kierunku narażenia na pestycydy, niezależnych od oznaczania pozostałości (ang. *residue-independent screening*), w rzeczywistych próbkach roślin jadalnych.

Uzasadnienie naukowe i znaczenie pracy

Uzasadnienie postawionych hipotez wynika z dotychczasowych doniesień naukowych oraz wyników badań własnych [P3–P5], które wskazują, że metabolizm wtórny drożdży i roślin jest wrażliwy na działanie substancji egzogennych i ich metabolitów. Wykazałam, że zarówno leki, jak i pestycydy syntetyczne oraz allelopatyki mogą indukować zmiany m.in. w zawartości amin biogennych i aminokwasów, co przekłada się na funkcjonowanie kluczowych szlaków metabolicznych, odporność organizmu na stres oraz jakość i bezpieczeństwo żywności. Zastosowanie zaawansowanych technik analitycznych, takich jak LC-MS/MS i LC-HRMS, oraz metod chemometrycznych umożliwia nie tylko detekcję tych zmian, ale także ich ilościową i jakościową charakterystykę, co stanowi podstawę do identyfikacji biomarkerów narażenia i oceny skutków oddziaływania substancji egzogennych. Realizacja powyższych zadań badawczych i weryfikacja hipotez pozwoliła na pogłębienie wiedzy o mechanizmach odpowiedzi organizmów na ksenobiotyki, ocenę bezpieczeństwa stosowania wybranych substancji oraz rozwój nowoczesnych narzędzi analitycznych do oceny zmian metabolicznych w kontekście bezpieczeństwa żywności, toksykologii środowiskowej i zrównoważonego rolnictwa.

Rozdział 2. Przegląd literatury

2.1. Odpowiedź metaboliczna organizmów na stres ksenobiotyczny

2.1.1. Metabolizm wtórny drożdży

Drożdże, a w szczególności gatunek *Saccharomyces cerevisiae*, należą do najlepiej poznanych i najczęściej wykorzystywanych organizmów modelowych w biologii molekularnej, genetyce oraz biotechnologii. Ich unikalna wartość naukowa i aplikacyjna wynika z wyjątkowej prostoty hodowli, krótkiego czasu generacji, łatwości manipulacji genetycznej oraz wysokiego stopnia podobieństwa podstawowych procesów komórkowych względem wyższych eukariontów, w tym człowieka [9]. Organizmy te, pomimo swojej niewielkiej złożoności strukturalnej, odznaczają się wysokim stopniem konserwatyzmu wielu szlaków metabolicznych, co czyni je wyjątkowo użytecznymi w badaniach nad podstawowymi procesami komórkowymi, a także jako modele w badaniach toksykologicznych, farmakologicznych oraz metabolomicznych [10].

Złożone szlaki metaboliczne oraz struktura komórkowa drożdży, obejmująca zorganizowane jądro i system organelli, umożliwiają prowadzenie szczegółowych badań mechanizmów, które w dużej mierze są analogiczne do tych obserwowanych w komórkach ludzkich. Drożdże wykazują znaczącą zgodność genetyczną z człowiekiem – szacuje się, że niemal połowa ich genów posiada ortologi w genomie ludzkim, a wiele z nich może być funkcjonalnie zastąpionych przez odpowiedniki występujące u *Homo sapiens* [9]. Całkowicie zsekwencjonowany genom *S. cerevisiae* oraz zaawansowane narzędzia inżynierii genetycznej umożliwiają precyzyjne modyfikacje, w tym ekspresję genów pochodzących od innych organizmów. Pozwala to na modelowanie oraz analizę funkcji ludzkich białek i szlaków metabolicznych w prostym, kontrolowanym układzie eksperymentalnym [11].

Choć drożdże nie są klasycznymi producentami metabolitów wtórnych w takim zakresie jak rośliny wyższe, wykazują zdolność do syntezy wybranych klas związków wtórnych, głównie pochodnych aminokwasów aromatycznych oraz poliamin. Związki te, choć nie są niezbędne do podstawowego funkcjonowania komórki, pełnią funkcje regulacyjne, sygnałowe, ochronne i adaptacyjne. Ich biosynteza często zachodzi w odpowiedzi na zmienne warunki środowiskowe lub obecność czynników stresowych. Podstawową grupą metabolitów wtórnych produkowanych przez *S. cerevisiae* są produkty degradacji aminokwasów aromatycznych L-feniloalaniny (L-Phe), L-tyrozyny (L-Tyr) i L-tryptofanu (L-Trp) syntetyzowane w szlaku kwasu szikimowego. Aminokwasy te ulegają deaminacji, dekarboksylacji i redukcji w ramach

tw. szlaku Ehrlicha, prowadzącego do powstania alkoholi fuzlowych (np. fenyloetanolu, tryptofolu). Niezależnie, w wyniku bezpośredniej dekarboksylacji aminokwasów aromatycznych, mogą również powstawać aminy biogenne. Związki te odgrywają istotną rolę w komunikacji chemicznej wewnątrz kolonii, wpływają na dynamikę wzrostu populacji, adaptację do stresu oraz równowagę redoks w komórce [12].

Drugą ważną grupą związków zaliczanych do metabolitów wtórnych u drożdży są poliaminy, zwłaszcza putrescyna, spermidyna i agmatyna. Pełnią one rolę w regulacji cyklu komórkowego, stabilizacji struktur kwasów nukleinowych oraz ochronie komórki przed stresem oksydacyjnym i osmotycznym [13]. Ich obecność jest często związana z mechanizmami adaptacyjnymi, a nie z podstawowymi funkcjami metabolicznymi, co uzasadnia zaliczenie ich do kategorii metabolitów wtórnych w ujęciu funkcjonalnym. W organizmach eukariotycznych, takich jak drożdże, poliaminy stanowią także czynniki modulujące ekspresję genów i aktywność enzymów [14]. Z uwagi na wysoką homologiczność wielu szlaków metabolicznych z organizmami wyższymi, *S. cerevisiae* jest powszechnie wykorzystywany jako organizm modelowy w badaniach nad toksycznością, bioaktywnością i metabolizmem substancji biologicznie czynnych, w tym związków o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym. Szczególne znaczenie mają tu badania nad wpływem leków na szlaki przemian aminokwasów aromatycznych, które w licznych aspektach odzwierciedlają procesy zachodzące w komórkach ludzkich [15]. Drożdże są również wykorzystywane jako platforma do ekspresji heterologicznej genów roślinnych lub ludzkich, co umożliwia produkcję wybranych związków wtórnych oraz ich modyfikację biotransformacyjną [16].

Badania przeprowadzone na modelu *S. cerevisiae* stanowiły zatem fundamentalny etap weryfikacji koncepcji metodologicznej rozprawy. Pozwoliły one, w kontrolowanym i relatywnie prostym systemie eukariotycznym, na opracowanie i walidację procedur analitycznych oraz na potwierdzenie hipotezy, iż metabolity ksenobiotyków mogą wywierać silniejszy wpływ na endogenne szlaki biochemiczne niż związki macierzyste. Jednakże, aby w pełni zrealizować zadania badawcze określone w pracy i odnieść wnioski do realnych wyzwań z zakresu bezpieczeństwa żywności i rolnictwa, konieczne było przeniesienie badań na organizmy o wyższym stopniu złożoności, których metabolizm wtórny jest nieporównywalnie bogatszy i odgrywa bezpośrednią rolę w interakcjach ze środowiskiem. Wybór roślin wyższych

jako kolejnego obiektu badań był zatem naturalnym i logicznym krokiem w przyjętym, progresywnym toku badawczym.

2.1.2. Metabolizm wtórny roślin

Metabolizm wtórny roślin stanowi niezwykle złożony i dynamiczny system biochemiczny, będący rezultatem ewolucyjnej adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych oraz presji biotycznych i abiotycznych. W przeciwieństwie do metabolizmu pierwotnego, który obejmuje procesy niezbędne do wzrostu i rozwoju, metabolizm wtórny generuje ogromną różnorodność związków chemicznych, które pełnią istotne funkcje w interakcjach roślin ze środowiskiem, ochronie przed patogenami i roślinożercami, a także w regulacji procesów rozwojowych i sygnalizacyjnych [17]. Jak szeroko omówiłam w publikacji przeglądowej **[P1]**, będącej częścią niniejszego cyklu rozprawy, metabolity wtórne mają fundamentalne znaczenie nie tylko jako efekторы oddziaływań ekologicznych, lecz także jako regulatory procesów fizjologicznych i adaptacyjnych, warunkujących sukces ewolucyjny roślin. Głębokie poznanie tych mechanizmów stanowi warunek *sine qua non* dla rozwoju ekologicznych alternatyw wobec syntetycznych środków ochrony roślin, a potrzeba syntezy wiedzy w tym obszarze stała się bezpośrednią inspiracją dla przygotowania tej publikacji przeglądowej.

Biosynteza metabolitów wtórnych opiera się na wyspecjalizowanych szlakach, które wywodzą się z centralnych procesów pierwotnych, takich jak glikoliza, cykl kwasu cytrynowego oraz szlak pentozofosforanowy. Szczególne znaczenie mają tu trzy główne ścieżki: szlak kwasu szikimowego (prowadzący do aminokwasów aromatycznych i fenylopropanoidów), dwa szlaki prowadzące do izoprenoidów – mewalonianowy oraz metyloerytrytolo-fosforanowy – a także szlaki metabolizmu kwasów tłuszczowych [18]. Produkty tych ścieżek stanowią substraty do syntezy głównych klas metabolitów wtórnych, takich jak fenole (m.in. flawonoidy, taniny), terpenoidy (m.in. monoterpeny, karotenoidy) oraz alkaloidy [19]. Systematyczną klasyfikację tych grup związków, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału jako naturalnych bioherbicydów, szczegółowo przedstawiłam w publikacji przeglądowej **[P1]**. Złożoność i różnorodność metabolizmu wtórnego wynika z ewolucyjnej plastyczności genów kodujących enzymy tych szlaków oraz z precyzyjnych, wielopoziomowych mechanizmów regulacji, które obejmują poziom transkrypcyjny, gdzie decydującą rolę odgrywają rodziny czynników transkrypcyjnych, a także sygnalizacja hormonalna [20]. Hormony roślinne, takie jak kwas jasmonowy, kwas salicylowy i etylen, odgrywają istotną rolę w sieciach sygnałowych,

które integrują bodźce środowiskowe, co indukuje ekspresję genów obronnych i umożliwia roślinom szybkie reagowanie na stres [21]. Jak wskazano w pracy przeglądowej [P1], czynniki stresowe, zarówno biotyczne, jak i abiotyczne, często potęgują syntezę tych związków, co jest mechanizmem o dużym potencjale aplikacyjnym w rolnictwie.

Funkcje metabolitów wtórnych są niezwykle szerokie, a ich głównym zadaniem jest obrona rośliny przed niekorzystnymi biotycznymi i abiotycznymi czynnikami zewnętrznymi. W uprawach zbóż takich jak pszenica i jęczmień, stanowiących fundament globalnego bezpieczeństwa żywnościowego, za pierwszą linię obrony przed patogenami i owadami odpowiadają m.in. benzoksazynoidy oraz alkaloidy indolowe [22]. Z kolei liczne terpenoidy (np. mentol, limonen, karwakrol) wykazują silne właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybicze, modulując jednocześnie szlaki odpornościowe. Związki fenolowe, takie jak flawonoidy, chronią tkanki przed szkodliwym promieniowaniem UV, co stanowi formę naturalnej fotoprotekcji [23]. Drugą fundamentalną rolą metabolitów wtórnych jest komunikacja chemiczna i oddziaływania międzygatunkowe. Szczególnie istotnym aspektem jest tu allelopatia — zdolność roślin do wytwarzania i uwalniania do środowiska związków chemicznych wpływających na wzrost i rozwój innych organizmów. Związki allelopatyczne, takie jak kumaryny (np. UMB, SCOP) oraz fenolokwasy, mogą hamować kiełkowanie i wzrost roślin konkurencyjnych poprzez generowanie stresu oksydacyjnego oraz zaburzanie transportu hormonów [24]. Potencjał aplikacyjny tych związków jako naturalnych bioherbicydów szczegółowo omówiłam w publikacji przeglądowej [P1], będącej częścią cyklu rozprawy. W publikacji tej scharakteryzowałam mechanizmy działania allelochemikaliów, ich wpływ na fizjologię roślin konkurencyjnych, a także wyzwania związane z ich praktycznym wykorzystaniem, takie jak ich stabilność, specyficzność działania oraz interakcje z mikrobiomem glebowym.

Współczesne badania nad metabolizmem wtórnym roślin wykorzystują zaawansowane narzędzia genomiki, transkryptomiki, proteomiki i metabolomiki. Integracja danych uzyskanych za pomocą tych narzędzi pozwala na kompleksową analizę profili metabolicznych, identyfikację nowych szlaków biosyntezy oraz zrozumienie złożonych mechanizmów regulacyjnych [25]. Jak podsumowałam w publikacji [P1], zastosowanie tych nowoczesnych technik, a także narzędzi biotechnologicznych i bioinformatycznych, jest niezbędne do pełnego wykorzystania potencjału allelopatii w uprawie roślin i projektowaniu nowych, ekologicznych

strategii zarządzania agrosystemami. Zrozumienie tych złożonych, dynamicznych mechanizmów ma fundamentalne znaczenie nie tylko dla nauk podstawowych, ale także dla rozwoju innowacyjnych strategii w zrównoważonym rolnictwie, ochronie środowiska oraz biotechnologii, umożliwiając projektowanie roślin o pożądanych cechach użytkowych.

2.2. Metabolity wtórne jako biomarkery narażenia

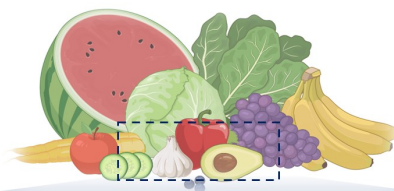
Intensyfikacja współczesnej produkcji rolnej, zwłaszcza w zakresie upraw o strategicznym znaczeniu żywnościowym, takich jak zboża, jest nierozdzielnie związana z masowym stosowaniem pestycydów. Pełna ocena skali zagrożenia chemicznego, jakie niosą te praktyki, wykracza jednak dalece poza ramy rutynowego monitoringu samych substancji aktywnych. Po wprowadzeniu do agroekosystemu, substancje te podlegają złożonym kaskadom przemian biotycznych i abiotycznych, generując szerokie spektrum produktów transformacji, które nierzadko charakteryzują się wyższą toksycznością, podwyższoną trwałością lub większą mobilnością niż związki macierzyste [26,27]. Akumulacja tych produktów transformacji, często dotąd niezidentyfikowanych i niekontrolowanych, w jadalnych częściach roślin stanowi fundamentalne wyzwanie dla obowiązujących systemów oceny ryzyka.

W odpowiedzi na presję chemiczną wywołaną przez pestycydy i ich metabolity, organizmy roślinne uruchamiają złożone mechanizmy adaptacyjne, których precyzyjnym odzwierciedleniem są dynamiczne zmiany w profilu metabolitów wtórnych. Jak szczegółowo opisałam w publikacji [P2], wchodzącej w monotematyczny cykl rozprawy, zmiany te stanowią czułe i wiarygodne źródło informacji o skali i charakterze presji chemicznej, pozwalając na ocenę skutków narażenia. Związki te pełnią dwoistą funkcję: z jednej strony jako integralne elementy endogennych systemów detoksykacji, aktywnie uczestniczą w neutralizacji reaktywnych form tlenu oraz w procesach sprzęgania i unieszkodliwiania ksenobiotyków. Z drugiej zaś strony, unikalny wzorzec zmian w ich profilu ilościowym i jakościowym staje się swoistym biochemicznym „odciskiem palca” narażenia. Ten mierzalny wzorzec metaboliczny umożliwia identyfikację specyficznych biomarkerów charakterystycznych dla danej substancji lub klasy związków [28]. Zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO), biomarkery są wskaźnikami zmian, jakie mogą zachodzić w układach biologicznych w wyniku oddziaływania różnych czynników szkodliwych, mogących mieć charakter chemiczny, fizyczny lub biologiczny [29].

Wspomniane biomarkery można sklasyfikować na podstawie mechanizmu ich genezy. Pierwszą grupę stanowią biomarkery ekspozycji – bezpośrednie produkty biotransformacji ksenobiotyku (np. jego hydroksylowane pochodne lub koniugaty z glutationem), których obecność jednoznacznie dowodzi narażenia. Drugą kategorię tworzą biomarkery efektu, często uznawane za cenniejsze z perspektywy oceny stanu fizjologicznego rośliny [30]. Są to endogenne metabolity, których profil stężeń ulega charakterystycznym zmianom w odpowiedzi na stres. W przypadku zbóż, takich jak pszenica i jęczmień, ekspozycja na pestycydy syntetyczne prowadzi do istotnych zmian w profilu fenylopropanoidów, flawonoidów (np. apigeniny) i benzoksazynoidów [18,31,32]. Mechanizmy leżące u podstaw tych zmian mogą być związane z działaniem pestycydów na kluczowe enzymy, takie jak cytochrom P450, uczestniczące zarówno w detoksykacji, jak i biosyntezie wspomnianych metabolitów wtórnych [30]. Pełna interpretacja zmian w profilu metabolicznym wymaga uwzględnienia ich dynamiki czasowej oraz złożonych mechanizmów regulacyjnych. Odpowiedź metaboliczna może mieć charakter ostry (zmiany wykrywalne w ciągu godzin) lub chroniczny, odzwierciedlając długotrwałe narażenie na niskie stężenia, co może prowadzić do trwałych zmian w ekspresji genów [33]. Proces ten jest kontrolowany na wielu poziomach, w tym poprzez czynniki transkrypcyjne oraz sieć sygnalizacji hormonalnej (m.in. kwasu salicylowego i jasmonowego), gdzie sygnały stresowe są integrowane, prowadząc do powstania złożonych wzorców metabolicznych [34].

2.3. Zaawansowane strategie analityczne w badaniach metabolomicznych

Metabolom, jako dynamiczny zbiór wszystkich związków małocząsteczkowych, stanowi chemiczne odzwierciedlenie aktualnego stanu fizjologicznego lub patologicznego organizmu, a jego badanie dostarcza kluczowych informacji o zachodzących w nim procesach biochemicznych. Jednakże wysoka złożoność matrycy oraz szeroki zakres stężeń poszczególnych związków sprawiają, że jednoczesna identyfikacja i oznaczenie wszystkich składników metabolomu w ramach jednej analizy jest w praktyce niemożliwe. Analiza złożonych zależności metabolicznych wymaga zastosowania zaawansowanych strategii analitycznych, które wykształciły się w dwa główne, komplementarne podejścia metabolomiczne – analizę celowaną i niecelowaną [35]. Zasadnicze różnice w założeniach, metodyce i zakresie uzyskiwanej informacji dla obu tych podejść przedstawiłam na Rysunku 1.



	 Analiza celowana	 Analiza niecelowana
Cel badawczy i hipoteza	Oznaczenie ograniczonej liczby wcześniej zdefiniowanych metabolitów. Służy do weryfikacji konkretnych hipotez badawczych.	Globalne, kompleksowe profilowanie metabolomu w celu odkrywania nowych biomarkerów i generowania hipotez. Celem jest uzyskanie „metabolicznego odcisku palca”.
Przygotowanie próbek	Procedury ekstrakcji zoptymalizowane dla konkretnych analitów. Często obejmują ekstrakcje do fazy stałej (SPE), derywatyzację lub hydrolizę w celu maksymalizacji odzysku analitów.	Procedury uniwersalne, mające na celu ekstrakcję jak najszerzego spektrum związków o różnej polarności, np. przy użyciu mieszanin metanolu, acetonitrylu, wody.
Analiza instrumentalna	Wykorzystanie tandemowego spektrometru mas (MS/MS), najczęściej z analizatorem typu potrójny kwadrupol (QqQ). Analiza prowadzona jest w trybie monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM), co zapewnia najwyższą czułość i selektywność.	Zastosowanie spektrometru mas wysokiej rozdzielczości (HRMS), np. z analizatorem czasu przelotu lub pułapką jonową, w trybie pełnego skanowania mas. Pozwala to na akwizycję kompleksowych danych i dokładny pomiar masy jonów.
Przetwarzanie danych	Proces zautomatyzowany, oparty na integracji pików chromatograficznych i oznaczanie z użyciem krzywych kalibracyjnych. Oprogramowanie jest zoptymalizowane pod kątem analizy ilościowej.	Złożony proces obliczeniowy wymagający specjalistycznego oprogramowania. Obejmuje konwersję surowych danych, detekcję cech (pików), wyrównanie czasów retencji i dekonwolucję sygnałów.
Opracowanie wyników	Stosunkowo prosta analiza statystyczna (np. testy <i>t</i>-Studenta, ANOVA) w celu porównania stężeń między grupami.	Zaawansowana wielowymiarowa analiza statystyczna (PCA, PLS-DA, OPLS-DA) w celu identyfikacji wzorców i cech różnicujących grupy badawcze.
Identyfikacja i interpretacja	Identyfikacja jest jednoznaczna, oparta na porównaniu czasu retencji i widma fragmentacyjnego analitu z certyfikowanym wzorcem analitycznym.	Identyfikacja jest wyzwaniem i często ma charakter domniemany (ang. <i>putative</i>). Poszukiwanie wzoru strukturalnego związku w bazach danych.
Kontrola jakości	Rygorystyczna walidacja metody analitycznej zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi (np. wyznaczenie LOD, LOQ, liniowości, precyzji, dokładności).	Kluczowe jest monitorowanie stabilności systemu (próbki QC), identyfikacja składników przeszkadzających (próbki ślepe) oraz walidacja modeli statystycznych w celu uniknięcia nadmiernego dopasowania.

Rysunek 1. Porównanie dwóch głównych strategii analitycznych stosowanych w badaniach metabolomicznych.

Jak szczegółowo przeanalizowałam w publikacji [P2], wchodzącej w skład monotematycznego cyklu niniejszej rozprawy, obie strategie są komplementarne i oferują różne perspektywy badawcze – od oznaczenia znanych związków po odkrywanie nowych biomarkerów i nieoczekiwanych zmian metabolicznych. Celowana analiza metabolomiczna (ang. *metabolite target analysis*) dotyczy z góry zdefiniowanej grupy związków i koncentruje się na ich oznaczeniu, co pozwala na szczegółowe monitorowanie dynamiki zmian w wybranych, znanych szlakach metabolicznych [36]. Analiza ta jest ukierunkowana na konkretne pytania badawcze i może dostarczyć szczegółowych informacji na temat zmian metabolicznych w określonych warunkach, ponieważ polega na wyznaczeniu ścisłych poziomów stężeń istotnych metabolitów biorących udział w konkretnych przemianach biochemicznych. Ponadto, pozwala na porównanie otrzymanych wartości stężeń z wynikami uzyskiwanymi w innych badaniach, bądź z wynikami uznanymi za wartości referencyjne [29]. Jest to podejście kluczowe z perspektywy oceny ryzyka toksykologicznego i środowiskowego, gdyż pozwala na weryfikację czy stężenie ksenobiotyków w badanych matrycach nie przekracza ustalonych norm bezpieczeństwa. Mimo swej niezawodności i dobrze zdefiniowanych procedur walidacyjnych, fundamentalnym ograniczeniem tego typu analiz jest fakt, że uzyskuje się informacje wyłącznie o związkach wcześniej uwzględnionych w metodzie, co uniemożliwia detekcję nieoczekiwanych ksenobiotyków i ich produktów transformacji [36].

W ramach celowanej analizy metabolomicznej można wyróżnić profilowanie metaboliczne (ang. *metabolic profiling*), które polega na jednoczesnym oznaczaniu grupy związków o podobnych właściwościach fizykochemicznych, pochodzących z tych samych szlaków metabolicznych lub należących do tej samej klasy biochemicznej (np. profilowanie aminokwasów, kwasów tłuszczowych, hormonów roślinnych). Profilowanie to może mieć charakter zarówno jakościowy jak i ilościowy, zapewniając szczegółowy wgląd w stan konkretnych ścieżek metabolicznych [37]. Poszukiwanie biomarkerów narażenia w tym podejściu polega na porównaniu profili metabolicznych między grupą kontrolną a grupą poddaną narażeniu, co pozwala wskazać istotne różnice pod względem obecności, ilości lub proporcji występujących metabolitów.

W odpowiedzi na ograniczenia analiz celowanych rozwinięto podejście analizy niecelowanej (ang. *non-targeted metabolomics analysis*), które nie wymaga wstępnego definiowania analitów i ma na celu scharakteryzowanie jak największej liczby metabolitów występujących w badanym

materiale [35]. Analiza niecelowana obejmuje dwa główne podejścia: metabolicznego odcisku palca (ang. *metabolic fingerprinting*) oraz metabolicznego odcisku stopy (ang. *metabolic footprinting*). Pierwsza strategia polega na analizie profilu endogennych metabolitów wewnątrzkomórkowych i określaniu różnic między badanymi grupami. Podejście drugie opiera się na analizie metabolitów, które są uwalniane z komórek lub organizmu do środowiska zewnętrznego [29]. Metaboliczny odcisk palca to koncepcja globalna, której celem nie jest identyfikacja pojedynczych związków, ale uzyskanie unikalnego, całościowego profilu biochemicznego próbki i porównywanie go między grupami eksperymentalnymi, dlatego wykonuje się pełną analizę wszystkich związków obecnych w badanym materiale [29]. Strategia ta pozwala na ocenę ogólnej odpowiedzi metabolicznej organizmu na dany czynnik, na przykład stres wywołany ksenobiotykiem. W rezultacie, *fingerprinting* prowadzi do odkrycia nowych biomarkerów narażenia lub efektu, które w istotny sposób charakteryzują odpowiedź organizmu na czynniki stresowe [38]. Analiza przesiewowa potencjalnych związków (ang. *suspect screening*) jest podejściem pośrednim między analizą celowaną a w pełni niecelowaną, którego celem jest identyfikacja w próbce związków, których obecności można się spodziewać na podstawie wcześniejszej wiedzy, lecz bez posiadania ich wzorców analitycznych [26]. Lista potencjalnych metabolitów jest tworzona w oparciu o specjalistyczne bazy danych, literaturę oraz platformy bioinformatyczne, które przewidują szlaki metaboliczne związków.

Niezależnie od wybranej strategii, jej wiarygodność zależy od rygorystycznej walidacji. O ile dla analizy celowanej istnieją szczegółowe wytyczne, o tyle walidacja metod niecelowanych jest procesem znacznie bardziej złożonym i wciąż stanowi aktywny przedmiot badań [39]. Ostatecznie, pełna ocena wpływu ksenobiotyków na systemy biologiczne wymaga zintegrowanego podejścia, które synergicznie łączy precyzję ilościową analizy celowanej z potencjałem eksploracyjnym analizy niecelowanej. Wybór konkretnej metodologii jest zawsze kompromisem między celami badawczymi a możliwościami sprzętowymi i wymaga dogłębnego zrozumienia potencjału oraz ograniczeń każdej ze strategii analitycznych. Jednocześnie, rozwój nowoczesnych trybów akwizycji, takich jak akwizycja danych w trybie niecelowanym do analizy celowanej (ang. *non-target data acquisition for target analysis*, nDATA), które, jak opisałam w publikacji [P2], łączą zalety obu strategii w jednym eksperymencie, otwiera nowe perspektywy w kompleksowej analizie próbek, doskonaląc proces badawczy [40].

2.4. Metodologia analityczna w badaniach metabolomicznych

Wdrożenie opisanych strategii analitycznych obejmuje sekwencję rygorystycznie kontrolowanych etapów, które determinują jakość i wiarygodność końcowych wyników. Jak przedstawiłam w publikacji [P2], stanowiącej krytyczny przegląd tych metodologii, każdy z tych etapów – od pobrania próbki, przez jej przygotowanie, aż po analizę instrumentalną i przetwarzanie danych – posiada swoje specyficzne wyzwania, których przezwyciężenie jest niezbędne dla sukcesu całego badania. Proces ten można podzielić na trzy fundamentalne fazy: i) projektowanie eksperymentu oraz zbieranie i przygotowanie materiału badawczego, ii) przygotowanie próbek do analizy, przeprowadzenie analiz i akwizycja danych analitycznych oraz iii) analiza bioinformatyczna i interpretacja wyników [29]. Podstawowym warunkiem uzyskania rzetelnych danych jest staranne zaprojektowanie badania. Fundamentalne znaczenie ma odpowiedni dobór i charakterystyka grup badawczych (kontrolnej i narażonej). Precyzyjne określenie i kontrola parametrów, takich jak np. w przypadku roślin odmiana lub genotyp, faza rozwojowa, warunki wzrostu oraz organ, z którego pobierany jest materiał, pozwala na minimalizację wpływu czynników zakłócających i naturalnej zmienności biologicznej [37]. Równie istotna jest standaryzacja procedur pobierania i przechowywania materiału. Z uwagi na dynamiczną naturę metabolomu, konieczne jest zapewnienie optymalnych i powtarzalnych warunków, w tym natychmiastowe zatrzymanie procesów metabolicznych po pobraniu próbki oraz minimalizacja liczby etapów jej przygotowania, które mogą prowadzić do transformacji analitów lub nienaturalnej aktywności enzymatycznej [41]. Dzięki temu obserwowane zmiany w profilu metabolicznym można z większą pewnością przypisać oddziaływaniu badanego ksenobiotyku.

W analizie celowanej niezbędnym elementem przygotowania próbki jest ekstrakcja, której sposób wykonania ma istotny wpływ na jakość otrzymanych wyników. Wybór metody ekstrakcyjnej jest podyktowany właściwościami fizykochemicznymi oznaczanych związków oraz koniecznością eliminacji składników przeszkadzających w celu zwiększenia czułości i specyficzności analiz [37,42]. W tym podejściu kluczowe jest osiągnięcie maksymalnej wydajności odzysku i powtarzalności dla z góry zdefiniowanej grupy analitów, dlatego procedury te są często wieloetapowe i rygorystycznie walidowane. Do najczęściej stosowanych w badaniach metabolomicznych technik ekstrakcyjnych należą ekstrakcja ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid extraction*, LLE), ekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid phase extraction*, SPE) oraz mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid phase microextraction*, SPME) [41].

W analizie niecelowanej, dążącej do jak najszerszego pokrycia metabolomu, preferuje się procedury o minimalnym stopniu ingerencji. Celem jest uniknięcie niezamierzonej utraty potencjalnie istotnych metabolitów, aby uzyskać jak najbardziej reprezentatywny obraz stanu metabolicznego próbki. Procedura musi być jednak dostosowana do rodzaju matrycy oraz wykorzystywanej techniki analitycznej. Dla matryc bogatobiałkowych niezbędnym krokiem jest deproteinacja, natomiast dla matryc o, z natury, niskiej zawartości białka i interferentów, procedura może być uproszczona do homogenizacji, wirowania i rozcieńczenia. Niezależnie od wybranej strategii, integralną częścią badań metabolomicznych jest rygorystyczna kontrola jakości. Kluczowym elementem tego procesu jest regularna analiza próbek kontroli jakości (ang. *Quality Control*, QC), które najczęściej są próbkami zbiorczymi (ang. *pooled samples*), przygotowanymi przez zmieszanie równych objętości wszystkich próbek badanych. Ich analiza, prowadzona w regularnych odstępach czasu w całej sekwencji, pozwala na monitorowanie stabilności i powtarzalności systemu analitycznego [39]. Uzupełnieniem kontroli jakości jest analiza próbek ślepych (ang. *blank samples*), wśród których wyróżnia się dwa główne typy. Próby ślepe proceduralne (ang. *procedural blanks*) to próbki czystego rozpuszczalnika, które przechodzą przez całą procedurę przygotowania, co umożliwia identyfikację potencjalnych źródeł kontaminacji pochodzących z odczynników, materiałów lub sprzętu laboratoryjnego. Z kolei próbki czystego rozpuszczalnika (ang. *solvent blanks*), wstrzykiwane bezpośrednio do systemu analitycznego, służą do oceny czystości samego układu pomiarowego oraz weryfikacji ewentualnego przeniesienia analitu między kolejnymi analizami (ang. *carry-over*) [39].

Po odpowiednim przygotowaniu, próbki poddaje się analizie instrumentalnej. Podstawowym wymogiem stawianym technikom wykorzystywanym w wielowymiarowej analizie metabolomu, jest zapewnienie wysokiej dokładności oraz selektywności oznaczeń. Umożliwia to rzetelną identyfikację szerokiego spektrum cząstek, w tym nieznanymi, o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i masach cząsteczkowych [36]. W badaniach metabolomicznych zastosowanie znajdują różne techniki spektroskopowe, takie jak magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR), spektroskopia Ramana oraz spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR), które łączone są z technikami rozdzielczymi. Niemniej jednak, jak potwierdza obszerna literatura naukowa, w ostatnich latach w badaniach metabolomicznych dominuje stosowanie spektrometrii mas (ang. *mass spectrometry*, MS) głównie w połączeniu LC lub z chromatografią gazową (ang. *gas chromatography*, GC), a ich przewaga wynika

z wysokiej czułości i selektywności w odniesieniu do badanych analitów [43]. Obecnie najczęściej łączy się chromatografy ze spektrometrami mas różnych typów, które pełnią rolę detektorów. Wybór konfiguracji instrumentalnej – w tym źródła jonów, analizatora mas i trybu akwizycji danych – jest ściśle uzależniony od właściwości fizykochemicznych analitów oraz założonego celu badawczego [44]. Z chromatografem sprzęga się jeden spektrometr lub dwa, np. z analizatorem kwadrupolowym (Q) i czasu przelotu – LC-Q-TOF (ang. *time-of-flight*, TOF). W wyniku połączenia dwóch spektrometrów mas otrzymuje się tandemowy spektrometr mas, co umożliwia uzyskanie szczególnie wysokiej rozdzielczości układu analitycznego. W wielu połączeniach z chromatografem stosuje się spektrometry wysokorozdzielcze [29,43]. Wszechstronność tych technik, wynikająca z szerokiego wyboru dostępnych konfiguracji instrumentalnych, została szczegółowo omówiona w pracy przeglądowej [P2], wchodzącej do monotematycznego cyklu rozprawy. W publikacji tej, na podstawie konkretnych przykładów literaturowych, scharakteryzowałam kluczowe elementy konfiguracji systemów GC-MS i LC-MS – w tym dobór warunków chromatograficznych, rodzaje źródeł jonów i typy analizatorów mas – w kontekście badań celowanych i niecelowanych w złożonych matrycach roślinnych.

W analizie celowanej najczęściej wykorzystuje się spektrometry mas typu potrójny kwadrupol (QqQ) pracujące w trybie monitorowania reakcji wielokrotnych (ang. *multiple reaction monitoring*, MRM). Tryb ten polega na podwójnej filtracji masy – wyborze jonu prekursorowego, jego fragmentacji i następnie selekcji charakterystycznego jonu produktu. Zapewnia to wyjątkową selektywność i czułość, umożliwiając oznaczenie analitów nawet przy bardzo niskich stężeniach [44]. Natomiast w analizie niecelowanej można zastosować różne tryby akwizycji danych, które pozwalają na szersze spojrzenie na metabolom, takie jak skanowanie w pełnym zakresie mas (ang. *full scan*) oraz skany selektywne, polegające na obserwowaniu reakcji fragmentacji, w których powstaje obojętna cząsteczka (ang. *neutral loss*, NL) i/lub obserwowaniu jonów macierzystych, z których powstaje wybrany fragment (ang. *precursor ion*, PI). Szczególne możliwości oferują tu hybrydowe spektrometry mas, takie jak systemy QTRAP, które łączą w sobie funkcjonalność potrójnego kwadrupola (umożliwiającą m.in. analizy w trybie MRM, PI oraz NL) z wysokoczułymi funkcjami skanowania charakterystycznymi dla liniowej pułapki jonowej (ang. *linear ion trap*, LIT), gdzie funkcję pułapki pełni trzeci kwadrupol. Tryby pracy detektora dostępne w takich systemach to wzmocnione MS (ang. *enhanced MS*, EMS), wzmocnione skanowanie jonów potomnych

(ang. *enhanced product ion*, EPI), skanowanie w podwyższonej rozdzielczości (ang. *enhanced resolution*, ER) oraz wzmocnione skanowanie jonów wielokrotnie naładowanych (ang. *enhanced multiple charge*, EMC) [36]. Tryb EMS jest to tryb *full scan*, w którym liniowa pułapka jonowa jest wykorzystywana do akumulacji jonów wygenerowanych przez źródło jonów przed ich analizą, co prowadzi do znacznego wzmocnienia sygnału i zwiększenia czułości. Chociaż EMS nie oferuje selektywności charakterystycznej dla MRM, jego wysoka czułość w trybie pełnego skanu jest niezwykle cenna w analizach przesiewowych i umożliwia efektywne wykrycie maksymalnej liczby potencjalnych analitów w próbce [44]. Tryb skanowania ER służy do pomiaru masy jonów z wyższą dokładnością i umożliwia określenie krotności ładunku jonu oraz umożliwia ocenę profilu izotopowego. Natomiast tryb EPI może być wykorzystany do potwierdzenia tożsamości wykrytych związków przez interpretację widm fragmentacyjnych lub przez przeszukiwanie bibliotek widm [36]

W analizie niecelowanej kluczowe znaczenie mają tryby akwizycji danych. Jak przedstawiłam w publikacji [P2], która stanowi krytyczny przegląd tych metodologii, analitycy mają do dyspozycji głównie dwa podejścia: akwizycję zależną od danych (ang. *data-dependent acquisition*, DDA) oraz akwizycję niezależną od danych (ang. *data-independent acquisition*, DIA). W trybie DDA spektrometr wykonuje najpierw szybki skan przeglądowy (*survey scan*), a następnie, w czasie rzeczywistym, wybiera jony o najwyższej intensywności i poddaje je fragmentacji w celu uzyskania widm fragmentacyjnych [40]. W systemach hybrydowych, takich jak QTRAP, zastosowanie takiego podejścia pozwala na łączenie różnych trybów pracy. Przykładowo skan przeglądowy wykonywany w trybie pułapki jonowej (np. EMS) lub potrójnego kwadrupola (np. skan PI) jest automatycznie przełączany na skan fragmentacyjny LIT dla wybranych jonów. Jest to tryb wysoce selektywny, jednak jego głównym ograniczeniem jest ryzyko pominięcia związków o niższej intensywności. Z kolei w trybie DIA fragmentacji poddawane są wszystkie jony w określonym zakresie mas, co pozwala na zebranie kompletnego, nieselektywnego obrazu fragmentacyjnego próbki, choć kosztem generowania bardzo złożonych widm [45].

Niezależnie od wybranego trybu, analiza niecelowana generuje ogromne ilości danych, których przetwarzanie stanowi fundamentalne wyzwanie. Konieczna jest selekcja istotnych sygnałów, co można osiągnąć na dwa sposoby. Pierwszy polega na redukcji danych już na etapie akwizycji, poprzez staranne zdefiniowanie kryteriów dla trybu DDA/DIA, takich jak zakres

rejestrowanych mas, progowa intensywność sygnału wymagana do uruchomienia fragmentacji, a także tolerancja masy [45]. Należy przy tym pamiętać, że na końcową liczbę i rodzaj wykrytych związków wpływa szereg czynników, w tym rodzaj matrycy, warunki przygotowania i pH próbki, parametry chromatograficzne oraz wybrany tryb jonizacji i pracy detektora [35]. We wspomnianej publikacji dogłębnie przeanalizowałam zalety, wady oraz komplementarne zastosowania obu trybów akwizycji, podkreślając, że ich właściwy dobór zależy od złożoności próbki i celów badania. Przykładem praktycznego zastosowania podejść niecelowanych jest zestawienie zawarte w Tabeli 3 tejże publikacji. Usystematyzowałam tam liczne przykłady badań, w których oceniano wpływ różnorodnych pestycydów na metabolizm roślin jadalnych, opisując dla każdego przypadku metodę ekstrakcji, warunki analizy i zastosowane modele chemometryczne, a także wskazano kluczowe markery metaboliczne i szlaki biochemiczne, które uległy zmianie pod wpływem danego związku [P2].

2.5. Chemometria w analizie metabolomicznej

Rosnąca złożoność i wielowymiarowość danych generowanych w badaniach metabolomicznych, zwłaszcza przy użyciu technik opartych na spektrometrii mas, wprowadza konieczność zastosowania zaawansowanych narzędzi chemometrycznych i bioinformatycznych. Chemometria, według definicji podanej przez International Chemometrics Society, jest dyscypliną chemii w której stosuje się metody statystyki, matematyki i inne wykorzystujące logikę formalną do i) oceny i interpretacji danych chemicznych (analitycznych), ii) optymalizacji i modelowania procesów i eksperymentów chemicznych oraz iii) wydobycia możliwie największej ilości informacji z danych eksperymentalnych [46,47]. Algorytmy wielowymiarowej eksploracji danych cechuje różnorodność, a podstawowe problemy, jakie można rozwiązywać przy ich pomocy, to m.in. wyszukiwanie wzorców i trendów, klasyfikacja obiektów, badanie ich podobieństwa oraz redukcja wymiarowości cech je opisujących. Prowadzi to do powstawania modeli matematycznych reprezentujących obiekty, na podstawie których można je grupować, prognozować ich nowe wartości zmiennych, a także optymalizować i kontrolować warunki jakie na nie wpływają [47].

W kontekście poszukiwania efektów narażenia organizmów żywych na ksenobiotyki narzędzia chemometryczne z jednej strony umożliwiają identyfikację pojedynczych metabolitów, których stężenie ulega istotnym zmianom, z drugiej zaś pozwalają na odkrywanie i modelowanie

globalnych wzorców odpowiedzi metabolicznej organizmu na stres chemiczny. Specyfika danych metabolomicznych, w tym wysoka wymiarowość (liczba zmiennych znacznie przewyższająca liczbę próbek) oraz obecność zmienności technicznej i biologicznej, narzuca konieczność wstępnej obróbki danych (ang. *preprocessing*). Wstępne etapy analizy chemometrycznej obejmują odszumianie (ang. *denoising*), nakładanie sygnałów (ang. *warping*), filtrowanie linii podstawowej (ang. *baseline filtering*), normalizację sygnałów (czasem nazywaną standaryzacją), centrowanie (ang. *centering*) oraz skalowanie (ang. *scaling*) [46,47]. Te procedury mają na celu minimalizację niepożądaną wariancji i przygotowanie danych do dalszych, bardziej zaawansowanych analiz statystycznych.

Większość metod chemometrycznych można zaliczyć do metod uczenia maszynowego (ang. *machine learning*), w wyniku których powstaje model chemometryczny, będący nauczonym (dopasowanym do danych) wynikiem działania algorytmu. Metody te dzielą się na metody uczenia z nadzorem (ang. *supervised methods*) i bez nadzoru (ang. *unsupervised methods*) [48]. Analiza głównych składowych, zwana również analizą czynników głównych (ang. *principal component analysis*, PCA), jest najczęściej stosowaną metodą analizy danych bez nadzoru, wyłącznie na podstawie wariancji [48]. Ta metoda analizy czynnikowej poprzez redukcję wymiarowości, pozwala na wizualizację naturalnej struktury danych, identyfikację potencjalnych grup, wykrycie próbek odstających oraz ocenę ogólnej jakości zbioru danych. Stanowi ona cenne narzędzie do wstępnej oceny, czy narażenie na określone ksenobiotyki jest na tyle silnym czynnikiem, by samodzielnie wyjaśnić zmienność w danych [37].

W celu identyfikacji zmiennych (metabolitów) odpowiedzialnych za różnicowanie grup, wykorzystuje się metody nadzorowane, które uwzględniają z góry znaną informację o przynależności próbek do klas (np. grupa kontrolna kontra grupa narażona). Jak przedstawiłam w publikacji przeglądowej stanowiącej część niniejszej rozprawy [P2], najczęściej stosowanymi metodami są analiza najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną (ang. *partial least squares discriminant analysis*, PLS-DA) oraz jej ortogonalny wariant (ang. *orthogonal partial least square*, OPLS-DA). Metody te modelują zależności między profilem metabolicznym a przynależnością do grupy, maksymalizując separację międzygrupową. W szczególności OPLS-DA, poprzez oddzielenie wariancji skorelowanej z przynależnością grupową od wariancji ortogonalnej, pozwala na budowę bardziej przejrzystych modeli. Kluczowym narzędziem interpretacyjnym w tych modelach są

wskaźniki istotności zmiennej w projekcji (ang. *variable importance in projection*, VIP), które określają wkład poszczególnych metabolitów w obserwowaną separację [49].

W praktyce podczas tworzenia modeli chemometrycznych niezbędna jest ich walidacja oraz ocena rzeczywistej zdolności predykcyjnej, co jest odrębnym zagadnieniem od samego dopasowania do danych. Ocena ta przeprowadzana jest na reprezentatywnej grupie próbek walidacyjnych o znanych parametrach. Doboru takiego zestawu można dokonać za pomocą algorytmów, np. Kennarda-Stone'a, które wybierają określoną liczbę jak najbardziej zróżnicowanych i reprezentatywnych próbek do testów walidacyjnych. Porównując średni błąd między wartościami rzeczywistymi a przewidywaniami modelu, określa się, czy spełnione są kryteria zdolności predykcyjnej [50]. Model osiąga najwyższą zdolność predykcyjną przy optymalnej kompleksowości, która eliminuje zarówno niedouczone (ang. *underfitted*), jak i nadmierne dopasowanie (ang. *overfitted*). Optymalny stopień złożoności ustala się podczas uczenia poprzez walidację krzyżową (ang. *cross-validation*) [51]. Dla różnych stopni złożoności tworzone są modele, w których kolejno wyklucza się jedną lub kilka obserwacji (np. metoda *leave-one-out*), następnie przewiduje te pominięte wartości, powtarzając proces iteracyjnie. Jako optymalną przyjmuje się kompleksowość, dla której błąd walidacji krzyżowej jest minimalny [48].

Ostateczna selekcja kandydatów na biomarkery rzadko opiera się jednak wyłącznie na wskaźnikach z modeli wielowymiarowych. W celu zapewnienia najwyższej rzetelności statystycznej, stosuje się komplementarne podejście, łączące analizę wielowymiarową z analizą jednowymiarową. Dla każdej zmiennej, wskazanej wstępnie przez wysoki wskaźnik VIP, oblicza się istotność statystyczną, wyrażoną jako wartość p (p -value), najczęściej przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) z uwzględnieniem korekty na testowanie wielokrotne, takiej jak kontrola współczynnika fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*, FDR) [38]. Równocześnie ocenia się istotność biologiczną, czyli wielkość zmiany, określaną za pomocą współczynnika krotności zmiany (ang. *fold change*, FC). Dopiero metabolity, które jednocześnie spełniają kryteria obu tych podejść (np. $VIP > 1$, $p\text{-value} < 0,05$ oraz $|FC| > 1,5$), są klasyfikowane jako metabolity o zróżnicowanej zawartości (ang. *differentially abundant metabolites*, DAMs) i poddawane dalszej interpretacji [52]. Po zidentyfikowaniu statystycznie istotnych DAMs, kolejnym krokiem jest ich interpretacja biologiczna. Wykorzystuje się tu narzędzia do analizy wzbogacania szlaków metabolicznych, które przyporządkowują

zidentyfikowane związki do znanych szlaków biochemicznych, np. z bazy danych Encyklopedii Genów i Genomów z Kioto (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG), pozwalając na przejście od listy pojedynczych metabolitów do zrozumienia, które procesy fizjologiczne zostały najsilniej zaburzone. Uzupełnieniem tej analizy jest badanie sieci korelacji metabolicznych, które wizualizuje powiązania między związkami, umożliwiając identyfikację współregulowanych modułów metabolicznych oraz kluczowych węzłów (ang. *hubs*), odgrywających centralną rolę w odpowiedzi na stres [43].

Możliwości współczesnej chemometrii wykraczają jednak poza wymienione metody, obejmując zaawansowane techniki z zakresu eksploracji danych, jak choćby te najbardziej znane: przetwarzanie sygnałów, sieci neuronowe, uczenie maszynowe, drzewa decyzyjne, grupowanie hierarchiczne [47]. Pozwalają one na budowę modeli predykcyjnych, które mogą nie tylko klasyfikować próbki, ale również przewidywać stopień odpowiedzi biologicznej na podstawie profilu metabolicznego. Ważnym kierunkiem rozwoju jest także integracja danych wielo-omicznych, łącząca metabolomikę z danymi na poziomie genomu, transkryptomu oraz proteomu [46]. Podejścia te stwarzają możliwość identyfikacji złożonych powiązań przyczynowo-skutkowych, od zmian w ekspresji genów, przez modyfikacje w puli białek, aż po finalne perturbacje metaboliczne, co jest szczególnie wartościowe w odkrywaniu biomarkerów o najwyższej specyficzności [38]. Cały ten złożony proces przetwarzania wyników, od surowych danych instrumentalnych po biologiczną interpretację, jest wspierane przez zintegrowane platformy bioinformatyczne, takie jak MS-DIAL, MZmine oraz MetaboAnalyst [43]. Te narzędzia integrują algorytmy detekcji pików, wyrównywania czasów retencji, identyfikacji metabolitów oraz analizy statystycznej, zapewniając standaryzowane i powtarzalne schematy postępowania analitycznego. Wykorzystanie takich platform jest szczególnie istotne w kontekście porównywalności wyników między różnymi laboratoriami oraz zapewnienia zgodności z wytycznymi dotyczącymi jakości danych metabolomicznych [46].

Rozdział 3. Omówienie wyników badań własnych

Niniejszy rozdział przedstawia omówienie najważniejszych wyników badań, które zrealizowałam w ramach nowatorsko zaprojektowanej, wieloetapowej strategii badawczej, przedstawionej w publikacjach wchodzących w skład tego monotematycznego cyklu. Jej unikalna konstrukcja opierała się na metodycznej, wieloetapowej progresji, której celem było stopniowe rozszerzanie zakresu analitycznego – od weryfikacji fundamentalnych hipotez w prostych układach modelowych, aż po ich walidację w złożonych matrycach roślin jadalnych. Tę ewolucję analityczną zilustrowałam na Rysunku 2, przedstawiający przyporządkowanie oznaczanych związków do szlaków metabolicznych z bazy danych KEGG. Punktem wyjścia była celowana analiza aminokwasów aromatycznych i powiązanych z nimi amin biogennych (Zestaw I, punkty żółte). Następnie, w badaniach nad biopestycydami, zbiór ten został znacząco poszerzony o metabolity skopoletyny i umbeliferonu (Zestaw II, punkty czerwone). W końcowym etapie pracy przeprowadziłam kompleksowe profilowanie metaboliczne, w tym celu ponownie rozszerzając zakres badań o dodatkowe aminokwasy (Zestaw III, punkty niebieskie). Uzyskane w ten sposób obszerne dane z analizy celowanej i niecelowanej poddałam rygorystycznej analizie chemometrycznej, co pozwoliło mi zidentyfikować panel 15 biomarkerów narażenia roślin jadalnych na pestycydy (Zestaw III). W kolejnych podrozdziałach omówiłam i zinterpretowałam wyniki uzyskane w ramach każdego z tych etapów, odnosząc je do głównej tezy rozprawy.

3.1. Badanie biotransformacji farmaceutyków i ich wpływu na metabolom drożdży

Pierwszy etap badań, koncentrował się na opracowaniu i zastosowaniu zintegrowanej strategii analitycznej do badania wpływu wybranych substancji leczniczych na metabolizm wtórny organizmu modelowego. Jako system modelowy wykorzystałam drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, które ze względu na wysoki stopień konserwatyzmu podstawowych szlaków metabolicznych w stosunku do eukariontów wyższych, stanowią wiarygodny i dobrze scharakteryzowany organizm do badania mechanizmów biotransformacji leków oraz ich wpływu na endogenne procesy biochemiczne [9]. Do badań wybrałam trzy substancje farmaceutyczne, których mechanizm działania lub poznane efekty uboczne są bezpośrednio powiązane z zaburzeniami metabolizmu aminokwasów aromatycznych, odpowiedzialnych za syntezę głównych neuroprzekaźników i hormonów [P3, P4]. Dobór ten umożliwił porównanie wpływu różnych leków na te centralne szlaki metaboliczne. Przedmiotem badań były: NTBC, lek stosowany w leczeniu rzadkiej choroby genetycznej – tyrozyნიемii typu 1, będący jednocześnie specyficznym inhibitorem katabolizmu L-Tyr [53], oraz dwie pochodne adamantanu o działaniu neuroaktywnym – AMT i RMT. Te ostatnie, stosowane m.in. w leczeniu choroby Parkinsona, zostały wybrane ze względu na ich udokumentowany wpływ na systemy neuroprzekaźników poprzez oddziaływanie na układy dopaminergiczny i glutaminergiczny [54]. Ponieważ prekursorem dla tych neuroprzekaźników są aminokwasy aromatyczne, wybór tych leków pozwolił na bezpośrednie badanie, jak ich działanie farmakologiczne przekłada się na zmiany w profilu metabolitów szlaku kwasu szikimowego.

W ramach prac badawczych opracowałam i zwalidowałam kompleksową procedurę analityczną opartą na technice LC-MS/MS, obejmującą komplementarne strategie analizy profilowania (obejmującej związki z Zestawu I, Rys. 3) i metabolicznego odcisku palca. Szczegółowe warunki hodowli drożdży, sposób ich narażenia, warunki prowadzenia ekstrakcji, a także parametry pracy aparatu zostały opisane w sekcjach metodologicznych obu załączonych publikacji [P3, P4]. Procedura przygotowania próbek, której opracowanie zostało przedstawione w materiałach dodatkowych dołączonych do publikacji, została dopracowana w celu maksymalizacji wydajności ekstrakcji przy jednoczesnym ograniczeniu wpływu matrycy. Opracowane metody analityczne zostały poddane walidacji, w ramach której oceniłam parametry takie jak liniowość, precyzja, dokładność, LOD, LOQ, odzysk oraz efekt matrycowy, potwierdzając ich przydatność do zamierzonych celów badawczych, co zostało zamieszczone

w materiałach uzupełniających dołączonych do publikacji [P3, P4]. Ocena globalnych zmian w metabolomie poprzez analizę niecelowaną z wykorzystaniem strategii metabolicznego odcisku palca została przeprowadzona przy wykorzystaniu techniki LC-MS/MS w trybie EMS oraz narzędzi bioinformatycznych. Zasadniczym elementem tej strategii było opracowanie optymalnych warunków chromatograficznych umożliwiających rozdzielenie szerokiej gamy metabolitów o zróżnicowanej polarności w pojedynczej analizie.

W pierwszym etapie prac przedmiotem badań był NTBC, zidentyfikowałam i oznaczyłam nie tylko związek macierzysty, ale także jego trzy główne produkty transformacji: kwas 2-amino-4-(trifluorometylo)benzoesowy (ATFA), kwas 2-nitro-4-(trifluorometylo)benzoesowy (NTFA) oraz cykloheksano-1,3-dion (CHD). Nowatorskim odkryciem w ramach tej strategii było stwierdzenie, że podczas gdy NTBC ulegał degradacji z jednoczesnym powstawaniem NTFA i ATFA, również metabolit NTFA ulegał dalszej biotransformacji do ATFA, tworząc kaskadowy szlak metaboliczny. Przełomowym ustaleniem tych badań, opublikowanych w pracy badawczej [P3] wchodzącej w skład monotematycznego cyklu, było wykazanie, że to nie substancja macierzysta, ale jej metabolity wywierają najsilniejszy wpływ na endogenne szlaki metaboliczne. W przypadku NTBC wykazałam, że jego główne produkty transformacji, a w szczególności najbardziej stabilny z nich – CHD – indukowały najsilniejszy efekt, powodując spadek stężeń L-Tyr, L-Trp i L-Phe odpowiednio o 34%, 59% i 51% w porównaniu do grupy kontrolnej [P3]. Wyniki te miały fundamentalne znaczenie dla doprecyzowania postawionej hipotezy badawczej, jednoznacznie wskazując, że to produkty biotransformacji, a nie związek macierzysty, są głównym stymulantem zaburzeń metabolizmu wtórnego w modelu eukariotycznym. Wnioski te zostały dodatkowo potwierdzone przez wyniki analizy niecelowanej, gdzie na wykresach PCA ([P3] Rys. 5, Rys. 6) profil metaboliczny drożdży po ekspozycji na CHD tworzył wyraźnie odrębny klaster, odseparowany od grup traktowanych pozostałymi związkami, co potwierdza jego unikatowy mechanizm oddziaływania.

W drugiej części badań, wykorzystując ponownie drożdże jako organizm modelowy, skupiłam się na pochodnych adamantanu. Wyniki tych prac opisałam w drugiej publikacji badawczej [P4], wchodzącej w skład monotematycznego cyklu. Badania kinetyczne wykazały, że AMT ulegała znacznie wolniejszemu metabolizmowi niż RMT. Równoległe próby identyfikacji metabolitów AMT, potwierdziły jej znikomą biotransformację w warunkach

eksperymentalnych, co było istotnym ustaleniem w przeprowadzonym eksperymencie. Analiza celowana aminokwasów aromatycznych oraz powiązanych z nimi amin biogennych potwierdziła, że wolniej metabolizowana AMT wywiera silniejszy i trwalszy wpływ na zmianę ich zawartości, co zostało dodatkowo potwierdzone przez przeprowadzoną równolegle analizę niecelowaną. Globalna ocena metodą metabolicznego odcisku palca wykazała, że profil metaboliczny drożdży po ekspozycji na RMT pozostawał zbliżony do profilu próbek kontrolnych, podczas gdy AMT, zgodnie ze swoją wolniejszą kinetyką, indukowała odpowiedź metaboliczną, która rozwijała się w czasie i była wyraźnie widoczna jako separacja klastrów na wykresach PCA ([P4], Rys. 5). Co więcej, analiza statystyczna (test *t*-Studenta) pozwoliła na identyfikację specyficznych markerów chemicznych narażenia: jonu o *m/z* 135,0 dla AMT oraz *m/z* 180,2 dla RMT, które jednoznacznie potwierdziły ekspozycję na te leki.

Osiągnięcia naukowe przedstawione w obu publikacjach dowodzą, że opracowana i zwalidowana procedura analityczna oparta na technice LC-MS/MS jest skutecznym i czułym narzędziem do badania losów leków i ich wpływu na metabolizm wtórny w komórkach drożdży. Potwierdziłam zasadnicze znaczenie oznaczania nie tylko substancji macierzystych, ale przede wszystkim ich metabolitów, które często wykazują odmienną aktywność biologiczną. Tym samym, uzyskane w tych badaniach zróżnicowane profile metaboliczne stanowiły pierwszy, modelowy przykład sygnału analitycznego, będącego dowodem narażenia organizmu na czynnik stresowy, co potwierdziło słuszność przyjętej w pracy koncepcji badawczej. Uzyskane wyniki, stanowiące wiarygodną podstawę metodologiczną i merytoryczną, w pełni demonstrują walory zastosowania organizmu modelowego jako pierwszego etapu weryfikacji postawionych hipotez badawczych. Utrzymanie ściśle kontrolowanych warunków eksperymentalnych pozwoliło na jednoznaczne powiązanie obserwowanych zmian metabolicznych z działaniem badanych substancji, poprzez eliminację wpływu zakłócających zmiennych środowiskowych i naturalnej zmienności biologicznej. Jednoznaczne potwierdzenie koncepcji badawczej w tych warunkach uzasadniało jej stopniową walidację w bardziej złożonym układzie modelowym, jakim są rośliny uprawne, wciąż jednak w ściśle zdefiniowanych warunkach laboratoryjnych, co zostanie przedstawione w kolejnych rozdziałach rozprawy.

3.2. Porównanie odpowiedzi metabolicznej zbóż na pestycydy syntetyczne i naturalne

Kolejny etap badań, opisany w publikacji [P5] wchodzącej w skład monotematycznego cyklu, polegał na przeniesieniu opracowanej metodologii do bardziej złożonego układu modelowego, jakim są rośliny uprawne o kluczowym znaczeniu gospodarczym. Głównym celem było przeprowadzenie porównawczej oceny wpływu pestycydów naturalnych i syntetycznych na metabolizm roślin oraz zbadanie losów tych związków w tkankach roślinnych. Zastosowana w badaniach na drożdżach procedura analityczna oparta na technice LC-MS/MS, choć wystarczająca do prostego organizmu modelowego, posiadała pewne ograniczenia w kontekście identyfikacji nieznanymi produktów transformacji w skomplikowanych matrycach roślinnych. W związku z tym, kluczowym elementem tego etapu było rozszerzenie warsztatu badawczego o technikę LC-HRMS. Nawiązałam w tym celu współpracę z Instytutem Bezpieczeństwa Żywności, Zdrowia Zwierząt i Środowiska „BIOR” na Łotwie. W ramach tej kooperacji, na podstawie przygotowanego i scharakteryzowanego przeze mnie materiału badawczego, wykonano w Instytucie analizy w trybie pełnego skanu DDA z wykorzystaniem techniki LC-HRMS. Dostarczyły one danych o wysokiej rozdzielczości, zawierających informacje o dokładnej masie cząsteczkowej potencjalnych metabolitów oraz ich szczegółowe widma fragmentacyjne. Umożliwiło to wiarygodną identyfikację strukturalną nieznanymi dotąd produktów transformacji badanych pestycydów.

W pierwszych badaniach tej serii, opisanych w artykule [P5] wchodzącym w monotematyczny cykl publikacji, oceniłam wpływ naturalnego pestycydu – HIN – oraz dwóch pestycydów syntetycznych – TBC i 2,4-D – na metabolizm pszenicy i jęczmienia. Przyjęty układ badawczy, oparty na podziale ze względu na pochodzenie (naturalne/syntetyczne) oraz zastosowanie (fungicyd/herbicyd), umożliwił wielowymiarową ocenę oddziaływania tych substancji na endogenne procesy metaboliczne roślin uprawnych. Szczegółowe warunki prowadzenia eksperymentu, w tym warunki wzrostu roślin, sposób aplikacji pestycydów oraz protokoły pobierania i przygotowania próbek, jak i parametry walidacyjne wyznaczone dla każdej matrycy zostały przedstawione w sekcji metodologicznej publikacji.

Badania były prowadzone w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, a ich analityczny fundament stanowiła trójstopniowa, komplementarna strategia. Pierwszy etap polegał na śledzeniu zmian zawartości zdefiniowanego panelu 15 amin biogennych i aminokwasów

(Zestaw I, Rys. 2) z zastosowaniem celowanej analizy LC-MS/MS w trybie MRM. Kluczowym wyzwaniem analitycznym było opracowanie procedury przygotowania próbek dostosowanej do specyfiki matryc roślinnych przy zachowaniu równowagi między eliminacją efektu matrycowego a ochroną cennych metabolitów wtórnych. W tym celu zastosowałam strategię wielopoziomowych rozcieńczeń próbek 1:100 (v/v) i 1:1000 (v/v), co umożliwiło uchwycenie globalnych zmian metabolicznych w szerokim zakresie stężeń – od składników głównych po śladowe ilości metabolitów wtórnych. Walidacja została przeprowadzona osobno dla każdej matrycy roślinnej i każdego poziomu rozcieńczenia, zapewniając wiarygodność metodyki dla wszystkich badanych kombinacji analitycznych. Analiza ta ujawniła, że TBC indukował najsilniejsze i najtrwalsze zmiany metaboliczne w zbożach, z utrzymującym się podwyższonym poziomem tyraminy (TRA) i tryptaminy (TRYP) przez cały czterotygodniowy okres eksperymentu. Z kolei HIN powodował jedynie nieznaczne i przejściowe zaburzenia, a jego stężenie w tkankach roślinnych gwałtownie spadało w czasie, co świadczyło o szybkiej biodegradacji. Badania ujawniły również istotne różnice międzygatunkowe – jęczmień okazał się znacznie bardziej odporny na metaboliczne zaburzenia wywołane przez pestycydy syntetyczne niż pszenica ([P5], Rys. 1).

Kolejnym osiągnięciem była ocena globalnych zmian w metabolomie poprzez analizę niecelowaną z wykorzystaniem strategii metabolicznego odcisku palca przeprowadzona przy wykorzystaniu techniki LC-MS/MS w trybie EMS oraz narzędzi bioinformatycznych. Wstępna eksploracja danych za pomocą PCA pozwoliła na ocenę ogólnej struktury danych, natomiast w celu maksymalizacji separacji i wizualizacji różnic między grupami zastosowano nadzorowaną analizę dyskryminacyjną. Ta komplementarna strategia pozwoliła na jednoznaczną wizualizację różnic między grupami, potwierdzając, że profil metaboliczny roślin traktowanych HIN był zbliżony do profilu próbek kontrolnych, podczas gdy TBC i 2,4-D indukowały wyraźne i trwałe zmiany ([P5], Rys. 2). Strategia *fingerprinting* potwierdziła swą skuteczność jako narzędzie do różnicowania skutków metabolicznych wywołanych przez pestycydy o różnych mechanizmach działania, dostarczając istotnych informacji o globalnych zmianach w metabolomie roślinnym w odpowiedzi na stres chemiczny.

Zwieńczeniem strategii analitycznej była identyfikacja nieznanych dotąd produktów biotransformacji dzięki wykorzystaniu techniki LC-HRMS. Zastosowana strategia akwizycji DDA pozwoliła na uzyskanie wysokiej jakości widm fragmentacyjnych niezbędnych do identyfikacji strukturalnej. Identyfikacja metabolitów opierała się na pięciostopniowej skali pewności według klasyfikacji Schymanski'ego, gdzie poziom 1 wymagał potwierdzenia wzorcem, a poziom 5 ograniczał się do dokładnej masy cząsteczkowej [55]. Dzięki zastosowaniu tego podejścia po raz pierwszy zidentyfikowałam dwa nieopisane dotąd w literaturze metabolity 2,4-D oraz siedem metabolitów TBC w pszenicy. Stanowi to istotne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy o losach tych pestycydów w zbożach. Szczegółowa analiza kinetyki ich powstawania pozwoliła na przedstawienie fazowego przebiegu metabolizmu TBC, co dostarczyło wglądu w mechanizmy detoksykacji tego fungicydu zachodzące w roślinie. Wizualizację czasowych zmian intensywności metabolitów przeprowadziłam za pomocą map cieplnych z grupowaniem hierarchicznym opartym na odległości euklidesowej. Dendrogram grupowania hierarchicznego, wyświetlany obok mapy cieplnej, przedstawiony na Rysunku 3 w publikacji [P5], wizualnie potwierdził podział metabolitów na podstawie trendów czasowych, z wyraźnym podziałem na metabolity wczesne (TBC_1 do TBC_4) wykazujące stopniowy wzrost intensywności oraz metabolity późne (TBC_5, TBC_6, TBC_7) charakteryzujące się gwałtownymi zmianami stężenia. Analiza statystyczna różnic przeprowadzona przy użyciu testu ANOVA z korekcją Benjamini'ego-Hochberga ($FDR < 0,05$) potwierdziła istotność obserwowanych zmian. W przypadku HIN wykryłam jedynie jeden metabolit (hinokinina), którego poziom pozostawał stabilny, co dodatkowo potwierdziło niski potencjał akumulacyjny tego naturalnego pestycydu.

Wiarygodność wszystkich przedstawionych wyników została zapewniona poprzez zastosowanie kompleksowej walidacji statystycznej i kontroli jakości analitycznej, która obejmowała rygorystyczne testy krzyżowe, analizy permutacyjne oraz systematyczną ocenę stabilności danych pomiarowych. Opracowana zintegrowana strategia analityczna, łącząca LC-HRMS z zaawansowanymi narzędziami chemometrycznymi i rygorystyczną walidacją statystyczną, dostarczyła kompleksowego obrazu metabolicznych i czasowych aspektów biotransformacji TBC oraz 2,4-D stanowiąc solidną podstawę do zrozumienia mechanizmów detoksykacji tych pestycydów w tkankach roślinnych. Ta wielowarstwowa procedura analityczna potwierdziła, że profilowanie metaboliczne stanowi czułe i wiarygodne narzędzie

do oceny wpływu pestycydów na organizmy żywe, umożliwiając wykrycie subtelnych zmian metabolicznych poprzedzających objawy toksyczności na poziomie fizjologicznym, co potwierdza kluczową rolę profilu metabolicznego jako czułego i wiarygodnego sygnału analitycznego.

W kolejnych badaniach, stanowiących kontynuację i rozszerzenie badań opisanych na wstępie tego podrozdziału, oceniłam potencjał dwóch kolejnych związków allelopatycznych – SCOP i UMB – jako biopestycydów. Wybór tych substancji oparłam na wnioskach z publikacji przeglądowej [P1], w której na podstawie analizy doniesień literaturowych wskazałam na ich wysoki potencjał jako naturalnych pestycydów. Na tym etapie pracy postanowiłam zweryfikować te przypuszczenia, wykorzystując i rozbudowując metodykę analityczną opracowaną w publikacji [P5] do oceny i porównania zmian metabolicznych wywoływanych przez związki allelopatyczne oraz pestycydy konwencjonalne. Metodologia badawcza została poszerzona o analizę wybranych parametrów fizjologicznych: stres oksydacyjny, zawartość chlorofilu oraz uszkodzenia tkanek. W tym celu wykorzystywałam sprawdzone procedury opisane w literaturze, które dostosowałam do warunków prowadzonych badań [56,57]. Pozwoliło to na zintegrowanie odpowiedzi na poziomie metabolicznym i fizjologicznym w celu uzyskania pełnego obrazu działania badanych związków. Analiza metabolicznego odcisku palca, przeprowadzona przy wykorzystaniu techniki LC-MS/MS w trybie EMS, wykazała, że profile metaboliczne zbóż traktowanych UMB były zbliżone do próbek kontrolnych, co świadczy o minimalnym wpływie tego związku na metabolizm roślin. Warte uwagi jest to, że SCOP, mimo swojego naturalnego pochodzenia, indukowała odpowiedź metaboliczną o charakterystyce zbliżonej do tej wywołanej przez syntetyczny fungicyd TBC. Zbieżność profili metabolicznych dla obu związków, silnie sugeruje podobieństwo ich mechanizmów działania na poziomie metabolicznym. Wniosek ten jest spójny z doniesieniami literaturowymi, które wskazują na aktywność przeciwgrzybiczą SCOP [P1].

W celu dokładniejszego zrozumienia mechanizmów działania UMB, przeprowadziłam zaawansowaną analizę bioinformatyczną danych uzyskanych za pomocą techniki LC-HRMS. Po przeprowadzeniu analizy wzbogacania szlaków metabolicznych (ang. *pathway enrichment analysis*) z wykorzystaniem algorytmu Mummichog i przyporządkowania do bazy danych KEGG wykazałam, że w przeciwieństwie do pestycydów syntetycznych, UMB nie powoduje

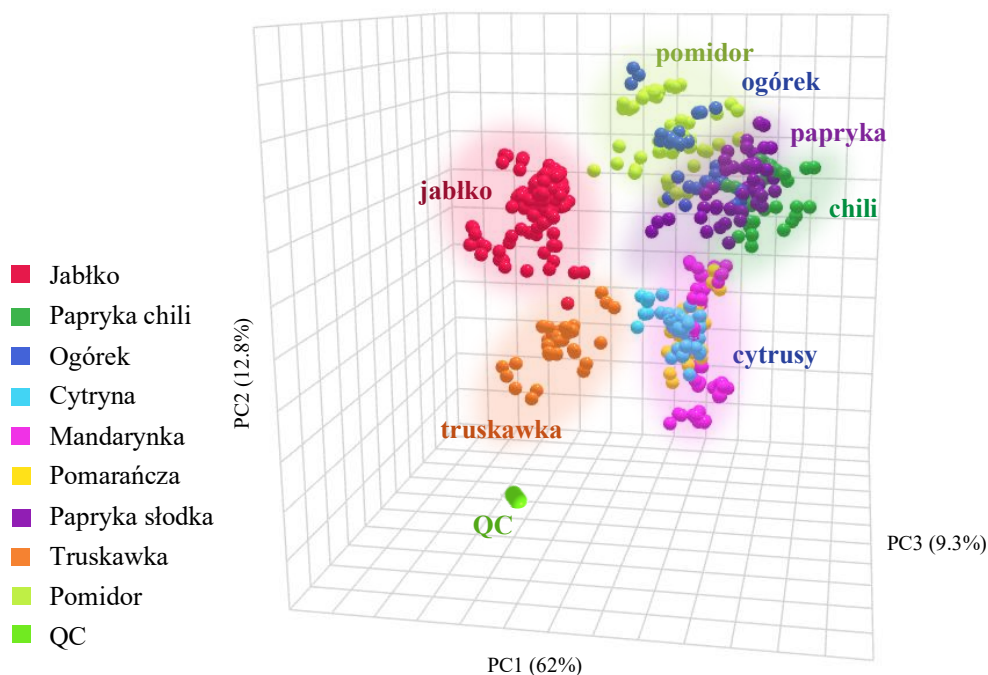
istotnych zaburzeń w kluczowych szlakach metabolicznych, a wręcz aktywuje endogenne mechanizmy obronne rośliny. Analiza metabolitów UMB (Zestaw II, Rys. 2) ujawniła wzrost stężenia kwasów tłuszczowych (palmitynowego, oleinowego), auksyn (kwas indolo-3-octowy) oraz giberelin (giberelina A4), które są zaangażowane w ścieżki sygnałowe odpowiedzi na stres i ochronę przed patogenami. Zastosowanie analizy sieci korelacji (ang. *correlation network analysis*), opartej na algorytmie rzadkich korelacji cząstkowych z korektą obciążenia (ang. *debiased sparse partial correlation*, DSPC), pozwoliło na identyfikację izoskopoletyny jako kluczowego metabolitu-*huba*, koordynującego odpowiedź metaboliczną narażenia UMB, co potwierdza jego centralną rolę w regulacji odpowiedzi na czynniki stresowe. Wyniki te dodatkowo potwierdziłam poprzez analizę parametrów fizjologicznych, która wykazała minimalny poziom stresu oksydacyjnego i uszkodzeń tkanek w roślinach traktowanych UMB, w przeciwieństwie do silnej odpowiedzi stresowej wywołanej przez TBC i 2,4-D. Pomiary fizjologiczne, takie jak stężenie reaktywnych form tlenu, całkowita zawartość chlorofilu oraz stopień uszkodzenia tkanek, wskazują, że UMB nie wywołuje znaczących objawów fitotoksyczności, co jest zgodne z obserwowanymi, subtelnymi zmianami na poziomie metabolicznym.

Osiągnięcia naukowe opisane w tym rozdziale demonstrują skuteczne przeniesienie i rozszerzenie metodologii analitycznej na złożone systemy roślinne. Opracowanie nowej koncepcji badawczej, rozbudowa metodyki o analizę LC-HRMS oraz zaawansowaną obróbkę danych chemometrycznych i bioinformatycznych pozwoliły nie tylko na ocenę wpływu pestycydów na metabolizm zbóż, ale także na dostarczenie nowych dowodów na rzecz wykorzystania naturalnych allelochemikaliów jako bezpiecznych i skutecznych alternatyw dla syntetycznych środków ochrony roślin. Wyniki uzyskane na tym etapie stanowią podstawę do dalszych, bardziej ukierunkowanych badań, które, przy zachowaniu zbliżonej metodologii, przenoszą obiekt badawczy z układów modelowych na próbki rzeczywiste. Jak zostanie omówione w kolejnym rozdziale, celem tego etapu była weryfikacja i walidacja opracowanego podejścia analitycznego w znacznie bardziej złożonych i praktycznie istotnych warunkach.

3.3. Identyfikacja biomarkerów narażenia na pestycydy w roślinach jadalnych

Finalny etap badań stanowił syntezę dotychczasowych prac, mającą na celu przeniesienie opracowanej metodologii z układów modelowych do praktycznej oceny bezpieczeństwa żywności. Zasadnicze pytanie badawcze na tym etapie dotyczyło tego, czy globalna odpowiedź metaboliczna roślin może służyć jako uniwersalny sygnał analityczny do wykrywania narażenia na pestycydy, niezależnie od rodzaju matrycy i poziomu konkretnych pozostałości. W tym celu nawiązałam współpracę z akredytowanym laboratorium analitycznym i2 Analytical, które dostarczyło do badań szeroką gamę próbek owoców. Fundamentalnym elementem tej współpracy było uzyskanie materiału badawczego o szczegółowo scharakteryzowanym, zarówno jakościowo, jak i ilościowo, profilu pozostałości pestycydów, określonego za pomocą zwalidowanych metod zgodnych z wytycznymi dokumentu SANTE/11312/2021 [58]. Pozwoliło to na fundamentalne dla tego etapu pracy zdefiniowanie dwóch grup badawczych. Grupę kontrolną stanowiły próbki, w których zidentyfikowane pozostałości pestycydów mieściły się poniżej MRL. Grupę badaną stanowiły natomiast próbki, w których stężenia te przekraczały prawnie ustalone normy. MRL to ustanowiony przez organy regulacyjne najwyższy poziom pozostałości pestycydu, który jest prawnie dozwolony w żywności, wynikający z dobrej praktyki rolniczej i zapewniający bezpieczeństwo konsumentów. Taki podział umożliwił bezpośrednie i wiarygodne powiązanie obserwowanych zmian metabolicznych ze stresem wywołanym nadmierną zawartością pestycydów. Na potrzeby tych badań przeprowadziłam kompleksową rewalidację i rozszerzenie opracowanych wcześniej procedur analitycznych, zarówno dla analizy celowanej jak i niecelowanej. W celu uzyskania kompleksowego wglądu w zmiany na kluczowych szlakach metabolicznych, zwłaszcza w obrębie gospodarki azotowej i biosyntezy związków sygnałowych, rozszerzyłam zakres analizy celowanej o jednoczesne oznaczanie związków z Zestawów I i III przedstawionych na Rysunku 2. Wymagało to rozszerzenia walidacji metody opartej na technice LC-MS/MS w różnych, złożonych matrycach roślinnych (jabłko, truskawka, owoce cytrusowe, ogórek, pomidor, papryka słodka, papryka chili). Rozbudowałam również metodę analizy niecelowanej, opracowując zintegrowaną strategię akwizycji danych (EMS-IDA-EPI), która umożliwiała jednoczesne zbieranie pełnych skanów masowych oraz wysokiej jakości widm fragmentacyjnych. W ramach analizy profilowania metabolicznego oceniłam zmiany w profilu amin biogennych i aminokwasów w odpowiedzi na obecność pozostałości pestycydów.

W tym celu dla każdej matrycy porównałam próbki zawierające pozostałości pestycydów powyżej MRL z odpowiednimi próbkami kontrolnymi. Zmiany ilościowe związków endogennych wyraziłam jako FC obliczoną jako stosunek średniego stężenia analitu w grupie narażonej do średniego stężenia w grupie kontrolnej. Tylko te zmiany, które spełniały podwójne kryterium – istotności statystycznej (wartość $p < 0,05$ w analizie ANOVA) oraz biologicznej ($|FC| \geq 2$) – uznałam za znaczące. Takie podejście pozwoliło na odfiltrowanie przypadkowych fluktuacji i skupienie się wyłącznie na powtarzalnych i silnych odpowiedziach metabolicznych. Zastosowanie PCA do zbioru przetworzonych danych pozwoliło również na jednoznaczną wizualizację różnic metabolicznych między poszczególnymi matrycami. Trójwymiarowy wykres PCA na Rysunku 3 przedstawia wyraźne grupowanie się próbek w klastry odpowiadające poszczególnym gatunkom roślin (np. owoce cytrusowe, jabłka, truskawki) co potwierdziło, że opracowana metoda jest wystarczająco czuła, aby wychwycić subtelne, ale charakterystyczne dla danej matrycy odpowiedzi metaboliczne na stres wywołany pestycydami.

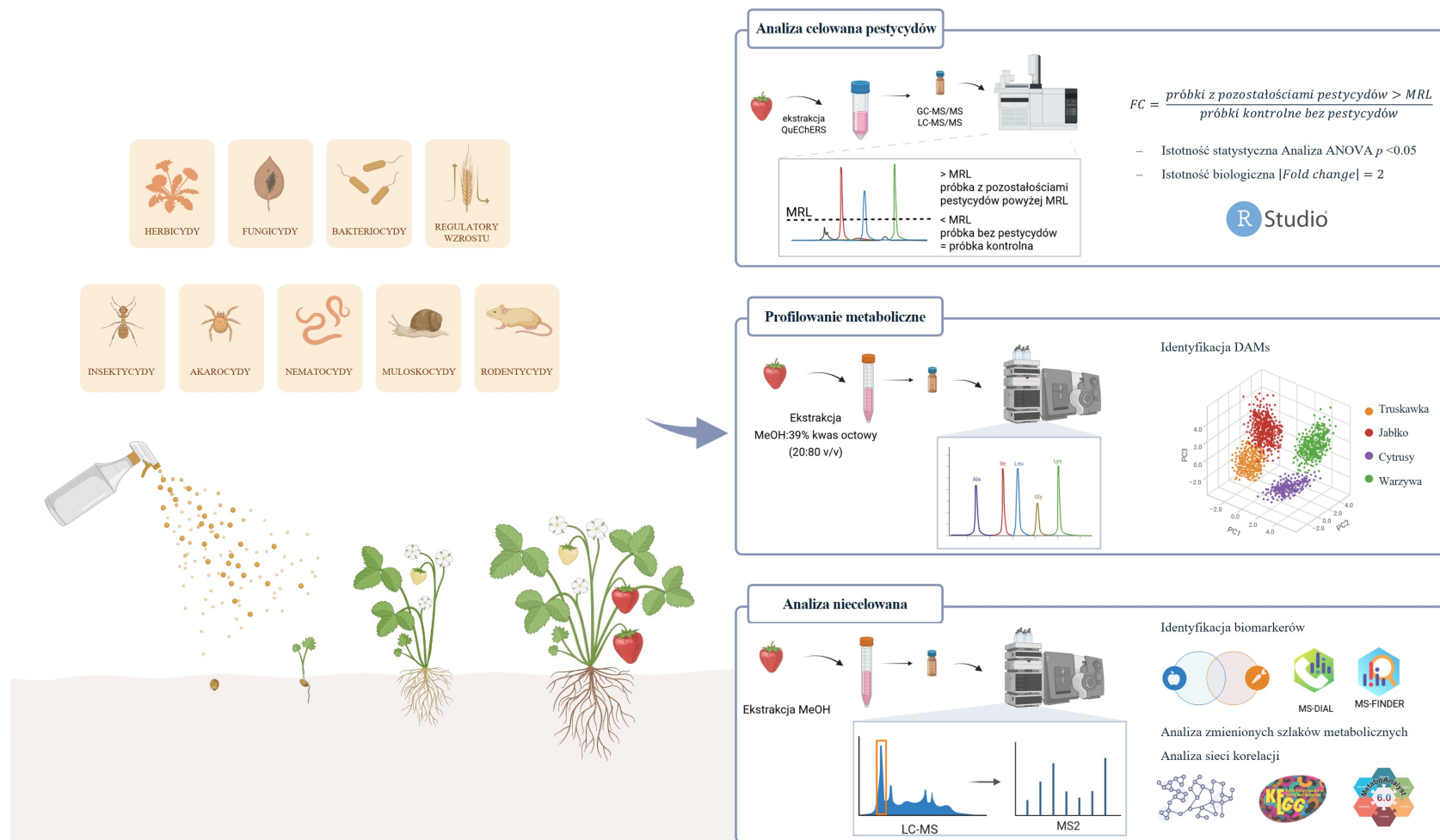


Rysunek 3. Wykres wyników PCA oparty na wartościach FC dla stężeń oznaczanych amin i aminokwasów, ukazujący wyraźne grupowanie próbek w zależności od matrycy. Punkty, odpowiadające pojedynczym próbkom, są oznaczone kolorami według rodzaju rośliny jadalnej.

Kluczowe wyniki uzyskałam jednak z analizy niecelowanej, która umożliwiła identyfikację DAMs na podstawie globalnego profilu metabolicznego. Ponownie zastosowałam rygorystyczne kryteria statystyczne ($p \leq 0,01$, $|FC| \geq 2$), aby z tysięcy sygnałów metabolicznych wskazać te o największym znaczeniu biologicznym. Tworząc diagramy Venna zidentyfikowałam zarówno metabolity specyficzne dla poszczególnych grup roślin, jak i te uniwersalne. Przełomowym rezultatem tych badań było wskazanie, poprzez analizę przecięcia zbiorów DAMs, uniwersalnego panelu 15 kluczowych biomarkerów narażenia na pestycydy, których profil zmienia się w powtarzalny sposób niezależnie od rodzaju matrycy roślinnej. Wszystkie te związki wchodziły w skład analizowanego na tym etapie Zestawu III, przedstawionego na Rysunku 2. Wśród nich znalazły się fitohormony zaangażowane w odpowiedź na stres (kwas abscysynowy, kwas salicylowy), związki fenolowe (kwas chlorogenowy, luteolina, SCOP) oraz poliaminy (agmatyna, putrescyna, spermidyna), co potwierdza, że pestycydy indukują w roślinach złożoną, ogólnoustrojową odpowiedź stresową. W celu głębszego zrozumienia wzajemnych zależności między zidentyfikowanymi biomarkerami zastosowałam analizę sieci korelacji. Jest to podejście chemometryczne, które pozwala na badanie struktury powiązań w złożonych systemach biologicznych poprzez estymację bezpośrednich zależności między metabolitami. W odróżnieniu od prostej korelacji Pearsona, która może wskazywać na pozorne zależności wynikające z wpływu trzeciej zmiennej, wykorzystany przeze mnie algorytm DSPC oblicza korelacje cząstkowe, które odzwierciedlają bezpośrednie interakcje metaboliczne po uwzględnieniu wpływu wszystkich pozostałych związków w systemie. Wynik tej analizy wizualizuje złożoną sieć powiązań pomiędzy 15 uniwersalnymi biomarkerami a kluczowymi aminokwasami, których stężenia uległy zmianie we wszystkich badanych matrycach. Analiza topologii tej sieci wykazała, że agmatyna i putrescyna pełnią rolę centralnych *hubów* w sieci metabolicznej odpowiedzi na stres. Charakteryzowały się one najwyższym stopniem węzła (liczbą połączeń w sieci), co jest kluczową miarą ich centralności i świadczy o ich fundamentalnej roli w koordynowaniu odpowiedzi komórkowej. Aby umieścić te zmiany w szerszym kontekście biologicznym, przeprowadziłam analizę wzbogacania szlaków metabolicznych przy użyciu algorytmu Mummichog, przypisując związki do szlaków z bazy danych KEGG. Ta zaawansowana technika bioinformatyczna pozwala na przewidywanie aktywności szlaków metabolicznych bezpośrednio z danych LC-MS bez konieczności pełnej identyfikacji wszystkich sygnałów,

opierając się na założeniu, że istotne zmiany będzie można kolektywnie przypisać do określonych szlaków biochemicznych. Analiza ta ujawniła, że stosowanie pestycydów prowadzi do systemowych zaburzeń w kluczowych procesach, w tym w szlakach biosyntezy aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach (waliny, leucyny, izoleucyny), metabolizmu argininy i proliny oraz metabolizmu glutationu, co jednoznacznie wskazuje na indukcję stresu oksydacyjnego i głębokie zaburzenia w gospodarce azotowej roślin.

Opracowana i zwalidowana w ramach tej części badań metoda stanowi innowacyjne narzędzie o ogromnym potencjale aplikacyjnym. Jej zaletą jest możliwość szybkiego, przesiewowego na poziomie MRL wykrywania ekspozycji na pestycydy w sposób niezależny od bezpośredniej analizy pozostałości, co może wzmocnić systemy kontroli jakości żywności. W rezultacie, zidentyfikowany panel 15 związków stanowi empiryczną realizację koncepcji sygnału analitycznego zdefiniowanej we wstępie. Nie jest to już sygnał pojedynczego związku, ale złożony, wielowymiarowy wzorzec, którego charakterystyka jednoznacznie sygnalizuje *skutek* narażenia, bez konieczności wiedzy *a priori* o jego *przyczynie*. Jak schematycznie przedstawiłam na Rysunku 4, różne klasy pestycydów, mimo odmiennych mechanizmów działania, indukują w roślinie wspólną, mierzalną odpowiedź metaboliczną, która jest wykrywana jako jeden, spójny sygnał analityczny. Ta uniwersalność otwiera drogę do rozwoju zupełnie nowych strategii kontroli jakości żywności, które nie opierają się na poszukiwaniu setek pojedynczych, znanych substancji, lecz na ocenie ogólnego stanu fizjologicznego produktu. W przyszłości podejście to może stać się podstawą do rozwoju zautomatyzowanych systemów analitycznych oraz narzędziem dla producentów rolnych do oceny wpływu różnych strategii ochrony roślin na jakość plonów.

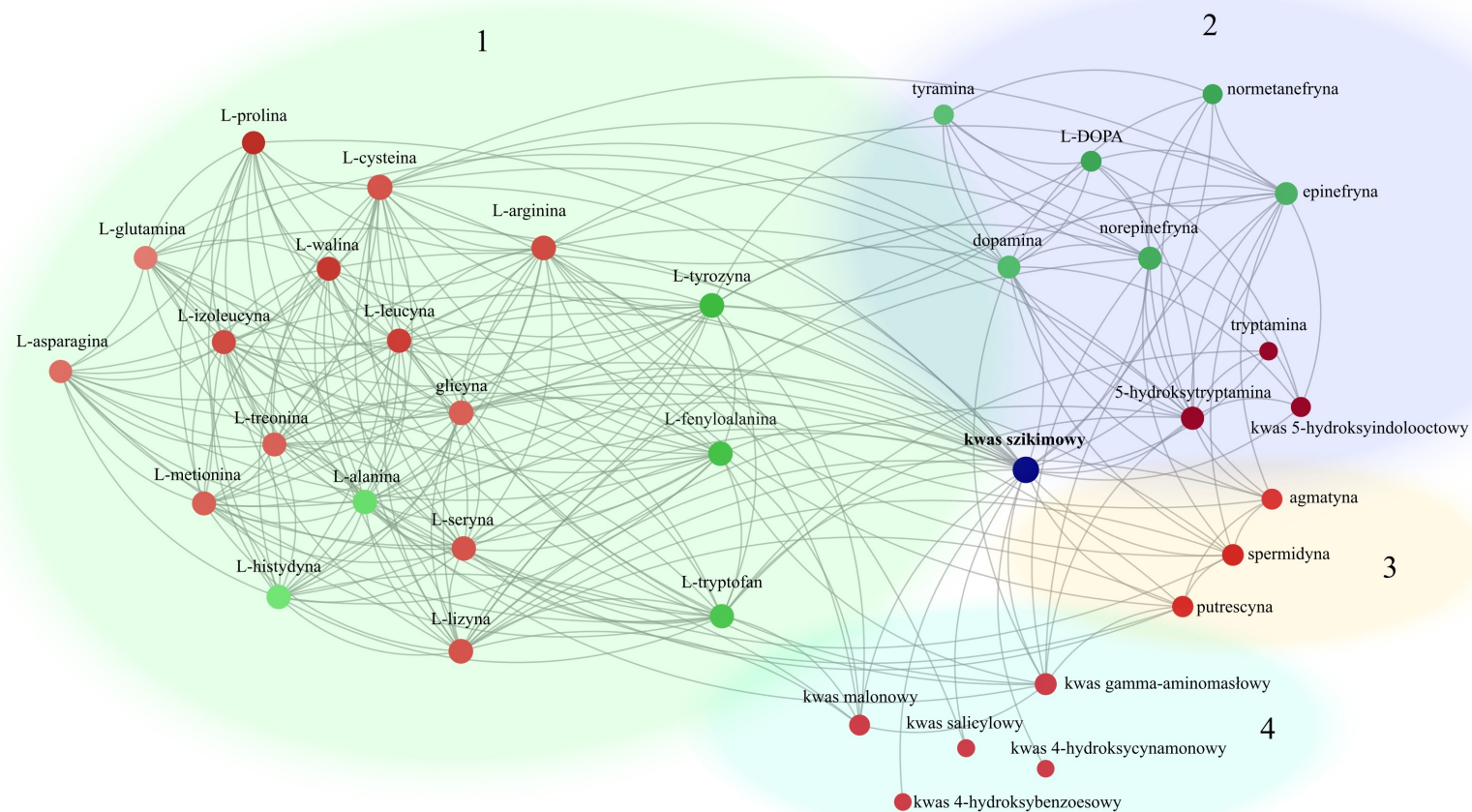


Rysunek 4. Schemat koncepcyjny ilustrujący uniwersalność panelu 15 biomarkerów. Różnorodne klasy pestycydów, mimo odmiennych mechanizmów działania, indukują w roślinie wspólną, mierzalną odpowiedź metaboliczną, która jest wykrywana jako spójny sygnał analityczny.

Ocena wyników uzyskanych na wszystkich etapach badań, począwszy od organizmów modelowych, a skończywszy na próbkach rzeczywistych, wskazuje na powtarzalność pewnych wzorców metabolicznych. W celu uzyskania kompleksowego obrazu tych zależności i zwizualizowania zintegrowanej natury odpowiedzi na stres ksenobiotyczny, skonstruowałam sieć korelacji obejmującą wszystkie związki należące do Zestawów I–III, których zmiany stężeń okazały się statystycznie istotne w toku badań, Rysunek 5. W celu zapewnienia rygoru statystycznego, do analizy wykorzystałam współczynniki korelacji rang Spearmana, które są odporne na nieliniowe zależności i odstępstwa od rozkładu normalnego. Kolor każdego węzła (kropki) w sieci wskazuje na kierunek zmian stężenia danego metabolitu w odpowiedzi na stres: kolor zielony symbolizuje wzrost stężenia, natomiast czerwony – jego spadek.

Analizę sieci korelacyjnych oraz jej wizualizację wykonałam z wykorzystaniem programów Cytoscape 3.10.3 oraz MetaboAnalyst 6.0. Badanie topologii sieci jednoznacznie potwierdza, że szlak kwasu szikimowego i powiązany z nim metabolizm aminokwasów aromatycznych stanowią centralny *hub* metaboliczny. To z tego miejsca rozchodzą się liczne, współregulowane ścieżki, co dowodzi, że obserwowany sygnał analityczny ma charakter złożonej, systemowej odpowiedzi organizmu, a nie jest jedynie sumą izolowanych zmian. Interpretacja powstałej sieci korelacji pomiędzy metabolitami pozwoliła zidentyfikować cztery wyraźne, funkcjonalne klastry metaboliczne. Pierwszy z nich, skupiony wokół kwasu szikimowego i powiązanych z nim aminokwasów, potwierdza centralną rolę tej ścieżki jako punktu wyjścia dla biosyntezy L-Phe, L-Tyr i L-Trp, a w konsekwencji dla licznych, dalszych metabolitów. Rozbudowana i gęsto połączona grupa związków w tym zbiorze reprezentuje ogólny metabolizm aminokwasów podkreślając ich fundamentalne, wzajemnie powiązane role w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Drugi klaster obejmuje kluczowe neuroprzekaźniki i ich prekursory. Klaster ten uwidacznia szlaki syntezy katecholamin (dopamina (DA), norepinefryna (NE), epinefryna (E), normetanefryna (NMN), TRA) oraz metabolity szlaku tryptofanu (TRYP, 5-hydroksytryptamina (5-HT), kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA)). Trzeci klaster koncentruje się na związkach kluczowych dla odpowiedzi na stres i procesów regulatorowych. Obejmuje L-Arg jako prekursor oraz pochodne od niej poliaminy: agmatynę, putrescynę i spermidynę. Czwarty klaster obejmuje kwasy o znaczeniu sygnałowym i regulacyjnym. Należą do nich kwas salicylowy, kwas 4-hydroksycynamonowy, kwas *gamma*-aminomasłowy (GABA), kwas 4-hydroksybenzoesowy oraz kwas malonowy.

W obrębie tych klastrów zidentyfikowałam kluczowe *huby* metaboliczne, czyli związki o największej liczbie połączeń, odgrywające centralną rolę w regulacji przepływów metabolicznych. Należą do nich przede wszystkim kwas szikimowy jako główny prekursor, a także L-Arg, L-Tyr, L-Trp oraz L-Phe, stanowiące węzły rozgałęziające dla wyspecjalizowanych szlaków. Analiza sieci korelacji stanowi zwieńczenie przeprowadzonych badań, ponieważ syntetyzuje i potwierdza wyniki ze wszystkich etapów pracy, dostarczając ostatecznego dowodu na poparcie postawionych hipotez. Układ wzajemnych powiązań dowodzi, że zidentyfikowane związki należące do Zestawów I–III nie stanowią przypadkowego zbioru, lecz tworzą spójny, wysoce zintegrowany system. To właśnie ta wewnętrzna spójność i liczne powiązania sprawiają, że zmiany stężeń tych związków stanowią czuły wskaźnik, który w charakterystyczny sposób odzwierciedla odpowiedź organizmu na stres ksenobiotyczny. Tym samym, sieć korelacji dostarcza dowodu na to, że odpowiedź organizmu na stres chemiczny ma charakter systemowy, a jej zrozumienie wymaga podejścia integrującego wiele, pozornie odrębnych, ścieżek biochemicznych.



Rysunek 5. Sieć korelacji metabolicznych ilustrująca wzajemne powiązania pomiędzy związkami zidentyfikowanymi w toku badań. Kolory węzłów oznaczają zmianę zawartości (zielony – wzrost, czerwony – spadek). Numery wskazują klastry funkcjonalne.

3.4. Krytyczna analiza wyzwań metodologicznych i strategie zapewnienia jakości danych

Realizacja założonych celów badawczych rozprawy doktorskiej wiązała się z koniecznością pokonania szeregu złożonych wyzwań na każdym etapie procesu analitycznego od projektowania eksperymentu, przez przygotowanie próbek, aż po przetwarzanie danych i zaawansowaną interpretację statystyczną. Specyfika tych badań, łącząca analizę celowaną z niecelowanym profilowaniem metabolicznym w złożonych matrycach biologicznych, takich jak drożdże, tkanki pszenicy, jęczmienia oraz owoców, niosła ze sobą ryzyko mogące wpłynąć na wiarygodność i powtarzalność uzyskanych wyników. Do kluczowych trudności należały między innymi: złożoność matryc biologicznych, znaczące efekty matrycowe, ryzyko degradacji analitów, zapewnienie odpowiedniej istotności statystycznej i powtarzalności wyników, a także przetwarzanie i analiza ogromnych, wielowymiarowych zbiorów danych. Niniejszy podrozdział ma na celu syntetyczne podsumowanie tych problemów oraz przedstawienie wdrożonych przeze mnie strategii i konkretnych rozwiązań metodycznych, które pozwoliły na ich ograniczenie. W Tabeli 2 szczegółowo przedstawiłam każde z napotkanych wyzwań, konfrontując je z ogólnie przyjętymi w chemii analitycznej strategiami zaradczymi oraz opisem w jaki sposób dany problem starałam się rozwiązać w ramach badań stanowiących fundament tej dysertacji [P3–P5]. To szczegółowe zestawienie nie tylko dokumentuje rygor metodologiczny zastosowany w pracy, ale także podkreśla, że uzyskanie wiarygodnych i spójnych wyników było bezpośrednio uzależnione od świadomego i skutecznego zarządzania ryzykiem analitycznym na każdym etapie badań. Każda z opisanych procedur, kryteriów jakościowych oraz parametrów kontrolnych odnosi się bezpośrednio do eksperymentów i walidacji przedstawionych w załączonych publikacjach, co gwarantuje ich praktyczną weryfikację i aplikacyjny charakter w kontekście zrealizowanego zadania badawczego.

Tabela 2. Zestawienie kluczowych wyzwań metodologicznych i zastosowanych środków zaradczych

Lp.	Wyzwanie	Opis problemu	Zastosowana strategia/rozwiązanie
1	Zachowanie integralności i stabilności profilu metabolicznego próbki	Profil metaboliczny próbki biologicznej jest labilnym odzwierciedleniem chwilowego stanu fizjologicznego organizmu. Natychmiast po pobraniu materiału z żywego organizmu, ustaje homeostaza, a niekontrolowana aktywność enzymatyczna prowadzi do szybkich zmian w stężeniach metabolitów. Dodatkowo, wiele związków jest podatnych na degradację pod wpływem temperatury, światła lub w trakcie procedur takich jak cykle zamrażania-rozmrażania.	Aby zachować metaboliczny stan <i>in vivo</i> , materiał badawczy był zamrażany (-80°C) natychmiast po pobraniu, co zatrzymywało procesy enzymatyczne i chemiczne. Do ekstrakcji została użyta odpowiednio dobrana mieszanina rozpuszczalników, umożliwiającą efektywne wyizolowanie szerokiego spektrum związków o zróżnicowanej polarności. Uzyskane ekstrakty były niezwłocznie zamrażane i przechowywane w temperaturze -80°C. W celu zminimalizowania degradacji analitów i uniknięcia negatywnych skutków cykli zamrażania-rozmrażania, każdą próbkę przygotowywałam do analizy indywidualnie, tuż przed jej wykonaniem. Co więcej, równolegle z próbkami badanymi przygotowywałam próbki pochodzące z grupy kontrolnej (tj. z organizmów niepoddanych działaniu badanego czynnika), które były poddawane identycznym procedurom. Umożliwiło to odniesienie wszystkich obserwowanych zmian do grupy kontrolnej i zniwelowanie wpływu zmienności wynikającej z warunków eksperymentalnych. To kompleksowe podejście zagwarantowało, że analizowany profil chemiczny był wiernym odzwierciedleniem stanu komórek w momencie pobrania próbki.
2	Zarządzanie zmiennością biologiczną	Naturalna zmienność metaboliczna między poszczególnymi organizmami, nawet w obrębie tej samej grupy eksperymentalnej, jest istotnym źródłem wariancji, która może maskować subtelne zmiany wywołane przez badany czynnik. Niewystarczająca liczba powtórzeń biologicznych prowadzi do niskiej mocy statystycznej i zwiększa ryzyko uzyskania wyników fałszywie negatywnych.	Aby zapewnić statystyczną wiarygodność wyników, we wszystkich eksperymentach zastosowałam co najmniej cztery niezależne powtórzenia biologiczne ($n \geq 3$) dla każdej badanej grupy. W celu zwiększenia reprezentatywności próbki i zminimalizowania wpływu indywidualnych różnic, materiał do każdego powtórzenia był mieszaną pobraną z kilku losowo wybranych miejsc, a następnie dokładnie homogenizowany. Takie podejście pozwoliło na rzetelne oszacowanie średniej odpowiedzi metabolicznej oraz zwiększyło moc statystyczną testów porównawczych.
3	Zarządzanie szerokim zakresem stężeń analitów w matrycach roślinnych	W matrycach roślinnych stężenia poszczególnych metabolitów mogą różnić się o kilka rzędów wielkości. Związki występujące w wysokich stężeniach mogą powodować nasycenie sygnału detektora, podczas gdy te na poziomach śladowych mogą być poniżej granicy oznaczalności.	Aby zarządzać szerokim zakresem dynamicznym, zastosowałam strategię wielopoziomowego rozcieńczania ekstraktów. Każda próbka była przygotowywana i analizowana w kilku rozcieńczeniach (np. 1:100 (v/v) i 1:1000 (v/v)), co pozwoliło umieścić anality o skrajnie różnych stężeniach w liniowym zakresie krzywej kalibracyjnej. Dzięki temu zapobiegałam utracie informacji o związkach śladowych, jednocześnie unikając błędów pomiarowych wynikających z nasycenia sygnału dla składników głównych.

Tabela 2. ciąg dalszy

Lp.	Wyzwanie	Opis problemu	Zastosowana strategia/rozwiązanie
4	Walidacja metody dla różnych matryc	Każdy typ matrycy biologicznej ma unikalny skład chemiczny, co prowadzi do odmiennych interferencji analitycznych. Zjawisko to, znane jako efekt matrycowy, polega na tłumieniu lub wzmacnianiu sygnałów analitów przez inne składniki próbki i jest jednym ze źródeł błędów w analizach LC-MS/MS.	W celu zapewnienia dokładności oznaczeń i zminimalizowania efektu matrycowego wdrożyłam kompleksową strategię analityczną, której podstawą była metoda kalibracji dopasowanej matrycowo (ang. <i>matrix-matched</i>) zintegrowana z wielopoziomowym rozcieńczaniem próbek. Takie połączenie pozwoliło sprostać dwóm kluczowym wyzwaniom: silnemu efektowi matrycowemu oraz szerokiemu zakresowi stężeń analitów. Logika tej metody opierała się na przygotowaniu osobnych krzywych kalibracyjnych w ekstraktach z próbek kontrolnych dla każdego poziomu rozcieńczenia. Umożliwiło to oznaczanie związków o wysokiej zawartości w próbkach silnie rozcieńczonych, a analitów śladowych w próbkach o niskim stopniu rozcieńczenia. W każdym przypadku kalibracja była dopasowana do próbki, co skutecznie kompensowało interferencje. W celu dalszej normalizacji i minimalizacji błędów proceduralnych do każdej próbki dodawano wzorce wewnętrzne (w tym, w miarę dostępności, znakowane izotopowo). Oznaczenie opierano na stosunku sygnału analitu do sygnału wzorca, co niwelowało zmienność i zwiększało precyzję wyników. Na etapie przetwarzania danych zastosowałam również próg sygnału (ang. <i>threshold</i>) w celu usunięcia szumu tła i zapewnienia wiarygodności detekcji.
5	Walidacja modeli statystycznych w analizie niecelowanej	W analizie niecelowanej, gdzie do klasyfikacji próbek i identyfikacji biomarkerów wykorzystuje się modele statystyki wielowymiarowej (np. PCA, OPLS-DA), kluczowym wyzwaniem jest ryzyko tzw. nadmiernego dopasowania (ang. <i>overfitting</i>). Zjawisko to prowadzi do tworzenia modeli, które doskonale opisują zbiór danych treningowych, lecz tracą zdolność do generalizacji i poprawnego przewidywania nowych, niezależnych próbek.	Solidność i moc predykcyjną modeli wielowymiarowych zapewniłam poprzez rygorystyczny, wieloetapowy proces walidacji, którego fundamentem była walidacja krzyżowa (ang. <i>cross-validation</i>), która pozwoliła ocenić stabilność i moc predykcyjną modelu poprzez jego wielokrotne trenowanie i testowanie na różnych podzbiorach danych. Jej kluczowym uzupełnieniem były testy permutacyjne, za pomocą których weryfikowałam, czy obserwowana separacja grup nie jest wynikiem przypadkowej struktury danych. Tylko modele, które pomyślnie przeszły obie te procedury, zostały uznane za statystycznie istotne i wykorzystane do dalszej interpretacji wyników. Jakość modeli, zwłaszcza w metodach takich jak OPLS-DA, na bieżąco monitorowałam za pomocą wartości parametrów R^2 i Q^2 . Duża różnica między tymi wartościami stanowiła dla mnie sygnał ostrzegawczy wskazujący na nadmierne dopasowanie. Cały proces walidacji uzupełniałam ponadto o walidację selekcji zmiennych, a także o analizę i wykrywanie obserwacji odstających, co pozwalało na usunięcie próbek mogących zakłócać budowę modelu.

Tabela 2. ciąg dalszy

Lp.	Wyzwanie	Opis problemu	Zastosowana strategia/rozwiązanie
6	Zapewnienie stabilności systemu analitycznego w długich seriach pomiarowych	Długotrwałe sekwencje w analizach LC-MS/MS prowadzą do niestabilności systemu, objawiającej się m.in. przesunięciem czasów retencji lub zmianami czułości detektora. Wprowadza to do danych zmienność instrumentalną, która nie ma podłoża biologicznego. Może ona maskować rzeczywiste różnice między grupami lub tworzyć fałszywe zależności, co bezpośrednio podważa wiarygodność całej analizy.	Aby kontrolować niestabilność systemu i zapewnić powtarzalność pomiarów, wdrożyłam protokół kontroli jakości. Jego elementem była cykliczna analiza próbek zbiorczych (ang. <i>pooled samples</i>), wykonywana co 10 próbek badawczych, co pozwalało na bieżące monitorowanie stabilności sygnału i powtarzalności całego systemu. Protokół ten uzupełniałam o analizy prób ślepych proceduralnych (ang. <i>procedural blanks</i>) w celu identyfikacji potencjalnej kontaminacji pochodzącej z odczynników lub etapu przygotowania próbek, a także o wstrzyknięcia czystego rozpuszczalnika, aby weryfikować efekt przeniesienia (ang. <i>carry-over</i>). Takie kompleksowe podejście gwarantowało, że sygnał z poprzedniej analizy nie zakłócał kolejnego pomiaru, zapewniając wysoką jakość i rzetelność danych gromadzonych w trakcie całej sekwencji analitycznej.
7	Przetwarzanie i standaryzacja dużych zbiorów danych metabolomicznych	Surowe dane generowane w analizach LC-MS/MS, zwłaszcza w trybie niecelowanym, są niezwykle złożone, wielowymiarowe i obciążone szumem instrumentalnym oraz wariancją techniczną. Oznacza to, że oprócz sygnałów pochodzących od rzeczywistych metabolitów, zawierają one również liczne zakłócenia, które uniemożliwiają przeprowadzenie wiarygodnej analizy statystycznej. Bez odpowiedniego, wieloetapowego przetwarzania, niemożliwe jest wyizolowanie prawdziwych informacji biologicznych z tła niepożądanego zmienności.	W mojej pracy zastosowałam wieloetapowy, zautomatyzowany protokół do przetwarzania surowych danych. Pozwoliło to na przekształcenie złożonych plików w spójną i czystą macierz danych, gotową do analizy statystycznej. Proces ten obejmował kluczowe etapy chemometryczne: odsumianie i filtrowanie linii bazowej, detekcję i integrację pików, wyrównywanie czasów retencji w celu skorygowania niestabilności instrumentalnej, redukcję nadmiarowości danych, w tym korektę adduktów i łączenie wyników z jonizacji dodatniej oraz ujemnej, normalizację i skalowanie danych (m.in. za pomocą skalowania Pareto), aby każda próbka była porównywalna. Taki ustandaryzowany przepływ pracy był niezbędny, aby zminimalizować niepożądaną wariancję techniczną i przygotować rzetelny zbiór danych do dalszych, zaawansowanych analiz.

Tabela 2. ciąg dalszy

Lp.	Wyzwanie	Opis problemu	Zastosowana strategia/rozwiązanie
8	Ograniczenia oprogramowania producenta aparatury	Dostępne w ramach tych badań oprogramowania producenta spektrometru, zoptymalizowane głównie do analiz celowanych, nie posiada zaawansowanych modułów niezbędnych do kompleksowej obróbki i statystycznej interpretacji danych niecelowanych.	Aby pokonać te ograniczenia, surowe pliki danych LC-MS/MS konwertowałam do otwartego formatu mzML przy użyciu narzędzia MSConvert, co zapewniło kompatybilność z dalszymi etapami analizy. Następnie przekonwertowane dane były kompleksowo przetwarzane z wykorzystaniem zaawansowanego oprogramowania MS-DIAL, MZmine oraz MetaboAnalyst. Jednak, aby przeanalizować powstałe w ten sposób duże macierze danych bez ryzyka utraty informacji, kluczowe analizy statystyczne przeprowadzałam przy użyciu własnych skryptów napisanych w środowisku R (RStudio). Takie podejście pozwoliło mi ominąć ograniczenia co do wielkości danych narzucane przez platformy internetowe. Dzięki temu miałam pewność, że cały, kompletny zbiór danych został poddany analizie, co było niezbędne dla zachowania integralności wyników i pełnego wykorzystania potencjału badawczego. Takie podejście, oparte na wyspecjalizowanych narzędziach typu <i>open-source</i> , zapewniło pełną kontrolę nad procesem obróbki danych, elastyczność oraz dostęp do najnowszych algorytmów, co nie byłoby możliwe przy użyciu wyłącznie standardowego oprogramowania producenta.
9	Problem porównań wielokrotnych oraz zapewnienie rygoru statystycznego	W analizach metabolomicznych testowanie hipotez dla tysięcy zmiennych jednocześnie prowadzi do tzw. problemu porównań wielokrotnych. Przyczynia się to do wzrostu prawdopodobieństwa popełnienia błędu I rodzaju, czyli uznania za istotne statystycznie różnic, które w rzeczywistości są wynikiem losowej zmienności. Standardowe kryterium istotności ($p < 0,05$) staje się w tym kontekście niewystarczające i prowadzi do wysokiego odsetka fałszywych odkryć. Ponadto, sama istotność statystyczna nie jest równoznaczna z istotnością biologiczną, gdyż nawet wysoce istotna statystycznie zmiana może mieć znikomą wielkość efektu.	Aby zapewnić rzetelność wyników i identyfikować tylko te metabolity, których zmiany są zarówno statystycznie, jak i biologicznie znaczące, wdrożyłam dwutorowe podejście. We wszystkich analizach porównawczych (np. test <i>t</i> -Studenta, ANOVA) stosowałam korektę FDR najczęściej metodą Benjaminiego-Hochberga. Zamiast opierać się na tradycyjnej wartości p , jako kryterium istotności przyjmowałam skorygowaną wartość q . Takie podejście pozwoliło na skuteczną kontrolę błędów statystycznych wynikających z wielokrotnych porównań. Wartość q określa poziom istotności statystycznej, jednak nie dostarcza informacji o wielkości obserwowanego efektu. Dlatego też, dla każdego metabolitu obliczałam również współczynnik FC, czyli stosunek średniego stężenia w grupie badanej do średniego stężenia w grupie kontrolnej. Wysoka wartość FC wskazuje na dużą, potencjalnie istotną biologicznie zmianę. Metabolity, które uznałam za DAMs, musiały spełniać oba kryteria jednocześnie, zarówno istotność biologiczną jak i statystyczną.

Rozdział 4. Podsumowanie i wnioski końcowe

Złożoność i dynamika metabolizmu wtórnego roślin, będąca ewolucyjną odpowiedzią na presję środowiskową, nabiera szczególnego znaczenia w kontekście rolnictwa i bezpieczeństwa żywności, ze względu na unikalną, dwoistą funkcję, która pozwala zarówno aktywnie uczestniczyć w neutralizacji ksenobiotyków, jak i odzwierciedlać w swoim profilu skalę i charakter presji chemicznej. Jako integralne elementy endogennych systemów detoksykacji, metabolity wtórne unieszkodliwiają toksyczne substancje, a jednocześnie, poprzez zmiany w swoim profilu ilościowym i jakościowym, stają się niezwykle czułymi i specyficznymi wskaźnikami (biomarkerami) narażenia, dostarczając tym samym kluczowych informacji o stanie fizjologicznym rośliny oraz skażeniu środowiska i żywności. Metabolity wtórne są nie tylko wskaźnikami ekspozycji na pestycydy, ale również integralnym elementem mechanizmów adaptacyjnych roślin, umożliwiającym im przetrwanie w środowisku obciążonym presją chemiczną. Ich obecność i zmienność odzwierciedlają aktywność szlaków detoksykacyjnych, efektywność neutralizacji stresu oksydacyjnego oraz zdolność do utrzymania homeostazy metabolicznej w warunkach ekspozycji na ksenobiotyki.

Przedstawiona rozprawa doktorska, zrealizowana w oparciu o cykl pięciu publikacji naukowych, stanowi spójne i wieloaspektowe studium nad dynamiką metabolizmu wtórnego w odpowiedzi na ekspozycję na substancje egzogenne. Zaprojektowany w sposób progresywny tok badawczy, ewoluujący od fundamentalnych badań na eukariotycznym organizmie modelowym do złożonych systemów roślinnych i rzeczywistych matryc roślin jadalnych, umożliwił nie tylko opracowanie i walidację zaawansowanych procedur analitycznych, ale także dogłębne zrozumienie mechanizmów biochemicznych leżących u podstaw komórkowej odpowiedzi na stres chemiczny. Zastosowanie zintegrowanej strategii, synergicznie łączącej celowaną i niecelowaną analizę metabolomiczną z zaawansowanymi narzędziami chemometrycznymi i bioinformatycznymi, doprowadziło do uzyskania nowatorskich i spójnych wyników o istotnym potencjalnie poznawczym i aplikacyjnym.

W toku realizacji pracy doktorskiej uzyskałam następujące osiągnięcia naukowe:

1. Opracowałam i zwalidowałam szereg oryginalnych procedur analitycznych opartych na technice LC-MS/MS, które stanowią gotowe narzędzia do precyzyjnej, czulej i selektywnej analizy metabolitów wtórnych w zróżnicowanych, złożonych matrycach biologicznych takich jak drożdże, zboża, owoce. Optymalizacja warunków poszczególnych etapów badań od przygotowania próbek, poprzez dobranie odpowiednich parametrów instrumentalnych po zaawansowane analizy chemometryczne, pozwoliła na uzyskanie wiarygodnych danych ilościowych i jakościowych, co stanowiło fundament dla wszystkich dalszych badań.
2. Badania przeprowadzone na modelu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jednoznacznie potwierdziły, że badane substancje egzogenne indukują mierzalne i charakterystyczne zmiany w metabolizmie wtórnym. W przypadku NTBC wykazałam, że to nie substancja macierzysta, lecz jej produkty transformacji, odgrywają dominującą rolę w modulowaniu endogennych szlaków metabolicznych, w szczególności katabolizmu aminokwasów aromatycznych. W badaniach nad AMT i RMT po raz pierwszy udowodniłam, że substancje należące do tej samej grupy związków chemicznych wywierają odmienny i specyficzny wpływ na profil metaboliczny. Potwierdziło to słuszność fundamentalnej hipotezy pracy, dowodząc, że sygnał analityczny pochodzący z odpowiedzi metabolicznej organizmu dostarcza pełniejszej i bardziej wiarygodnej informacji o skutkach narażenia niż sam pomiar stężenia substancji macierzystej.
3. Przeniesienie badań na złożone systemy roślinne – pszenicę i jęczmień – oraz strategiczne rozszerzenie metodyki o wysokorozdzielczą spektrometrię mas, pozwoliło na szczegółową charakterystykę losów pestycydów w tkankach roślinnych. Porównawcze badania pestycydów syntetycznych i naturalnych dostarczyły jednoznacznych dowodów na to, że badane związki allelopatyczne (HIN, UMB) wykazują znacznie niższą zdolność do trwałego zaburzania metabolizmu zbóż. Wyniki te stanowią nie tylko wkład w rozwój strategii zrównoważonej ochrony roślin, ale przede wszystkim dowodzą, że profilowanie metaboliczne jest czułym narzędziem analitycznym, umożliwiającym różnicowanie subtelnych skutków biologicznych

wywołanych przez różne klasy ksenobiotyków, co w pełni realizuje główny cel badawczy pracy.

4. Końcowy etap badań, przeprowadzony na rzeczywistych próbkach, doprowadził do zidentyfikowania i scharakteryzowania, po raz pierwszy w tak szerokim ujęciu, uniwersalnego panelu 15 biomarkerów roślinnych, których profil ulega stałym i powtarzalnym zmianom w odpowiedzi na stres pestycydowy, niezależnie od rodzaju matrycy i narażenia. Opracowana metodologia, oparta na metabolicznym odcisku palca, stanowi innowacyjne narzędzie do szybkiego, przesiewowego i niezależnego od analizy pozostałości wykrywania chemicznego stresu w roślinach jadalnych, co otwiera drogę do nowych strategii oceny bezpieczeństwa żywności.
5. Kluczowe dla interpretacji wyników było zastosowanie przeze mnie zaawansowanej obróbki chemometrycznej i bioinformatycznej. Wykorzystanie pełnego spektrum narzędzi – od nienadzorowanych (PCA) i nadzorowanych (PLS-DA, OPLS-DA) metod klasyfikacji, przez analizę istotności zmiennych (test *t*-Studenta, ANOVA, VIP), aż po zaawansowane techniki, takie jak analiza sieci korelacji (algorytm DSPC) i analiza wzbogacania szlaków metabolicznych (algorytm Mummichog, przyporządkowanie do bazy KEGG) – pozwoliło na transformację surowych danych analitycznych w spójną wiedzę metabolomiczną. Umożliwiło to nie tylko selekcję potencjalnych biomarkerów, ale także zrozumienie ich wzajemnych zależności i umieszczenie ich w kontekście kluczowych szlaków biochemicznych zaburzanych przez ksenobiotyki.

Perspektywa przyszłych badań

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej otwierają szerokie perspektywy dla dalszych badań naukowych i aplikacyjnych, wskazując na kilka kluczowych kierunków rozwoju.

Rozwój i walidacja panelu biomarkerów: Zidentyfikowany panel 15 biomarkerów wymaga dalszej walidacji na szerszej grupie matryc żywnościowych oraz w odniesieniu do większej liczby klas pestycydów i ich mieszanin. Badania powinny zmierzać w kierunku opracowania modeli ilościowych, korelujących intensywność odpowiedzi metabolicznej ze stężeniem poszczególnych ksenobiotyków, co umożliwiłoby predykcyjną ocenę stopnia skażenia.

Opracowanie bioczuJNIKÓW do szybkiej analizy przesiewowej: Zidentyfikowane biomarkery mogą stanowić podstawę do projektowania nowatorskich bioczuJNIKÓW. Rozwój takich narzędzi, opartych np. na technologiach elektrochemicznych lub optycznych, mógłby umożliwić stworzenie przenośnych, szybkich i tanich testów do wstępnej kontroli jakości żywności bezpośrednio w punktach przyjęcia surowca lub na liniach produkcyjnych, znacząco usprawniając systemy bezpieczeństwa żywności.

Integracja z innymi technikami „omicznymi”: Pełne zrozumienie mechanizmów odpowiedzi roślin na ksenobiotyki wymaga zintegrowanego podejścia systemowego. Połączenie uzyskanych danych metabolomicznych z danymi z zakresu genomiki, transkryptomiki i proteomiki pozwoliłoby na stworzenie holistycznego obrazu procesów molekularnych, od ekspresji genów po końcowy produkt metaboliczny. Taka integracja umożliwiłaby identyfikację genów i białek odpowiedzialnych za detoksykację oraz wskazanie potencjalnych celów dla inżynierii genetycznej w celu zwiększenia odporności roślin.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauk chemicznych, a w szczególności w dynamicznie rozwijającą się dziedzinę metabolomiki. Kluczowym, nowatorskim osiągnięciem tej pracy jest empiryczne udowodnienie, że złożony wzorzec zmian metabolicznych może pełnić funkcję wiarygodnego, zintegrowanego sygnału analitycznego. Praca ta nie tylko przedstawia nowe wyniki i poszerza wiedzę teoretyczną, ale także proponuje zmianę perspektywy w analitycznej ocenie bezpieczeństwa chemicznego, otwierając obiecujące ścieżki dla praktycznych zastosowań w ochronie zdrowia publicznego i zrównoważonym rolnictwie.

Bibliografia

- [1] Minczewski, J.; Marczenko, Z. *Chemia analityczna. Tom 1: Podstawy teoretyczne i analiza jakościowa*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, **2012**.
- [2] Kościelniak, P. *Kalibracja w jakościowej i ilościowej analizie chemicznej*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, **2017**.
- [3] Viant, M. R.; Sommer, U. Mass spectrometry based environmental metabolomics: A primer and review. *Metabolomics* **2013**, *9*, 144–158. doi: 10.1007/s11306-012-0412-x.
- [4] Sun, Y.; Fernie, A. R. Plant secondary metabolism in a fluctuating world: climate change perspectives. *Trends Plant Sci.* **2024**, *29*, 560–571. doi: 10.1016/j.tplants.2023.11.008.
- [5] Samsami, H.; Maali-Amiri, R. Global insights into intermediate metabolites: Signaling, metabolic divergence and stress response modulation in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2024**, *213*, 108862. doi: 10.1016/j.plaphy.2024.108862.
- [6] Liu, N.; Huang, J.; Liu, X.; Wu, J.; Huang, M. Pesticide-induced metabolic disruptions in crops: A global perspective at the molecular level. *Sci. Total Environ.* **2024**, *957*, 177665. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.177665.
- [7] Wang, X.; Lu, Y.; He, J.; Li, X.; Xu, Y.; Ren, L.; Li, H. Untargeted metabolomics reveals the mechanism of amantadine toxicity on *Laminaria japonica*. *Front. Physiol.* **2024**, *15*, 1–11. doi: 10.3389/fphys.2024.1448259.
- [8] Davison, A. S.; Norman, B. P.; Sutherland, H.; Milan, A. M.; Gallagher, J. A.; Jarvis, J. C.; Ranganath, L. R. Impact of nitisinone on the cerebrospinal fluid metabolome of a murine model of alkaptonuria. *Metabolites* **2022**, *12*, 477. doi: 10.3390/metabo12060477.
- [9] Duina, A. A.; Miller, M. E.; Keeney, J. B. Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* **2014**, *197*, 33–48. doi: 10.1534/genetics.114.163188.
- [10] Cazzanelli, G.; Pereira, F.; Alves, S.; Francisco, R.; Azevedo, L.; Carvalho, P. D.; Almeida, A.; Côrte-Real, M.; Oliveira, M. J.; Lucas, C.; Sousa, M. J.; Preto, A. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model for understanding RAS proteins and their role in human tumorigenesis. *Cells* **2018**, *7*, 1–35. doi: 10.3390/cells7020014.
- [11] Li, F.; Chen, Y.; Qi, Q.; Wang, Y.; Yuan, L.; Huang, M.; Elsemman, I. E.; Feizi, A.; Kerkhoven, E. J.; Nielsen, J. Improving recombinant protein production by yeast through

- genome-scale modeling using proteome constraints. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1–13. doi: 10.1038/s41467-022-30689-7.
- [12] Hazelwood, L. A.; Daran, J. M.; Van Maris, A. J. A.; Pronk, J. T.; Dickinson, J. R. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2259–2266. doi: 10.1128/aem.02625-07.
- [13] Valdés-Santiago, L.; Ruiz-Herrera, J. Stress and polyamine metabolism in fungi. *Front. Chem.* **2014**, *1*, 1–10. doi: 10.3389/fchem.2013.00042.
- [14] Sakamoto, A.; Terui, Y.; Uemura, T.; Igarashi, K.; Kashiwagi, K. Polyamines regulate gene expression by stimulating translation of histone acetyltransferase mRNAs. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 8736–8745. doi: 10.1074/jbc.ra120.013833.
- [15] Siddhardha, B.; Dyavaiah, M.; Kasinathan, K. *Saccharomyces cerevisiae* as model organism to study biological activities of nanoparticles. In *Model Org. to Study Biol. Act. Toxic. Nanoparticles*; Siddhardha, B., Dyavaiah, M., Kasinathan, K., Eds.; Springer: Singapore, **2020**; 101–115. doi: 10.1007/978-981-15-1702-0.
- [16] Maneira, C.; Chamas, A.; Lackner, G. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for medical applications. *Microb. Cell Fact.* **2025**, *24*. doi: 10.1186/s12934-024-02625-5.
- [17] Endara, M. J.; Forrister, D. L.; Coley, P. D. The evolutionary ecology of plant chemical defenses: from molecules to communities. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2023**, *54*, 107–127. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102221-045254.
- [18] Ninkuu, V.; Aluko, O. O.; Yan, J.; Zeng, H.; Liu, G.; Zhao, J.; Li, H.; Chen, S.; Dakora, F. D. Phenylpropanoids metabolism: recent insight into stress tolerance and plant development cues. *Front. Plant Sci.* **2025**, *16*. doi: 10.3389/fpls.2025.1571825.
- [19] Khamare, Y.; Chen, J.; Marble, S. C. Allelopathy and its application as a weed management tool: A review. *Plant Sci.* **2022**, *13*, 1–17. doi: 10.3389/fpls.2022.1034649.
- [20] Colinas, M.; Goossens, A. Combinatorial transcriptional control of plant specialized metabolism. *Trends Plant Sci.* **2018**, *23*, 324–336. doi: 10.1016/j.tplants.2017.12.006.
- [21] Jan, R.; Asaf, S.; Numan, M.; Lubna; Kim, K. M. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy* **2021**, *11*, 1–31. doi: 10.3390/agronomy11050968.

- [22] Niculaes, C.; Abramov, A.; Hannemann, L.; Frey, M. Plant protection by benzoxazinoids—recent insights into biosynthesis and function. *Agronomy* **2018**, *8*. doi: 10.3390/agronomy8080143.
- [23] Brunetti, C.; Di Ferdinando, M.; Fini, A.; Pollastri, S.; Tattini, M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 3540–3555. doi: 10.3390/ijms14023540.
- [24] Nan, Z. D.; Shang, Y.; Zhu, Y. D.; Zhang, H.; Sun, R. R.; Tian, J. J.; Jiang, Z. B.; Ma, X. L.; Bai, C. Systematic review of natural coumarins in plants (2019–2024): Chemical structures and pharmacological activities. *Phytochemistry* **2025**, *235*, 114480. doi: 10.1016/j.phytochem.2025.114480.
- [25] Zhao, K.; Rhee, S. Y. Omics-guided metabolic pathway discovery in plants: Resources, approaches, and opportunities. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2022**, *67*, 102222. doi: 10.1016/j.pbi.2022.102222.
- [26] Menger, F.; Boström, G.; Jonsson, O.; Ahrens, L.; Wiberg, K.; Kreuger, J.; Gago-Ferrero, P. Identification of pesticide transformation products in surface water using suspect screening combined with national monitoring data. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55*, 10343–10353. doi: 10.1021/acs.est.1c00466.
- [27] Rousis, N. I.; Bade, R.; Bijlsma, L.; Zuccato, E.; Sancho, J. V.; Hernandez, F.; Castiglioni, S. Monitoring a large number of pesticides and transformation products in water samples from Spain and Italy. *Environ. Res.* **2017**, *156*, 31–38. doi: 10.1016/j.envres.2017.03.013.
- [28] Bertrand, C.; Gonzalez-Coloma, A.; Prigent-Combaret, C. Plant metabolomics to the benefit of crop protection and growth stimulation. *Adv. Bot. Res.* **2021**, *98*, 107–132. doi: 10.1016/bs.abr.2020.11.002.
- [29] Witkiewicz, Z.; Kałużna-Czaplińska, J.; Wardencki, W.; Malinowska, I. B. *Biochromatografia*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, **2024**. doi: 10.53271/2024.063.
- [30] Anjali; Kumar, S.; Korra, T.; Thakur, R.; Arutselvan, R.; Kashyap, A. S.; Nehela, Y.; Chaplygin, V.; Minkina, T.; Keswani, C. Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. *Plant Stress* **2023**, *8*, 100154. doi: 10.1016/j.stress.2023.100154.

- [31] Schnarr, L.; Segatto, M. L.; Olsson, O.; Zuin, V. G.; Kümmerer, K. Flavonoids as biopesticides – Systematic assessment of sources, structures, activities and environmental fate. *Sci. Total Environ.* **2022**, *824*, 153781. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153781.
- [32] Hussain, M. I.; Araniti, F.; Schulz, M.; Baerson, S.; Vieites-Álvarez, Y.; Rempelos, L.; Bilsborrow, P.; Chinchilla, N.; Macías, F. A.; Weston, L. A.; Reigosa, M. J.; Sánchez-Moreiras, A. M. Benzoxazinoids in wheat allelopathy – From discovery to application for sustainable weed management. *Environ. Exp. Bot.* **2022**, *202*. doi: 10.1016/j.envexpbot.2022.104997.
- [33] Zhang, J. J.; Yang, H. Metabolism and detoxification of pesticides in plants. *Sci. Total Environ.* **2021**, *790*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148034.
- [34] Li, H.; Chen, N.; Zhang, H.; Xu, D. Multidimensional regulation of transcription factors: decoding the comprehensive signals of plant secondary metabolism. *Front. Plant Sci.* **2025**, *16*, 1–17. doi: 10.3389/fpls.2025.1522278.
- [35] Schrimpe-Rutledge, A. C.; Codreanu, S. G.; Sherrod, S. D.; McLean, J. A. Untargeted metabolomics strategies—challenges and emerging directions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27*, 1897–1905. doi: 10.1007/s13361-016-1469-y.
- [36] Buszewski, B.; Staneczko-Baranowska, I. *Bioanalalityka. Tom 2*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, **2020**.
- [37] Fiehn, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155–171. doi: 10.1023/a:1013713905833.
- [38] Palaniswamy, S.; Abass, K.; Rysä, J.; Grimalt, J. O.; Odland, J. Ø.; Rautio, A.; Järvelin, M. R. Investigating the relationship between non-occupational pesticide exposure and metabolomic biomarkers. *Front. Public Heal.* **2023**, *11*. doi: 10.3389/fpubh.2023.1248609.
- [39] Broadhurst, D.; Goodacre, R.; Reinke, S. N.; Kuligowski, J.; Wilson, I. D.; Lewis, M. R.; Dunn, W. B. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics* **2018**, *14*, 1–17. doi: 10.1007/s11306-018-1367-3.
- [40] Wang, J.; Chow, W.; Wong, J. W.; Leung, D.; Chang, J.; Li, M. Non-target data acquisition for target analysis (nDATA) of 845 pesticide residues in fruits and vegetables using

- UHPLC/ESI Q-Orbitrap. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 1421–1431. doi: 10.1007/s00216-019-01581-z.
- [41] Uthe, H.; van Dam, N. M.; Hervé, M. R.; Sorokina, M.; Peters, K.; Weinhold, A. A practical guide to implementing metabolomics in plant ecology and biodiversity research. *Adv. Bot. Res.* **2021**, *98*, 163–203. doi: 10.1016/bs.abr.2020.09.019.
- [42] Gika, H. G.; Theodoridis, G. A.; Plumb, R. S.; Wilson, I. D. Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 12–25. doi: 10.1016/j.jpba.2013.06.032.
- [43] Hajnajafi, K.; Iqbal, M. A. Mass-spectrometry based metabolomics: an overview of workflows, strategies, data analysis and applications. *Proteome Sci.* **2025**, *23*. doi: 10.1186/s12953-025-00241-8.
- [44] Campanale, C.; Massarelli, C.; Losacco, D.; Bisaccia, D.; Triozzi, M.; Uricchio, V. F. The monitoring of pesticides in water matrices and the analytical criticalities: A review. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2021**, *144*, 116423. doi: 10.1016/j.trac.2021.116423.
- [45] Defossez, E.; Bourquin, J.; von Reuss, S.; Rasmann, S.; Glauser, G. Eight key rules for successful data-dependent acquisition in mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **2023**, *42*, 131–143. doi: 10.1002/mas.21715.
- [46] Worley, B.; Powers, R. Multivariate analysis in metabolomics. *Curr. Metabolomics* **2013**, *1*, 92–107.
- [47] Kupis, J.; Skowron-Jaskólska, M.; Szczukocki, D.; Krawczyk, B. *Metrologia i chemometria w analityce środowiska*; Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego: Łódź, **2014**.
- [48] Kocjan, R. *Chemia analityczna. Tom 2: Analiza instrumentalna*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa, **2022**.
- [49] Martín-Gómez, A.; Rodríguez-Hernández, P.; Cardador, M. J.; Vega-Márquez, B.; Rodríguez-Estévez, V.; Arce, L. Guidelines to build PLS-DA chemometric classification models using a GC-IMS method: Dry-cured ham as a case of study. *Talanta Open* **2023**, *7*, 100175. doi: 10.1016/j.talo.2022.100175.
- [50] Madsen, R.; Lundstedt, T.; Trygg, J. Chemometrics in metabolomics—A review in human disease diagnosis. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *659*, 23–33. doi: 10.1016/j.aca.2009.11.042.

- [51] Ruiz-Perez, D.; Guan, H.; Madhivanan, P.; Mathee, K.; Narasimhan, G. So you think you can PLS-DA?. *BMC Bioinformatics* **2020**, *21*, 1–10. doi: 10.1186/s12859-019-3310-7.
- [52] Huang, Z.; Wang, C. A review on differential abundance analysis methods or mass spectrometry-based metabolomic data. *Metabolites* **2022**, *12*. doi: 10.3390/metabo12040305.
- [53] Norman, B. P.; Davison, A. S.; Hughes, J. H.; Sutherland, H.; Wilson, P. J.; Berry, N. G.; Hughes, A. T.; Milan, A. M.; Jarvis, J. C.; Roberts, N. B.; Ranganath, L. R.; Bou-Gharios, G.; Gallagher, J. A. Metabolomic studies in the inborn error of metabolism alkaptonuria reveal new biotransformations in tyrosine metabolism. *Genes Dis.* **2022**, *9*, 1129–1142. doi: 10.1016/j.gendis.2021.02.007.
- [54] Chegão, A.; Vicente Miranda, H. Unveiling new secrets in Parkinson's disease: The glycatome. *Behav. Brain Res.* **2023**, *442*, 114309. doi: 10.1016/j.bbr.2023.114309.
- [55] Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 2097–2098. doi: 10.1021/es5002105.
- [56] Barchanska, H.; Babilas, B.; Gluzicka, K.; Zralek, D.; Baranowska, I. Rapid determination of mesotrione, atrazine and its main degradation products in selected plants by MSPD - HPLC and indirect estimation of herbicides phytotoxicity by chlorophyll quantification. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2014**, *94*, 99–114. doi: 10.1080/03067319.2013.791977.
- [57] Vieira, L. A. J.; Alves, R. D. F. B.; Menezes-Silva, P. E.; Mendonça, M. A. C.; Silva, M. L. F.; Silva, M. C. A. P.; Sousa, L. F.; Loram-Lourenço, L.; da Silva, A. A.; Costa, A. C.; Silva, F. G.; Farnese, F. S. Water contamination with atrazine: is nitric oxide able to improve *Pistia stratiotes* phytoremediation capacity?. *Environ. Pollut.* **2021**, *272*, 115971. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115971.
- [58] *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*; Document No. SANTE/11312/2021; European Commission, **2021**.

Wykaz rysunków i tabel

Rysunek 1. Porównanie dwóch głównych strategii analitycznych stosowanych w badaniach metabolomicznych.	25
Rysunek 2. Wizualizacja progresywnego rozszerzania zakresu analitycznego pracy na podstawie bazy KEGG.	37
Rysunek 3. Wykres wyników PCA oparty na wartościach FC dla stężeń oznaczanych amin i aminokwasów, ukazujący wyraźne grupowanie próbek w zależności od matrycy. Punkty, odpowiadające pojedynczym próbkom, są oznaczone kolorami według rodzaju rośliny jadalnej.	47
Rysunek 4. Schemat koncepcyjny ilustrujący uniwersalność panelu 15 biomarkerów. Różnorodne klasy pestycydów, mimo odmiennych mechanizmów działania, indukują w roślinie wspólną, mierzalną odpowiedź metaboliczną, która jest wykrywana jako spójny sygnał analityczny.	50
Rysunek 5. Sieć korelacji metabolicznych ilustrująca wzajemne powiązania pomiędzy związkami zidentyfikowanymi w toku badań. Kolory węzłów oznaczają zmianę zawartości (zielony – wzrost, czerwony – spadek). Numery wskazują klastry funkcjonalne.	53
Tabela 1. Zestawienie etapów badawczych, zastosowanych strategii i kluczowych wyników	15
Tabela 2. Zestawienie kluczowych wyzwań metodologicznych i zastosowanych środków zaradczych	55

Wykaz dorobku naukowego

I. Publikacje

1. **Kostina-Bednarz, M.***; Płonka, J.; Perkons, I.; Bartkevics, V.; Barchańska, H. Pesticides of natural origin as safer alternatives to synthetic pesticides: Identification of hinokitiol, tebuconazole and 2,4-D metabolites and evaluation of their impact on cereals. *Science of The Total Environment* **2025**, 973, 179177, doi: 10.1016/j.scitotenv.2025.179177. **(200 pkt MEiN, IF: 8.0)**
2. Płonka J.; **Kostina-Bednarz, M.**; Barchańska, H.* Targeted analysis, metabolic profiling, and fingerprinting based on an LC(GC)-MS approach for the comprehensive evaluation of pesticide content in edible plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2025**, 1–26, doi: 10.1080/10408347.2024.2449062 **(100 pkt MEiN, IF: 5.2)**
3. **Kostina-Bednarz, M.***; Płonka, J.; Barchańska, H. Allelopathy as a source of bioherbicides: challenges and prospects for sustainable agriculture. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **2023**, 22, 471–504, doi: 10.1007/s11157-023-09656-1. **(140 pkt MEiN, IF: 14.4)**
4. **Kostina-Bednarz, M.***; Płonka, J.; Barchańska H. Metabolic profiling to evaluate the impact of amantadine and rimantadine on the secondary metabolism of a model organism. *Scientific Reports* **2023**, 13, 16822, doi: 10.1038/s41598-023-43540-w. **(140 pkt MEiN, IF: 4.6)**
5. Barchańska, H.; Płonka, J.; Nowak, P.; **Kostina-Bednarz, M.*** Metabolic profiles and fingerprints for the investigation of the influence of nitisinone on the metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific Reports* **2023**, 13, 1473, doi: 10.1038/s41598-023-28335-3. **(140 pkt MEiN, IF: 4.6)**

II. Monografie

1. **Kostina-Bednarz, M.***, Płonka, J., Barchańska, H. Związki pochodzenia naturalnego jako ekologiczna alternatywa dla syntetycznych pestycydów. W: *Ochrona klimatu i środowiska, nowoczesna energetyka: wybrana problematyka, Monografia POB6*, **2024**, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, doi: 10.34918/88720. **(20 pkt MEiN)**

III. Wystąpienia konferencyjne

gwiazdką oznaczono osobę prezentującą

1. **Kostina-Bednarz, M.***, Partyka, M., Płonka, J., Barchańska, H. „Nowoczesne podejście do oceny wpływu pestycydów na metabolizm roślin jadalnych przy użyciu LC-MS/MS”, Polska Konferencja Chemii Analitycznej, PoKoChA 2025 (01–04.07.2025, Gdańsk) konferencja ogólnopolska – komunikat ustny
2. Barchańska, H.*, Winkler, K., **Kostina-Bednarz, M.** „Wpływ pestycydów syntetycznych i biopestycydów na profil metaboliczny i parametry fizjologiczne roślin”, Polska Konferencja Chemii Analitycznej, PoKoChA 2025 (01–04.07.2025, Gdańsk) konferencja ogólnopolska – poster
3. **Kostina-Bednarz, M.***, Płonka, J., Barchańska, H. „Pesticides in sustainable agriculture: challenges of metabolite profiling and environmental impact”, XII International Environmental Protection and Energy Conference (06.12.2024, Gliwice) konferencja międzynarodowa – poster
4. **Kostina-Bednarz, M.***, Płonka, J., Perkons, I., Bartkevics, V., Barchańska, H. „Analiza chemometryczna i identyfikacja metabolitów związków o potencjale allelopatycznym”, 66. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (15–20.09.2024, Poznań) konferencja ogólnopolska – komunikat ustny
5. **Kostina-Bednarz, M.***, Płonka, J., Perkons, I., Bartkevics, V., Barchańska, H. „Zastosowanie narzędzi chemometrycznych do identyfikacji metabolitów biopestycydów”, IV Siedleckie Forum Doktorantów (06.09.2024, online) konferencja ogólnopolska – komunikat ustny
6. **Kostina-Bednarz, M.***, Barchańska, H., Płonka, J. „Studies on the influence of selected allelopathic compounds in cereal metabolism”, European Science in the City and EuroScience Open Forum (12–15.06.2024, Katowice) konferencja międzynarodowa – poster
7. **Kostina-Bednarz, M.***, Płonka, J., Barchańska, H. „Metabolic profiling and non-target LC-MS/MS approach to assess exposure to selected natural and synthetic pesticides in cereals”, IX Międzynarodowa Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uczelni Technicznych (20–21.05.2024, Ustroń) konferencja międzynarodowa – komunikat ustny

8. **Kostina-Bednarz, M.***, Barchańska, H., Płonka, J. „Allelopatia jako źródło bioherbicydów: wyzwania i perspektywy zrównoważonego rolnictwa”, Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego (09.12.2023, Łódź) konferencja ogólnopolska – poster
9. **Kostina-Bednarz, M.***, Barchańska, H., Płonka, J. „Profilowanie metaboliczne do oceny wpływu amantadyny i rymantadyny na metabolizm wtórny organizmu modelowego”, XIII Polska Konferencja Chromatograficzna (25–28.06.2023, Katowice) konferencja ogólnopolska – komunikat ustny
10. **Kostina-Bednarz, M.***, Barchańska, H., Płonka, J. „Opracowanie warunków wydzielania i chromatograficznego oznaczania związków wchodzących w szlak kwasu szikimowego drożdży”, 64. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (11–16.09.2022, Lublin) konferencja ogólnopolska – komunikat ustny
11. **Kostina-Bednarz, M.***, Barchańska, H., Płonka, J. „Preliminary studies of nitisinone metabolism in model systems”, Computational Oncology and Personalized Medicine. The challenges of the future (27.04.2022, Gliwice) – komunikat ustny
12. Barchańska, H.*, Płonka, J., **Kostina-Bednarz, M.**, Shakeel, N. „Metabolity wtórne roślin jako źródło sygnału analitycznego w kontroli jakości żywności pochodzenia roślinnego”, V Ogólnopolska Konferencja Naukowa Pierwotne i Wtórne Metabolity Roślin i Grzybów (27.01.2022, online) konferencja ogólnopolska – komunikat ustny

IV. Projekty badawcze i współprace naukowe

1. Współpraca naukowa z akredytowanym laboratorium analitycznym i2 Analytical Limited Sp. z o. o. oddział w Polsce, Ruda Śląska (od 2023 roku)
2. Współpraca naukowa z instytutem naukowym na Łotwie Institute of Food Safety, Animal Health and Environment „BIOR”, Ryga, Łotwa (od 2022 roku)
3. Grant „Kompleksowe wsparcie rozwoju Wspólnej Szkoły Doktorskiej i aktywności naukowej doktorantów związanej z potrzebami zielonej i cyfrowej gospodarki” realizowany przez Politechnikę Śląską w ramach Funduszy Europejskich, numer projektu: FESL.10.25-IZ.01-07E7/23 (24.01.2025–30.09.2025) – uczestnik
4. Grant projakościowy na dofinansowanie rozpoczęcia działalności naukowej w nowej tematyce badawczej w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza

- na Politechnice Śląskiej „Identyfikacja metabolitów hinokitiolu – naturalnego pestycydu w celu określenia jego mechanizmu działania”, numer projektu: 32/014/SDU/10-22-94 (29.11.2024–30.09.2025) – kierownik
5. Grant projakościowy na dofinansowanie badań o charakterze przełomowym w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza na Politechnice Śląskiej „Badania nad metabolizmem amantadyny”, numer projektu: 32/014/SDU/10-21-03 (06.06.2022–05.06.2024) – kierownik
 6. Międzynarodowy projekt współfinansowanym przez Rządy Czech, Węgier, Polski i Słowacji poprzez Granty Wyszehradzkie z Międzynarodowego Funduszu Wyszehradzkiego. V4 Summer School on Smart Analytical Science – V4SSSAS, project id: 22310207 (23–28.09.2024) – uczestnik
 7. Projekt BKM „Zastosowanie analizy niecelowanej LC-MS/MS do badań monitoringowych pozostałości środków ochrony roślin w owocach i warzywach”, nr projektu: BKM-533/RCH1/2024 (rok akademicki 2024/2025)– kierownik
 8. Projekt BKM „Analiza niecelowana do oceny narażenia pestycydami roślin jadalnych; numer projektu”, nr projektu: BKM-531/RCH1/2023 (rok akademicki 2022/2023) – kierownik
 9. Projekt BKM „Opracowanie metody wydzielania amin biogennych z materiałów biologicznych”, numer projektu: BKM-591/RCH1/2022 (rok akademicki 2021/2022) – kierownik

V. Warsztaty i szkolenia

1. Szkolenie „Statistics with R and RStudio” (07–09.04.2025, online)
2. Szkolenie „Dedicated Individual Workshops on Bioinformatics Analysis of Metabolomic Data” (05–07.03.2025, online)
3. Szkolenie „Introduction to R Programming” (11–13.12.2024, online)
4. Szkolenie „Analysis of metabolomics data – chromatography – mass spectrometry” (10–11.02.2024, online)
5. Szkolenie „Advanced analysis of metabolomics data – chromatography – mass spectrometry” (07–08.11.2023, online)

6. Szkolenie w zakresie przygotowania do pracy w charakterze kierownika projektów badawczych (05–06.2023, Gliwice)
1. Szkolenie „Szkolenie grupowe z zakresu obsługi LC-MS/MS (Dionex/AB Sciex Q-Trap 4000) i oprogramowania MarkerView” (15–17.11.2021, Gliwice)

VI. Działalność dydaktyczna i naukowa

1. Opiekun naukowy prac magisterskich realizowanych przez inż. Darię Gabryszak i inż. Barbarę Kurylas (rok akademicki 2024/2025)
2. Pomocniczy opiekun naukowy w projekcie PBL „Allelopatyki jako ekologiczna alternatywa dla pestycydów syntetycznych” (10.2024–01.2025)
3. Nagroda Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów (rok akademicki 2024/2025)
4. Współorganizator wydarzenia „Chemikalia – twoja atomowa uczta wiedzy 2024”, Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej (21.06.2024)
5. Współorganizator wydarzenia „Sesja Posterowa Dyplomantów 2024”, Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej (21.06.2024)
6. Opiekun naukowy Studenckiego Koła Naukowego Chemików podczas 30. edycji Wiosennych Targów Pracy, Przedsiębiorczości, Technologii i Dostępności Politechniki Śląskiej (11.03.2024)
7. Opiekun naukowy Studenckiego Koła Naukowego Chemików podczas warsztatów z elektrochemii w ramach zajęć „Od średniaka do studenciaka” dla uczniów ALO w Rybniku (12.02.2024)
8. Pomocniczy opiekun naukowy w projekcie PBL „Poprawa walorów konsumpcyjnych wody wodociągowej” (10.2023–01.2024)
9. Członkini Polskiego Towarzystwa Chemicznego (od 2023 roku)
10. Opiekun naukowy prac magisterskich realizowanych przez inż. Natalię Wocławek i inż. Samuela Szmidę (rok akademicki 2022/2023)
11. Opiekun naukowy prac magisterskich realizowanych przez inż. Klaudię Mrożek i inż. Paulinę Nowak (rok akademicki 2021/2022)