



Autoreferat

Identyfikacja metabolomicznych i proteomicznych składników molekularnych związanych z chorobą nowotworową technikami spektrometrii mas

Dr inż. Anna Wojakowska

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Poznań 2022

1. Imię i nazwisko

Anna Wojakowska

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- **2013:** Doktor nauk chemicznych w dziedzinie biochemii (z wyróżnieniem)
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
Rozprawa doktorska pt. „Wykorzystanie technik spektrometrii mas do profilowania i analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych”.
Promotor: prof. dr hab. Maciej Stobiecki
- **2008:** Magister inżynier biotechnologii, specjalizacja biotechnologia przemysłowa (z wyróżnieniem)
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Praca magisterska pt. „Zastosowanie termoseparujących polimerów do ekstrakcji lizozymu z białka jaja kurzego w wodnych układach dwufazowych”.
Promotor: dr hab. Radosław Dembczyński

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **04/2018 – obecnie:** Adiunkt
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
Pracownia Spektrometrii Mas przy Zakładzie Proteomiki Biomedycznej
05/2018-05/2019: urlop macierzyński i rodzicielski
- **11/2013 – 04/2018:** Starszy specjalista
Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie oddział w Gliwicach (obecnie Narodowy Instytut Onkologii Państwowy Instytut Badawczy)
Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów
09/2015-09/2016: urlop macierzyński i rodzicielski
- **02/2013 – 10/2013:** Asystent
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
Pracownia Proteomiki i Metabolomiki ICHB PAN

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Identyfikacja metabolomicznych i proteomicznych składników molekularnych związanych z chorobą nowotworową technikami spektrometrii mas.

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

H1. Wojakowska A, Marczak Ł, Jelonek K, Polanski K, Widlak P, Pietrowska M*. An Optimized Method of Metabolite Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue for GC/MS Analysis. *PLoS One*. **2015**;10(9):e0136902.

DOI:10.1371/journal.pone.0136902

IF₂₀₁₄=3.234; MNI_{SW}₂₀₁₄=40; MNI_{SW}₂₀₂₁=100; C=30

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy oraz zaplanowaniu eksperymentów (wraz z autorem korespondencyjnym), opracowaniu metodyki badawczej, wykonaniu eksperymentów, analizie danych, interpretacji danych (wraz z autorem korespondencyjnym), napisaniu w całości pierwszej wersji manuskryptu, pełnej edycji i poprawie manuskryptu w odpowiedzi na recenzje (wraz z autorem korespondencyjnym).

H2. Wojakowska A, Chekan M, Marczak Ł, Polanski K, Lange D, Pietrowska M, Widlak P*. Detection of metabolites discriminating subtypes of thyroid cancer: Molecular profiling of FFPE samples using the GC/MS approach. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2015**;417:149-57.

DOI:10.1016/j.mce.2015.09.021

IF₂₀₁₄=4.405; MNI_{SW}₂₀₁₄=30; MNI_{SW}₂₀₂₁=100; C=31

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy (wraz z autorem korespondencyjnym), zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich eksperymentów, analizie uzyskanych danych, interpretacji danych (wraz z autorem korespondencyjnym), napisaniu w całości pierwszej wersji manuskryptu, redagowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu (wraz z autorem korespondencyjnym).

H3. Wojakowska A, Chekan M, Widlak P, Pietrowska M*. Application of Metabolomics in Thyroid Cancer Research. *International Journal of Endocrinology*. **2015**;258763.

DOI:10.1155/2015/258763

IF₂₀₁₄=1.948; MNI_{SW}₂₀₁₄=20; MNI_{SW}₂₀₂₁=70; C=37

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu koncepcji pracy (wraz z autorem korespondencyjnym), zebraniu i przeanalizowaniu materiałów źródłowych i ich opracowaniu wraz z pozostałymi współautorami, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, redagowaniu ostatecznej wersji manuskryptu i jego poprawie w odpowiedzi na recenzje (wraz z autorem korespondencyjnym).

H4. Wojakowska A, Cole LM, Chekan M, Bednarczyk K, Maksymiak M, Oczko-Wojciechowska M, Jarzab B, Clench MR, Polańska J, Pietrowska M, Widlak P*. Discrimination of papillary thyroid cancer from non-cancerous thyroid tissue based on lipid profiling by mass spectrometry imaging. *Endokrynologia Polska*. **2018**;69(1):2-8.

DOI:10.5603/EP.a2018.0003

IF₂₀₁₇=1.059; MNI_{SW}₂₀₁₆=15; MNI_{SW}₂₀₂₁=70; C=15

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy (wraz z autorem korespondencyjnym), zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów, analizie uzyskanych danych, interpretacji uzyskanych danych (wraz z autorem korespondencyjnym), napisaniu w całości pierwszej wersji manuskryptu, redagowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu (wraz z autorem korespondencyjnym).

H5. Gawin M[#], Wojakowska A[#], Pietrowska M, Marczak Ł, Chekan M, Jelonek K, Lange D, Jaksik R, Gruca A, Widlak P*. Proteome profiles of different types of thyroid cancers. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2018**;472:68-79.

DOI:10.1016/j.mce.2017.11.020

IF₂₀₁₇=3.563; MNiSW₂₀₁₆=35; MNiSW₂₀₂₁=100; C=15

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy (wraz z autorem korespondencyjnym), udziale w zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów, udziale w analizie danych, redagowaniu ostatecznej wersji manuskryptu (wraz z autorem korespondencyjnym).

H6. Wojakowska A[#], Zebrowska A[#], Skowronek A, Rutkowski T, Polanski K, Widlak P, Marczak L^{*}, Pietrowska M^{*}. Metabolic Profiles of Whole Serum and Serum-Derived Exosomes Are Different in Head and Neck Cancer Patients Treated by Radiotherapy. *Journal of Personalized Medicine*. **2020**;10(4):229.

DOI:10.3390/jpm10040229

IF₂₀₁₉=4.433; MNiSW₂₀₁₉=70; MNiSW₂₀₂₁=70; C=10

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: udziale w opracowaniu metodyki badawczej oraz nadzorowaniu eksperymentów, analizie uzyskanych danych, interpretacji danych (wraz z autorami korespondencyjnymi), napisaniu pierwszej wersji manuskryptu (przy udziale równorzędnego pierwszego autora), redagowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu (wraz z autorami korespondencyjnymi i pozostałymi współautorami).

H7. Strybel U, Marczak L, Zeman M, Polanski K, Mielańczyk Ł, Klymenko O, Samelak-Czajka A, Jackowiak P, Smolarz M, Chekan M, Zembala-Nożyńska E, Widlak P, Pietrowska M, Wojakowska A^{*}. Molecular composition of serum exosomes could discriminate rectal cancer patients with different responses to neoadjuvant radiotherapy. *Cancers*. **2022**;14(4):99.

DOI: 10.3390/cancers14040993

IF₂₀₂₀=6.639; MNiSW₂₀₂₁=140; C=0

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy, zaplanowaniu i bezpośrednim nadzorowaniu wszystkich eksperymentów, wyborze metodyki badawczej, analizie i interpretacji uzyskanych danych, napisaniu w całości pierwszej wersji manuskryptu, redagowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu (przy udziale pozostałych współautorów).

Nazwisko habilitantki jest wytłuszczone; * autor korespondencyjny; # autorzy, którzy w równym stopniu przyczynili się do powstania pracy.

Tabela 1. Dane naukometryczne dotyczące publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego oraz wszystkich publikacji habilitantki wg. bazy *Web of Science Core Collection*, z dnia 22.04.2022.

Łącznie	Cykl 7 publikacji	Wszystkie publikacje z IF (38)
IF	25.281	119.599
MNiSW	350	1794
MNiSW ₂₀₂₁	650	3430
Liczba cytowań (bez autocytowań)	138 (135)	846 (821)
H-index	(6)	17

IF: sumaryczny Impact Factor z roku poprzedzającego ukazanie się publikacji;

MNiSW: łączna liczba punktów MNiSW z roku poprzedzającego ukazanie się publikacji;

MNiSW₂₀₂₁: łączna liczba punktów MNiSW zgodnie z najnowszą listą opublikowaną 01.12.2021.

Wszystkie prace wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego są efektem realizacji grantów własnych.

Oświadczenia potwierdzające wkład habilitantki w powstanie prac zamieszczono w załączniku nr 7. Kopie powyższych publikacji zamieszczono w załączniku nr 8.

4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego.

4.3.1. Wprowadzenie

Choroby nowotworowe stanowią drugą po chorobach układu sercowo-naczyniowego przyczynę zgonów w krajach wysokorozwiniętych. Wczesna diagnoza oraz właściwa klasyfikacja nowotworu stanowią kluczowy czynnik, umożliwiający dobór odpowiedniej metody leczenia. Niepowodzenia w leczeniu nowotworów są przede wszystkim wynikiem rozsiewu choroby i przerzutów do innych tkanek i narządów. Pomimo postępu jaki dokonał się w diagnostyce onkologicznej, nie zawsze istnieje możliwość prognozowania przebiegu choroby, a co za tym idzie podjęcia właściwego leczenia. Z tego też względu obecnie coraz większą rolę zaczynają spełniać molekularne czynniki rokownicze, jako suplement prognostyczny wypełniający lukę pozostawioną przez nieprecyzyjne rokowniczo czynniki kliniczne. Rzetelna identyfikacja molekularnych czynników prognostycznych pozwoliłaby na wyodrębnienie grupy chorych wymagających bardziej agresywnego leczenia, poprawiając tym samym współczynnik przeżywalności. W klasycznym podejściu głównymi czynnikami prognostycznymi są parametry kliniczne ustalone na podstawie analizy histopatologicznej. Zalicza się do nich klasyfikację wg TNM (w tym głębokość nacieku, inwazję do naczyń krwionośnych i limfatycznych, zajęcie węzłów chłonnych, stopień zróżnicowania guza) [1]. Niestety, określenie stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu nie zawsze umożliwia w sposób jednoznaczny prognozowanie przebiegu choroby oraz ocenę ryzyka wznowy i/lub przerzutów. Trudność ta wynika ze znacznej heterogenności biologicznej nowotworów. Konieczne jest zatem pełniejsze zrozumienie procesów odpowiedzialnych za ich rozsiew oraz opracowanie wiarygodnych wskaźników molekularnych ich inwazyjności i progresji, pomocnych dla opracowania nowych schematów diagnostycznych i terapeutycznych.

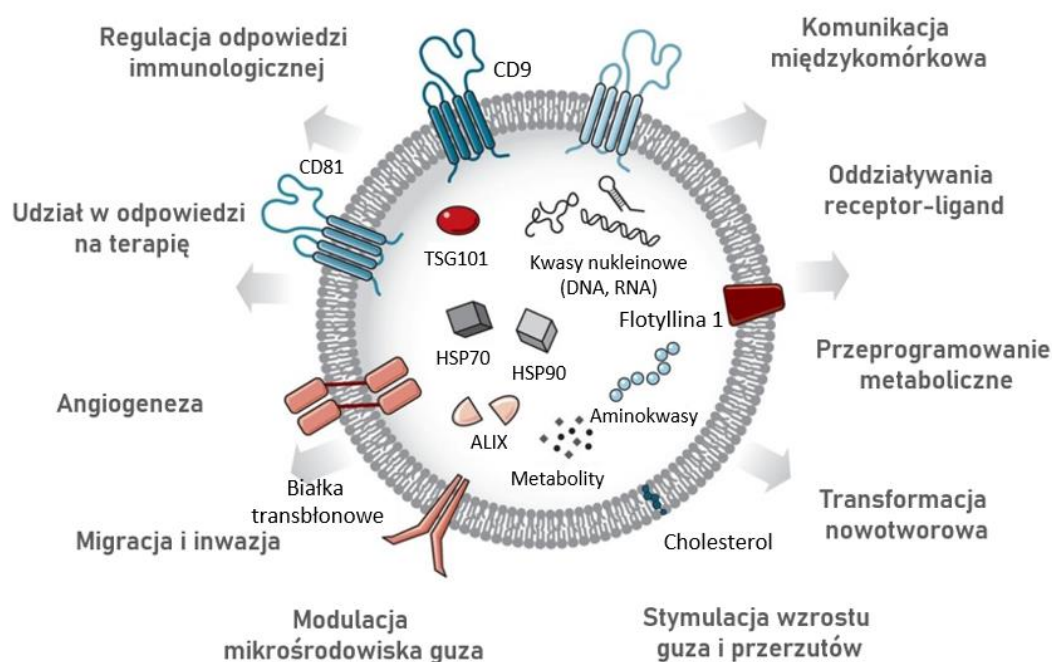
Molekularne znaczniki (biomarkery) prognostyczne i predykcyjne to cząsteczki w bezpośredni lub pośredni sposób związane z procesami nowotworzenia zachodzącymi na poziomie komórki, tkanki i całego organizmu, obejmującymi m.in. mutacje, ruchliwość i migrację komórek, proliferację i angiogenezę. Do potencjalnych biomarkerów stanów nowotworowych należą przede wszystkim geny ulegające zmienionej ekspresji oraz białka, a także metabolity i lipidy [2]. W poszukiwaniu znaczników molekularnych progresji nowotworu stosowane są dwa podejścia: znalezienie nowej kombinacji znanych markerów nowotworowych (tzw. sygnatury molekularnej) lub odkrycie nowych czynników molekularnych użytecznych w diagnostyce, klasyfikacji, prognozowaniu oraz monitorowaniu progresji nowotworu i jego odpowiedzi na terapię.

Poszukiwania potencjalnych biomarkerów nowotworowych prowadzone były do niedawna głównie z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych, oraz w oparciu o analizy ekspresji genów. Obecnie, w związku z dalszym poszukiwaniem nowych sygnatur molekularnych specyficznych dla nowotworów, coraz powszechniej prowadzone są badania z wykorzystaniem wysokoprzepustowych, nowoczesnych **narzędzi multi-omicznych**. Narzędzia te opierają się

m.in. na technikach sekwencjonowania nowej generacji, technikach spektrometrii mas, oraz wysokoprzepustowych testach z wykorzystaniem przeciwciał, w połączeniu z zaawansowanymi metodami obliczeniowymi i metodami przetwarzania danych (modelowanie komputerowe, uczenie maszynowe, sztuczna inteligencja). Podejście proteomiczne i metabolomiczne w sposób znaczący poszerza zakres identyfikacji czynników molekularnych oraz pozwala, wraz z osiągnięciami z dziedziny genomiki i transkryptomiki, spojrzeć na problem markerów stanów nowotworowych w sposób holistyczny, zgodny z koncepcją biologii systemów. Białka i metabolity (w tym lipidy) stanowią finalny produkt przemian biochemicznych, dlatego w najbardziej miarodajny sposób odzwierciedlają procesy zachodzące w komórce, tkance czy całym organizmie. To właśnie metabolomika i proteomika, które są jednymi z najszybciej rozwijających się gałęzi z rodziny „omik”, są szeroko wykorzystywane w badaniach zorientowanych na nowotwory. Na szczególną uwagę zasługuje najsłabiej poznana metabolomika, która w najbliższy sposób ukazuje fenotyp nowotworowy. Procesy związane z nowotworzeniem w znaczący sposób wpływają na przebieg podstawowych szlaków metabolicznych, stąd komórki nowotworowe charakteryzują się zmienionym metabolizmem w porównaniu z normalnie zróżnicowanymi komórkami. Główna różnica między komórkami nowotworowymi a normalnymi dotyczy szlaków związanych z produkcją energii. Jednak, badania prowadzone w ostatniej dekadzie pozwoliły na wskazanie szerokiej grupy związków niskocząsteczkowych ulegających zmianom w szlakach metabolicznych związanych z rozwojem nowotworów. Należą do nich między innymi kwasy organiczne, aminokwasy, cukry, zasady azotowe, oraz inne związki niskocząsteczkowe będące produktami pośrednimi metabolizmu aminokwasów, puryn i pirymidyn, glikolizy, glukoneogenezy oraz cyklu kwasu cytrynowego [3]. Szczególną grupę związków w kontekście chorób nowotworowych stanowią lipidy, które odgrywają istotną rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak metabolizm energetyczny, sygnalizacja komórkowa, proliferacja, apoptoza i różnicowanie. Udowodniono, że zaburzenia metabolizmu i funkcji lipidów przyczyniają się do rozwoju choroby nowotworowej i mogą być wykorzystane do oceny rokowania [4].

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie badaczy wzbudza możliwość wykorzystania **egzosomów** jako źródła biomarkerów nowotworowych. Egzosomy stanowią grupę małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia endosomalnego o średnicy 30-150 nm. Te nanopęcherzyki uwalniane są przez niemal każdy rodzaj komórek zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych, dzięki czemu można je wykrywać w większości płynów ustrojowych. Wzbogacone są w wiele klas cząsteczek bioaktywnych, w tym w kwasy nukleinowe, białka, lipidy i metabolity, które odzwierciedlają fenotyp komórki rodzicielskiej. Odgrywają zasadniczą rolę w biologii nowotworów, będąc kluczowymi mediatorami komunikacji między komórkami [5]. Schematyczną budowę egzosomów oraz rolę jaką pełnią w przebiegu procesów nowotworowych przedstawiono na **Rycinie 1**. Egzosomy wydzielane do krwi przez komórki nowotworowe i inne komórki obecne w mikrośrodowisku guza, pełnią rolę mediatorów w procesach związanych m.in. z angiogenezą, modulacją odpowiedzi immunologicznej, przeprogramowaniem metabolicznym, przerzutowaniem oraz odpowiedzią na terapię. Z tego względu krążące we krwi pacjentów egzosomy stanowią nowe źródło biomarkerów

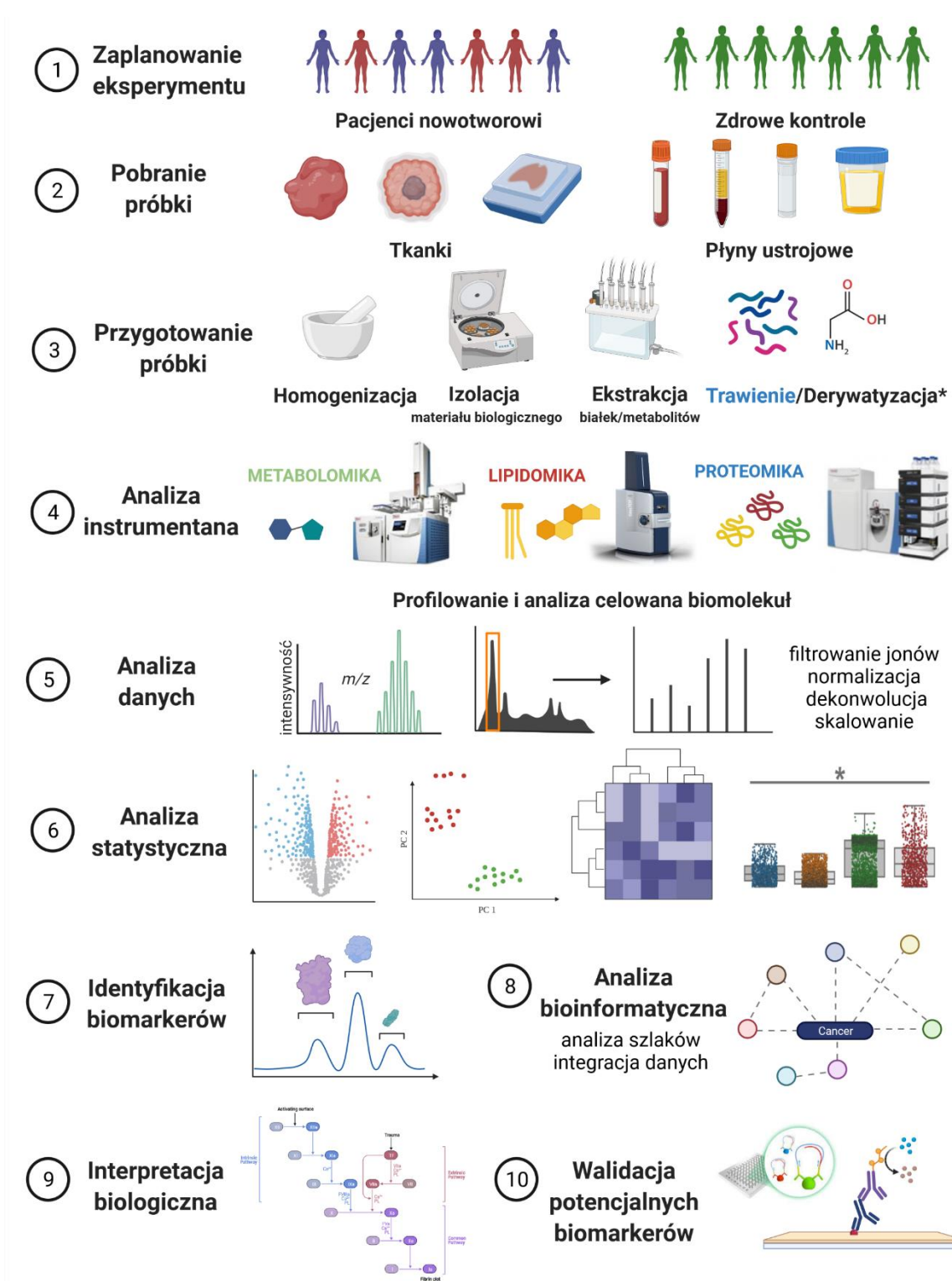
nowotworowych w płynnej biopsji [6].



Rycina 1. Schemat budowy egzosomów wraz z rolą jaką pełnią w procesach związanych nowotworzeniem (na podstawie Kalluri i LeBleu [5]).

Poszukiwanie molekularnych znaczników nowotworowych w oparciu o analizę egzosomów w podejściu proteomicznym i metabolomicznym z wykorzystaniem nowoczesnych **technik spektrometrii mas** stanowi niewątpliwie przyszłość holistycznych badań klinicznych. Do najczęściej wykorzystywanych układów w tego rodzaju badaniach należą układy chromatografii cieczowej i gazowej sprzężone z tandemowymi spektrometrami mas. Kompleksowa analiza składników molekularnych związanych z chorobą nowotworową, począwszy od związków niskocząsteczkowych takich jak metabolity, a skończywszy na białkowych makromolekułach, daje możliwość określenia zaburzeń szlaków sygnałowych i metabolicznych, będących zarówno podłożem jak i skutkiem procesu nowotworzenia. Takie podejście pozwala nie tylko na systemową ocenę procesów molekularnych zachodzących w złożonych układach biologicznych, lecz również umożliwia identyfikację potencjalnych celów diagnostycznych i terapeutycznych [7]. Jednak z uwagi na fakt, że techniki te podlegają ciągłemu udoskonalaniu, zarówno w aspekcie technologicznych rozwiązań analitycznych jak i zaawansowanych narzędzi obliczeniowych, badania z wykorzystaniem podejść omicznych stanowią znaczne wyzwanie badawcze. Badania uwzględniające podejście multi-omiczne są zazwyczaj projektami interdyscyplinarnymi z pogranicza chemii, biologii, medycyny i bioinformatyki, wymagającymi świadomej współpracy pomiędzy badaczami a klinicystami. Istotnym warunkiem powodzenia projektów nakierowanych na poszukiwanie znaczników molekularnych nowotworów z wykorzystaniem podejść proteomicznych i metabolomicznych, jest właściwe zaplanowanie eksperymentu badawczego oraz ścisłe przestrzeganie procedur analitycznych na każdym etapie badań. Najważniejsze etapy projektów badawczych z zakresu proteomiki i metabolomiki klinicznej przedstawiono na **Rycinie 2**. Etapy te obejmują: (1) właściwe zaplanowanie eksperymentu, (2) zebranie i zabezpieczenie materiału klinicznego oraz zebranie pełnej charakterystyki parametrów klinicznych, (3) przygotowanie próby i dobór

odpowiedniej metody izolacji badanych związków, (4) analizę instrumentalną z wykorzystaniem technik chromatografii i spektrometrii mas – profilowanie i analiza celowana, (5) wstępną analizę uzyskanych danych, w tym m.in. filtrowanie jonów, normalizacja, dekonwolucja, skalowanie, (6) analizę statystyczną, (7) identyfikację potencjalnych biomarkerów, (8) analizę bioinformatyczną i chemometryczną, (9) interpretację biologiczną, (10) walidację potencjalnych biomarkerów.



Rycina 2. Schematyczne ujęcie poszczególnych etapów badań dotyczących kompleksowej analizy składników molekularnych związanych z chorobą nowotworową z wykorzystaniem nowoczesnych podejść proteomiki i metabolomiki klinicznej. * w zależności od wybranego podejścia

4.3.2. Motywacja i cel badań

Prezentowane przeze mnie osiągnięcie naukowe stanowi cykl siedmiu publikacji, w skład którego wchodzi 6 prac eksperymentalnych i 1 praca przeglądowa. Wszystkie prace powstały w wyniku realizacji grantów własnych. W 6 pracach pełnię rolę pierwszego autora, natomiast w 1 jestem autorem korespondencyjnym. Wszystkie publikacje ukazały się w czasopiśmie ujętych w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) równym 25.281 i liczbie cytowań wynoszącej 135 (wg. bazy *Web of Science Core Collection*, z dnia 22.04.2022). Przedstawione prace stanowią cykl dotyczący identyfikacji metabolomicznych i proteomicznych składników molekularnych związanych z chorobą nowotworową z wykorzystaniem technik spektrometrii mas.

Publikacje **H1-H5** powstały w wyniku realizacji własnego grantu badawczego NCN FUGA dotyczącego wykorzystania technik spektrometrii mas do profilowania i identyfikacji proteomicznych i metabolomicznych składników guza swoistych dla poszczególnych typów raka tarczycy (<https://ncn.gov.pl/finansowanie-nauki/przyklady-projektow/wojakowska>). Badania realizowałam w ramach krajowego stażu podoktorskiego, który odbyłam w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, kierowanym przez prof. dr hab. Piotra Widłaka, w Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie oddział w Gliwicach (obecnie Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, NIO). Zdecydowaną większość eksperymentów badawczych prowadziłam w Laboratorium Proteomiki i Spektrometrii Mas pod opieką merytoryczną dr hab. Moniki Pietrowskiej, która jednocześnie pełniła funkcję opiekuna mojego stażu podoktorskiego. Zasadniczym przedmiotem moich badań było wykorzystanie technik spektrometrii mas, w tym LC-MS/MS, GC-MS i MALDI-MSI do profilowania i identyfikacji składników proteomu, lipidomu i metabolomu, swoistych dla poszczególnych typów histologicznych raka tarczycy oraz korelacja uzyskanych danych z parametrami klinicznymi (morfologicznymi i histopatologicznymi). Dużym wyzwaniem podczas realizacji projektu było opracowanie i zoptymalizowanie metodyki prowadzenia badań proteomicznych i metabolomicznych na archiwalnym materiale tkankowym, który stanowiły preparaty raka tarczycy utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (FFPE, *formalin-fixed paraffin-embedded*). Szczególny nacisk w trakcie odbytego stażu położyłam na badaniach z zakresu metabolomiki nowotworu tarczycy, który zaowocował powstaniem pracy metodycznej **H1**, dotyczącej opracowania oryginalnej metodyki wydajnej izolacji metabolitów z preparatów tkankowych raka tarczycy FFPE na potrzeby analiz z wykorzystaniem techniki GC-MS. Opracowane podejście metodyczne, dotąd nieprezentowane w literaturze naukowej, wykorzystywałam do przeprowadzenia właściwych eksperymentów profilowania i identyfikacji metabolitów swoistych dla poszczególnych typów histologicznych raka tarczycy w tkance FFPE, przy wykorzystaniu techniki GC-MS. Wyniki tych badań opublikowane zostały w pracy **H2**. W tym samym czasie powstała również praca przeglądowa **H3**, dotycząca wykorzystania podejścia metabolomicznego w badaniach nad nowotworami tarczycy, która w szczególności sposób prezentuje stosowane w tego rodzaju badaniach metody i techniki, a także podsumowuje dotychczasową wiedzę z zakresu metabolizmu nowotworów tarczycy. W trakcie pobytu na stażu podoktorskim w NIO uzyskałam grant badawczy z międzynarodowego programu STSM COST na realizację krótkoterminowego zadania badawczego dotyczącego prowadzenia badań lipidomicznych na tkankowych preparatach raka tarczycy. Miałam możliwość odbycia miesięcznego stażu w Laboratorium Spektrometrii Mas *Biomedical Research Centre Sheffield*

Hallam University w Anglii, w trakcie którego prowadziłam optymalizacyjne i właściwe badania lipidomiczne preparatów tkankowych raka tarczycy utrwalonych w formalinie, wysokorozdzielczą techniką obrazowania molekularnego MALDI-MSI. Wynikiem tego krótkotrwałego projektu była publikacja **H4**, dotycząca odróżnienia tkanki raka tarczycy od tkanki nienowotworowej, w oparciu o profilowanie lipidów metodą obrazowania molekularnego. Ostatnią pracą zamykającą cykl publikacji dotyczących profilowania molekularnego nowotworów tarczycy jest pozycja **H5**, dotycząca profilowania białek techniką LC-MS/MS. Praca opisuje wykorzystanie podejścia proteomicznego opartego o metodę MED FASP (Wiśniewski i in., 2013) do analizy białek izolowanych z preparatów tkanek FFPE. Przeprowadzone badania były pierwszym kompletnym opisem proteomu raka tarczycy i umożliwiły identyfikację profilu białek swoistych dla poszczególnych typów tego nowotworu. Publikacja odwołuje się do wcześniej uzyskanych przeze mnie danych z zakresu metabolomiki tarczycy i podejmuje próbę ich korelacji, w celu uzyskania globalnego obrazu zmian molekularnych zachodzących w nowotworowo zmienionej tkance tarczycy.

Pod koniec realizacji grantu FUGA otrzymałam kolejny grant badawczy NCN SONATA, którego głównym celem było scharakteryzowanie czynników molekularnych (białek, lipidów, metabolitów) związanych z progresją raka jelita grubego, w kontekście udziału egzosomów modulujących proces progresji i przerzutowania. Badania w ramach nowego projektu realizowałam w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki w Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. W wyniku realizacji tego (nadal trwającego) projektu powstały prace **H6** i **H7**, w których z sukcesem połączyłam wiedzę i doświadczenie z zakresu biologii nowotworów i udziału egzosomów w procesie nowotworzenia, zdobyte podczas realizacji stażu podoktorskiego w NIO, z wykorzystaniem nowoczesnych technik spektrometrii mas i wielkoskalowych metod obliczeniowych, które w dalszym ciągu rozwijam. Niewątpliwym wyzwaniem w trakcie realizacji projektu było wdrożenie i optymalizacja metody izolacji i oceny egzosomów izolowanych z surowicy krwi pacjentów nowotworowych, na potrzeby prowadzenia kompleksowych analiz proteomicznych i metabolomicznych z wykorzystaniem technik MS. Kolejny raz obiektem mojego zainteresowania była metabolomika, której warsztat w kontekście badania biologii egzosomów jest nadal stosunkowo słabo ustalony. W wyniku zapoczątkowanych prac optymalizacyjnych pod kątem metodyki prowadzenia analiz metabolomicznych egzosomów izolowanych z surowicy z wykorzystaniem techniki GC-MS, powstała publikacja **H6**, dotycząca porównania profili metabolomicznych surowicy i egzosomów izolowanych z surowicy w kontekście różnic między pacjentami z rakiem regionu głowy i szyi (RGiSz) a osobami zdrowymi, a także odpowiedzi pacjentów na radioterapię. W dalszej kolejności zostały przeprowadzone właściwe eksperymenty profilowania i identyfikacji białek i metabolitów w osoczu i egzosomach izolowanych z surowicy chorych na raka odbytnicy, różniących się odpowiedzią na neoadjuwantową radioterapię. Integracja proteomicznych i metabolomicznych profili egzosomów zaprezentowana w pracy **H7**, dała możliwość identyfikacji szlaków sygnałowych i metabolicznych związanych z różną odpowiedzią na neoadjuwantową radioterapię u pacjentów chorych na raka odbytnicy. Praca zamykająca cykl prezentuje szeroki zakres nowoczesnych podejść i technik analitycznych z zakresu biochemii, biologii molekularnej, biologii obliczeniowej, bioinformatyki i biomedycyny, co nadaje jej charakter interdyscyplinarny.

Zasadniczym celem prowadzonych przeze mnie badań była **identyfikacja składników metabolomu i proteomu swoistych dla badanych nowotworów przy wykorzystaniu technik spektrometrii mas.**

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Opracowanie i optymalizację warsztatu analitycznego umożliwiającego prowadzenie badań metabolomicznych i proteomicznych na klinicznych preparatach tkanek nowotworowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) technikami GC-MS i LC-MS/MS.
2. Profilowanie i identyfikację metabolitów i białek obecnych w tkankach FFPE **raków tarczycy** różniących się typem histologicznym (PTC, FTC, MTC, ATC) w odniesieniu do łagodnych zmian nowotworowych (FA) oraz zdrowej tkanki.
3. Profilowanie lipidów metodą MALDI-MSI na preparatach tkankowych w celu odróżnienia brodawkowatego raka tarczycy od sąsiadującej z nim tkanki nienowotworowej.
4. Skorelowanie obrazu molekularnego z parametrami morfologicznymi i histopatologicznymi badanych tkanek raka tarczycy.
5. Opracowanie i optymalizację metodyki prowadzenia kompleksowych analiz proteomicznych i metabolomicznych egzosomów izolowanych z surowicy krwi z wykorzystaniem technik GC-MS i LC-MS/MS.
6. Profilowanie metabolitów surowicy i egzosomów izolowanych z surowicy pacjentów z rozpoznaniem **raka regionu głowy i szyi (RGiSz)** leczonych samodzielną radioterapią.
7. Identyfikację proteomicznych i metabolomicznych składników egzosomów izolowanych z surowicy chorych na **raka odbytnicy** różniących się odpowiedzią na neoadjuwantową radioterapię.
8. Integrację wyników badań prowadzonych na poziomie proteomu i metabolomu egzosomów izolowanych od pacjentów z rakiem odbytnicy różniących się odpowiedzią na leczenie, w celu identyfikacji szlaków sygnałowych i metabolicznych związanych z różną odpowiedzią na neoadjuwantową radioterapię.

4.3.3. Omówienie osiągniętych wyników

Opracowanie procedur analitycznych wykorzystujących preparaty FFPE do badań metabolomicznych i proteomicznych (H1, H5)

Utrwalanie tkanek w formalinie, a następnie zatopianie w parafinie jest standardową procedurą stabilizacji i konserwacji próbek tkanek, powszechnie stosowaną w praktyce klinicznej. Proces utrwalania umożliwia przechowywanie materiału klinicznego w temperaturze pokojowej przez długi czas, natomiast zatopianie w parafinie ułatwia przygotowanie tkanki do oceny histopatologicznej. Z powyższych względów tkankowe próbki FFPE stanowią cenne źródło materiału klinicznego do analizy retrospektywnej, w tym badań molekularnych. Pomimo, że świeżo mrożone preparaty tkankowe nadal stanowią złoty standard w przypadku analiz multiomicznych, ich ograniczona dostępność, trudność w pozyskaniu odpowiedniego, dobrze sklasyfikowanego i zabezpieczonego materiału oraz wysokie koszty i problemy logistyczne podczas jego przechowywania, stanowią poważną wadę tego typu próbek klinicznych. W związku z tym, archiwalne próbki tkanek FFPE mogą być dobrą alternatywą dla świeżo mrożonej tkanki [8]. Należy jednak mieć na uwadze, że proces utrwalania w formalinie prowadzi do sieciowania

białek oraz innych cząsteczek obecnych w tkance, co wynika z oddziaływań formaldehydu z bocznymi łańcuchami aminokwasów (m.in. Lys, Arg, Tyr, Asn, Gln), prowadząc do zmniejszenia immunoreaktywności białek w testach immunohistochemicznych [9]. Drugim ograniczeniem w badaniach molekularnych jest konieczność usunięcia z preparatu parafiny, bez uszkodzenia lub utraty badanych cząsteczek biochemicznych. Z tych powodów ekstrakcja biocząsteczek z materiału tkankowego FFPE do badań proteomicznych i metabolomicznych, w szczególności opartych o techniki spektrometrii mas, stanowi metodologiczne wyzwanie.

Dostępnych jest kilka prac opisujących wykorzystanie tkanek FFPE do retrospektywnych badań proteomicznych, gdzie zaproponowane zostały różnorodne metody ekstrakcji białek z materiału archiwalnego. Proponowane procedury analityczne pozwalają na identyfikację w preparatach FFPE od 40 do 90 % białek obecnych w preparatach świeżo mrożonej tkanki [10]. Do badań proteomicznych przedstawionych poniżej w publikacji **H5** wykorzystałam zmodyfikowaną metodę ekstrakcji białek według Geoui i wsp. [11], uwzględniając odparafinowanie tkanki za pomocą n-heptanu i lizę w buforze TLB, oraz wdrożoną nowatorską technikę izolacji składników proteomu MED-FASP (*multi-enzyme digestion filter-aided sample preparation*), opracowaną przez dr Jacka Wiśniewskiego z Instytutu Maxa Plancka (*Max-Planck-Institute for Biochemistry*, Martinsried, Niemcy) [12-13]. Metoda wieloenzymatycznego trawienia wspomaganego filtracją (MED-FASP) zakłada trawienie białek dwoma enzymami Lys-C i trypsyną (Trp), dzięki czemu możemy uzyskać zwiększoną wydajność trawienia. Otrzymane peptydy są następnie frakcjonowane na złożu zawierającym silny wymiennicz anionowy (SAX – *strong anion exchanger*) na sześć frakcji (przy różnym pH) i analizowane techniką LC-MS/MS z wykorzystaniem wysokorozdzielczego spektrometru Q-Exactive z analizatorem typu Orbitrap.

Podczas gdy liczba publikacji dotyczących wykorzystania tkanki FFPE w badaniach proteomicznych stale rosła, znaleźć można jedynie kilka prac dotyczących analizy metabolitów z materiału archiwalnego. Pierwsze badania prowadzone przez Kelly i wsp. [14] dotyczyły celowanej analizy polarnych metabolitów tkanek FFPE mięsaka za pomocą techniki LC-MS. Autorzy byli w stanie odróżnić tkankę nowotworową od tkanki nienowotworowej na podstawie 106 wykrytych metabolitów. Z czasem ukazały się kolejne prace potwierdzające możliwość wykorzystania preparatów FFPE do analiz związków niskocząsteczkowych [15-17]. Brakowało jednak doniesień dotyczących wykorzystania technik GC-MS do profilowania metabolitów z materiału archiwalnego. Z tego względu podjęłam się opracowania metody ekstrakcji związków niskocząsteczkowych z tkanki FFPE do analiz w układzie GC-MS. W pracy **H1** przedstawiłam metodę izolacji pierwotnych metabolitów z tkanki FFPE, zakładającą odparafinowanie tkanki w ksylenie, a następnie dwuetapową ekstrakcję związków w mieszaninie wody z metanolem (w stosunku 1:1) oraz chlorku metylenu z metanolem (w stosunku 3:1). Protokół ekstrakcji został przeze mnie opracowany w oparciu o metodę izolacji metabolitów ze świeżej tkanki zaproponowaną przez Denkerta i wsp. z grupy Olivera Fiehna (Davis University, USA) [18]. Badania porównawcze prowadziłam na trzech typach preparatów tkanek mysiej nerki: (1) świeżo mrożonej, (2) utrwalonej w formalinie oraz (3) FFPE. Zaproponowane podejście umożliwiło mi identyfikację blisko 80 metabolitów (w tym aminokwasów, cukrów, kwasów karboksylowych, kwasów tłuszczowych i ich estrów, steroli, cukroli i innych), z czego 75% było obecnych we wszystkich typach badanej tkanki. Najliczniejszą grupą spośród wszystkich zidentyfikowanych klas związków, obecnych w każdym z typów analizowanej tkanki, były kwasy tłuszczowe i ich estry. Podwyższone poziomy związków lipidowych w tkance FFPE sugerują, że identyfikowane metabolity są odporną na działanie rozpuszczalników organicznych częścią białko-lipidowych

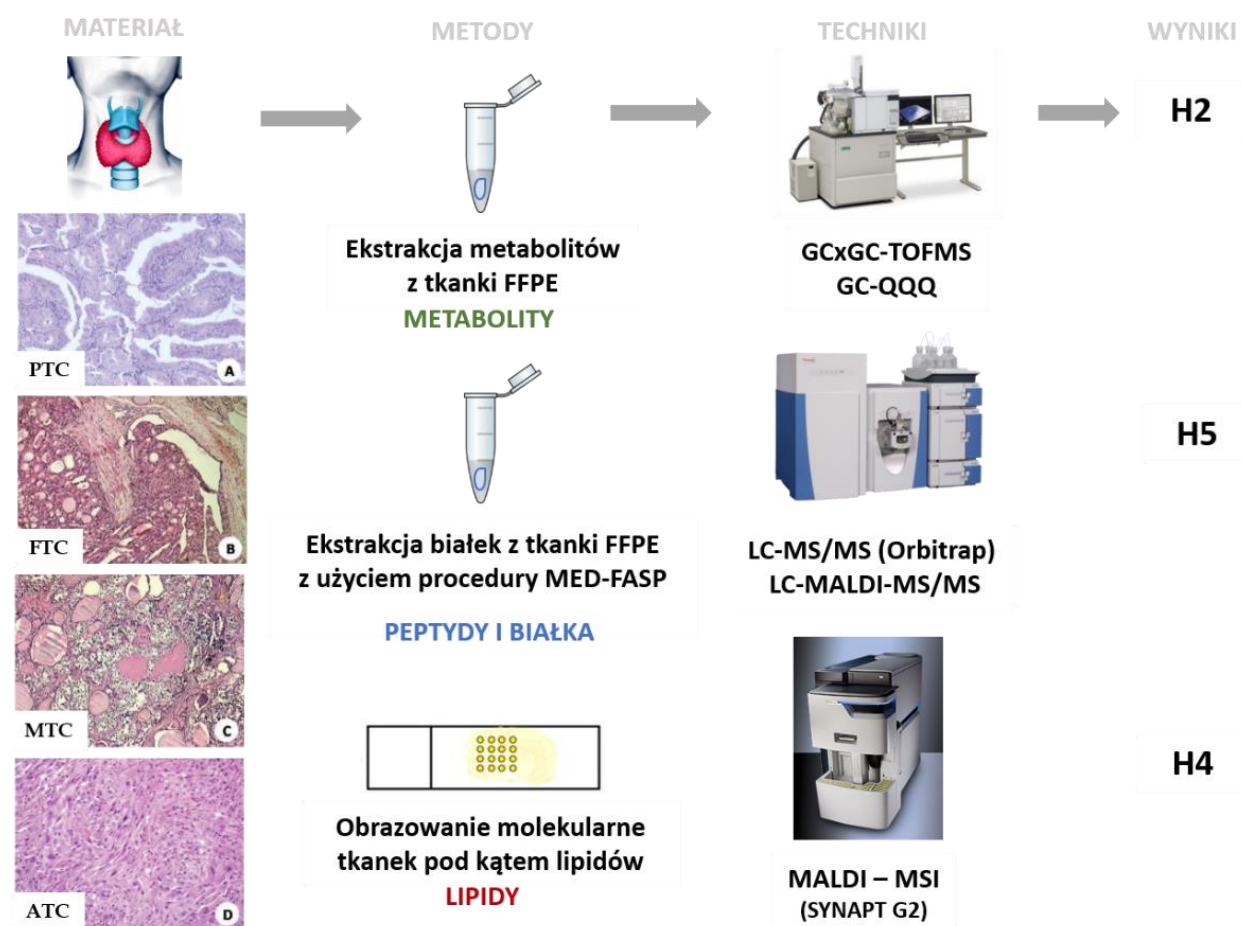
kompleksów błonowych. Ponadto zaobserwowałam, że zarówno sam proces utrwalania tkanki w formalinie jak i czas utrwalania, nie wykazują istotnego wpływu na skład identyfikowanych metabolitów. Z kolei zatapianie utrwalonej tkanki w parafinie wpływa na wydajność ekstrakcji, skutkując obniżeniem względnej ilości identyfikowanych związków. Niemniej jednak, udowodniłam możliwość wykorzystania próbek tkanek FFPE do niecelowanej analizy profilu metabolitów w oparciu o technikę GC-MS, co ma istotne znaczenie we właściwych eksperymentach analizy związków niskocząsteczkowych prowadzonych z wykorzystaniem retrospektywnego materiału klinicznego.

Wykorzystanie technik metabolomicznych i proteomicznych do profilowania i identyfikacji składników molekularnych guza swoistych dla poszczególnych typów histologicznych raka tarczycy (H2-H5)

Rak tarczycy jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym gruczołów wydzielania wewnętrznego. Pomimo iż stanowi zaledwie 1% spośród wszystkich diagnozowanych przypadków guzów tarczycy, zachorowalność na ten typ nowotworu stale wzrasta. Wyróżnia się cztery główne typy raków gruczołu tarczycowego: brodawkowy (PTC), pęcherzykowy (FTC), rdzeniasty (MTC) i anaplastyczny (ATC) [19]. Najczęstszą i zarazem najłagodniejszą postacią raka tarczycy jest rak brodawkowy, który stanowi około 70% wszystkich nowotworów złośliwych tarczycy. Jego diagnoza opiera się na charakterystycznych cechach jądra. Niektóre guzy zaliczane do pęcherzykowej odmiany raka brodawkowego (PTC-FV) mają pewne cechy wspólne z rakiem pęcherzykowym. Rak pęcherzykowy jest drugim najczęściej występującym nowotworem złośliwym tarczycy i stanowi około 15% wszystkich przypadków raka tego gruczołu. Charakteryzuje się powolnym wzrostem a jego diagnoza opiera się na cechach makro- i mikroskopowych. Istnieje wiele wariantów FTC, które mają pewne cechy wspólne z innymi pęcherzykowymi zmianami tarczycy, stąd diagnostyka i klasyfikacja tych nowotworów jest jedną z najbardziej wymagających i budzących najwięcej kontrowersyjnych kwestii w patologii tarczycy. Jednym z kluczowych zagadnień w diagnostyce raka tarczycy jest rozróżnienie pomiędzy łagodnym gruczolakiem pęcherzykowym (FA), rakiem pęcherzykowym (FTC) i wariantem pęcherzykowym raka brodawkowego (PTC-FV). Rak rdzeniasty (MTC) pod względem złośliwości i przebiegu klinicznego zajmuje miejsce pomiędzy rakami zróżnicowanymi (PTC i FTC) a rakiem niskozróżnicowanym (ATC). MTC stanowi zaledwie 3-5% raków tarczycy, w przeciwieństwie do innych raków tarczycy wywodzących się z komórek nabłonka, wywodzi się z okołopęcherzykowych komórek C, produkujących kalcytoninę i wykazuje cechy neuroendokrynne. Niezróżnicowany ATC, stanowiący zaledwie 1-2% raków tarczycy, charakteryzuje się szybką dynamiką wzrostu oraz wysokim stopniem złośliwości [20]. Właściwe określenie typu raka tarczycy stanowi kluczowy czynnik dla oceny rokowania i doboru odpowiedniej strategii prowadzonej terapii onkologicznej, co w znacznym stopniu przekłada się na poprawę współczynnika przeżywalności chorych. Obecnie przedoperacyjne różnicowanie guzów tarczycy opiera się głównie na obrazie morfologicznym biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, a pooperacyjne na wynikach badania histopatologicznego. Niestety, w wielu przypadkach jednoznaczna klasyfikacja raka na podstawie analizy histopatologicznej nie jest możliwa, co stwarza poważne problemy przy podejmowaniu właściwych decyzji terapeutycznych. Istnieje zatem konieczność poszukiwania wiarygodnych markerów molekularnych wspomagających klasyczne metody klasyfikacji raka tarczycy. Identyfikacja takiego markera (markerów) mogłaby

ograniczyć do minimum ilość niepotrzebnie przeprowadzanych operacji usunięcia tarczycy i stanowić kolejny, po odkryciu biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, postęp w diagnostyce guzów tarczycy.

Po zakończeniu prac optymalizacyjnych dotyczących warsztatu prowadzenia analiz metabolomicznych i proteomicznych na tkankowych preparatach FFPE (część metodyczna prac **H1** i **H5**), przeszłam do przeprowadzenia właściwych eksperymentów na puli próbek klinicznych różnych typów histologicznych raka tarczycy (PTC, FTC, MTC, ATC) z wykorzystaniem różnorodnych technik spektrometrii mas. Zasadniczym celem moich badań było poszukiwanie sygnatury molekularnej, umożliwiającej rozróżnienie pomiędzy poszczególnymi typami raka tarczycy oraz w szczególności odróżnienie pęcherzykowych zmian łagodnych (FA) od złośliwych postaci nowotworu (PTC-FV, FTC). Eksperymenty metabolomiczne, proteomiczne i lipidomiczne prowadzone były z wykorzystaniem najnowocześniejszych technik spektrometrii mas, w oparciu o odpowiednio metody GC-MS, LC-MS/MS oraz obrazowanie molekularne MALDI-TOF. Uzyskane obrazy molekularne badanych tkanek tarczycy zostały skorelowane z ich parametrami morfologicznymi i immunohistopatologicznymi. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w pracach **H2**, **H4** i **H5**. Schemat prowadzonych badań został poglądowo przedstawiony na **Rycinie 3**.



Rycina 3. Schemat podejść badawczych zastosowanych przy poszukiwaniu molekularnych znaczników różnych typów histologicznych raka tarczycy

Przed przystąpieniem do właściwych badań dokonałam szerokiego przeglądu literatury w kontekście dotychczas poznanych molekularnych znaczników raka tarczycy, ze szczególnym uwzględnieniem problemów na jakie napotyka się w ich klinicznej diagnostyce oraz opisem technik i podejść omicznych wykorzystywanych do poszukiwania markerów molekularnych. Najslabiej dotychczas poznany zagadnieniem, a zarazem najbardziej mnie interesującym, było wykorzystanie metabolomiki w badaniach nad rakiem tarczycy. Aspekty tych badań zebrałam i opisałam w pracy przeglądowej **H3**, zwracając szczególną uwagę na charakterystyczne zmiany w metabolizmie komórki nowotworowej obejmujące m.in. efekt Warburga, zaburzenia metabolizmu aminokwasów, kwasów tłuszczowych czy lipidów. Miałam również możliwość z bliska poznać charakter pracy lekarza patologa oraz dylematy i niuanse przy diagnostyce histopatologicznej tkanek resekowanych guzów tarczycy. Przeszłam wstępne szkolenie z preparatyki i oceny tkanek tarczycy dzięki uprzejmości dr Mikołaja Chekana, specjalizującego się w ocenie histopatologicznej raków tarczycy, z którym do tej pory współpracuję przy okazji dalszych projektów badawczych.

Materiał do badań stanowiły preparaty FFPE raka tarczycy (rak brodawkowy (PTC) wariant klasyczny (CV) i wariant pęcherzykowy (FV), rak pęcherzykowy (FTC), rak rdzeniasty (MTC), rak anaplastyczny (ATC)) oraz łagodnego gruczolaka pęcherzykowego (FA) i niezmięnionej nowotworowo tkanki tarczycy stanowiącej kontrolę (Ctr). Preparaty zostały scharakteryzowane pod kątem procentowej zawartości komórek nowotworowych, do badań wykorzystane zostały preparaty, w których udział komórek nowotworowych stanowił więcej niż 90%. Do badań metabolomicznych wykorzystałam protokół uprzednio opracowany i opisany w pracy **H1**. W celu porównania wydajności zaproponowanej metody ekstrakcji, mrożone tkanki tarczycy analizowałam przy użyciu tej samej platformy analitycznej (w tym tej samej procedury ekstrakcji bez etapu odparafinowania), co wykazało, że około 90% metabolitów wykrytych w tkance mrożonej można było zidentyfikować również w materiale FFPE. Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, jako pierwsi zaprezentowaliśmy możliwość skutecznego profilowania metabolitów z archiwalnej tkanki FFPE w oparciu o technikę GC-MS, w celu identyfikacji sygnatur metabolitów odróżniających tkankę prawidłową i różne typy zmian nowotworowych tarczycy (publikacja **H2**). Zastosowane podejście umożliwiło identyfikację i względną ocenę ilościową 81 metabolitów obecnych we wszystkich typach badanych tkanek tarczycy, w tym m.in. aminokwasów, cukrów, kwasów karboksylowych, kwasów tłuszczowych i ich estrów. Zidentyfikowałam 28 metabolitów (głównie kwasów tłuszczowych, kwasów karboksylowych i cukrów), których poziomy wykazywały statystycznie istotną różnicę pomiędzy różnymi typami guzów tarczycy oraz tkanką nienowotworową. Zaproponowaliśmy kilka sygnatur metabolicznych, umożliwiających odróżnienie raka tarczycy od tkanki nienowotworowej (w tym podwyższony poziom kwasu mlekowego i obniżony poziom kwasów tłuszczowych i ich estrów). Podwyższony poziom fosforanu mio-inozytolu, kwasu bursztynowego, oraz niektórych kwasów tłuszczowych i ich estrów pozwolił na odróżnienie złośliwych nowotworów tarczycy od łagodnego gruczolaka pęcherzykowego. Ponadto, zidentyfikowano składniki metabolomu, które pozwoliły na rozróżnienie klasycznego wariantu raka brodawkowego i pęcherzykowych zmian tarczycy (obniżenie poziomu kwasu glukonowego i podwyższenie poziomu kwasu cytrynowego) oraz rozróżnienie raka pęcherzykowego od pęcherzykowego wariantu rak brodawkowy (podwyższony poziom estru kwasu dekanowego). Stąd wniosek, że zastosowane podejście profilowania metabolitów w próbkach FFPE tarczycy, w oparciu o technikę GC-MS, może być

potencjalnie wykorzystane jako pomocnicze narzędzie diagnostyczne wspierające klasyfikację raków tarczycy.

Przeprowadzone badania umożliwiły ponadto wskazanie nadreprezentowanych szlaków metabolicznych powiązanych z metabolitami różnicującymi badane typy tkanki tarczycy. Wykazaliśmy, że szlaki metaboliczne zaangażowane w kancerogenezę tarczycy obejmowały przede wszystkim procesy związane z produkcją energii, m.in. cykl kwasów trikarboksylowych (TCA), łańcuch transportu elektronów, szlak pentozofosforanowy (PPP), glikoliza, glukoneogeneza, metabolizm galaktozy i pirogronianu. Należy podkreślić, że poziom kwasu mlekowego był podwyższony we wszystkich nowotworowych zmianach tarczycy w odniesieniu do tkanki normalnej. Ten fenomen związany jest z charakterystycznym dla komórek nowotworowych efektem Warburga, który faworyzuje glikolizę nad cykl TCA oraz fosforylację oksydacyjną [21]. Poza przeprogramowanym metabolizmem energetycznym, inną charakterystyczną cechą komórek nowotworowych jest zmieniony metabolizm lipidów i kwasów tłuszczowych. W naszych badaniach wykazaliśmy, że zmieniony metabolizm kwasów tłuszczowych jest powiązany z metabolitami różnicującymi różne podtypy raka tarczycy oraz zmiany nienowotworowe. Wcześniejsze badania [22] wykazały, że zmiany w poziomach lipidów w komórkach nowotworowych związane są z procesami zapalnymi oraz proliferacyjnymi, co może mieć znaczącą wartość rokowniczą w diagnostyce i progresji nowotworów. Co istotne, nasze badania ujawniły kilka metabolitów (w tym kwas cytrynowy, bursztynowy i glukonowy, a także fosforan mio-inozytolu), które istotnie różnicowały zmiany pęcherzykowe tarczycy (gruczolaka pęcherzykowego, raka pęcherzykowego oraz wariant pęcherzykowy raka brodawkowatego) oraz klasyczny wariant raka brodawkowatego. Związki te związane były głównie z metabolizmem energetycznym (kwas cytrynowy i bursztynowy wchodzące w skład cyklu TCA oraz kwas glukonowy jako produkt pośredni szlaku pentozofosforanowego) oraz metabolizmem inozytolu, który odgrywa istotną rolę w szlakach sygnałowych związanych z apoptozą, proliferacją i progresją komórek nowotworowych [23]. Podsumowując, zidentyfikowane sygnatury, które pozwoliły na odróżnienie tkanki prawidłowej od nowotworowej, jak również łagodnych i złośliwych zmian tarczycy, oraz związane z nimi procesy metaboliczne odpowiadały ogólnym znanym cechom metabolizmu komórki nowotworowej. Szczegółowe procesy metaboliczne charakterystyczne dla zmienionych nowotworowo komórek, w tym komórek tarczycy, opisałam w pracy przeglądowej **H3**.

Chcąc uzyskać pełniejszy, systemowy obraz cech molekularnych oraz związanych z nimi procesów biologicznych, charakterystycznych dla poszczególnych typów raka tarczycy (FTC, PTC-CV, PTC-FV, MTC, ATC) oraz umożliwiających ich odróżnienie od zmian łagodnych (FA), podjęliśmy się przeprowadzenia globalnej kompleksowej analizy profili proteomicznych badanych tkanek FFPE przy wykorzystaniu podejścia typu shotgun LC-MS/MS (publikacja **H5**). Tego typu kompleksowe podejście do analizy profili białkowych nowotworów tarczycy nie było dotąd prezentowane w literaturze. Przeprowadziliśmy profilowanie próbek FFPE tkanek reprezentatywnych dla tych samych typów nowotworów tarczycy, które analizowaliśmy w podejściu metabolomicznym. Do przygotowania próbek peptydów przeznaczonych do analizy w układach LC-MS/MS (LC-MALDI-MS/MS i Orbitrap LC-MS/MS) wykorzystaliśmy wcześniej wspomnianą zmodyfikowaną metodę ekstrakcji białek z preparatów FFPE według Geoui i wsp. [11] oraz technikę izolacji składników proteomu MED-FASP [12-13]. W pierwszej kolejności przeprowadziliśmy analizę tkanek wszystkich typów raka tarczycy w układach LC-MALDI-MS/MS i Orbitrap LC-MS/MS, po uprzednim trawieniu białka samą trypsyną. Z uwagi

na ilość frakcji otrzymanych dla jednej próbki po wieloenzymatycznym (trypsyna i Lys-C) trawieniu białek metodą MED-FASP, w kolejnym etapie analizowaliśmy jedynie interesujące nas, z punktu widzenia znaczącego problemu diagnostycznego, zmiany pęcherzykowe (FTC, PTC-FV, FA) oraz klasyczny wariant raka brodawkowatego (PTC-CV). Analizy te przeprowadzone były w układzie Orbitrap LC-MS/MS.

Podejście uwzględniające zastosowanie dwóch układów analitycznych Orbitrap i MALDI-TOF umożliwiło identyfikację białkowych produktów 3700 unikalnych genów oraz ujawniło znaczące różnice między rakiem rdzeniastym, anaplastycznym oraz zróżnicowanymi rakami pochodzenia nabłonkowego (brodawkowatym i pęcherzykowym). Białka charakterystyczne dla raka rdzeniastego i anaplastycznego powiązane były odpowiednio z funkcjami neuroendokrynnymi (MTC) i czynnikami bezpośrednio związanymi z zaawansowanymi nowotworami złośliwymi (ATC). Należy podkreślić, że odróżnienie niezróżnicowanego raka anaplastycznego od raków zróżnicowanych pochodzenia nabłonkowego (FTC i PTC) na podstawie cech histopatologicznych nie stanowi wyzwania diagnostycznego, natomiast znajomość różnic w proteomach tych nowotworów może pomóc w zrozumieniu ich ewolucji. Wśród składników proteomicznych charakterystycznych dla raka anaplastycznego stwierdzono cechy charakterystyczne dla zaawansowanych nowotworów złośliwych, w tym białka związane ze stanem zapalnym, odpowiedzią immunologiczną, adhezją i migracją komórek (w tym integryny, białka adhezyjne i metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej). Z kolei rak rdzeniasty w obrazie histopatologicznym często wykazuje cechy charakterystyczne dla innych zróżnicowanych nowotworów tarczycy, stąd dodatkowo stosuje się badanie poziomu kalcytoniny jako markera uzupełniającego diagnostykę MTC [24]. W niektórych rzadkich przypadkach spotyka się ujemną kalcytoninę w MTC, stąd poszukiwanie dodatkowego markera molekularnego ma swoje uzasadnienie [25]. Zgodnie z oczekiwaniami, wśród charakterystycznych dla raka rdzeniastego składników proteomu znalazły się białka zaangażowane w funkcje neuroendokryne i przetwarzanie neurohormonów.

Przeprowadzone w następnej kolejności profilowanie różnych typów raków zróżnicowanych pochodzenia nabłonkowego (FTC i PTC) oraz gruczolaka pęcherzykowego (FA) przy użyciu wieloenzymatycznego trawienia i analizy w układzie Orbitrap LC-MS/MS, umożliwiło identyfikację białkowych produktów 4800 unikalnych genów. Analiza porównawcza badanych profili nowotworów tarczycy wykazała ogólne podobieństwo raków pęcherzykowych do obu wariantów raka brodawkowatego. Ponadto, gruczolak pęcherzykowy charakteryzował się większym podobieństwem do raka pęcherzykowego niż do obu wariantów raka brodawkowatego. Na podstawie analizy wzbogacenia terminów GO (*Gene Ontology*), której poddano genowe odpowiedniki białek różnicujących zróżnicowane nowotwory tarczycy pochodzenia nabłonkowego (FTC i PTC), zaobserwowano nadreprezentowane procesy związane z przemianami lipidów, metabolizmem hormonów, regulacją ekspresji genów oraz utrzymaniem struktury DNA.

Niezwykle ciekawym aspektem przeprowadzonych badań była możliwość porównania uzyskanych przez nas profili metabolomicznych i proteomicznych różnych typów raka tarczycy. Zaobserwowaliśmy zmiany poziomów białek zaangażowanych m.in. w metabolizm lipidów, kwasów nukleinowych oraz związanych z funkcjami mitochondriów, które odpowiadały cechom profili metabolicznych różnicujących poszczególne typy nowotworów tarczycy, w tym raki zróżnicowane. Przykładowo, obniżony poziom kwasu cytrynowego zaobserwowany w ATC w porównaniu z PTC/FTC, odpowiadał obniżonym poziomom enzymów zaangażowanych w cykl

TCA (ACO1, ACO2, CS, IDH1, IDH2), co było prawdopodobnie związane z nasiloną glikolizą w przypadku niezróżnicowanego nowotworu. Zaobserwowaliśmy również obniżony poziom kwasów tłuszczowych w przypadku zmian łagodnych (FA) w odniesieniu do złośliwych nowotworów zróżnicowanych (PTC i FTC), co odpowiadało różnicom w poziomach białek biorących udział w utrzymaniu homeostazy i metabolizmie trójglicerydów. Ponadto zmniejszony poziom fosforanu mio-inozytolu charakterystyczny dla FA odpowiadał ogólnie zmniejszonej ekspresji kilku fosfataz i kinaz, zaangażowanych w metabolizm inozytolu i fosfatydyloinozytolu, obserwowanej w FA w porównaniu z nowotworami złośliwymi. Dalej, podwyższony poziom kwasu bursztynowego, obserwowany w nowotworach złośliwych, może być związany z ogólnie wzmożoną aktywnością mitochondriów i zwiększoną syntezą aminokwasów, charakterystyczną dla tych zmian, co odpowiada zaobserwowanym przez nas podwyższonym poziomom wielu białek zaangażowanych w metabolizm aminokwasów. W przypadku zróżnicowanych nowotworów tarczycy (PTC i FTC), zaobserwowaliśmy zwiększony poziom kwasu cytrynowego oraz zwiększoną ilość kluczowych enzymów biorących udział w metabolizmie cytrynianu (ACLY, ACO1/2, CS, IDH1/2) w PTC w porównaniu do FTC. Co istotne, uzyskane przez nas profile proteomiczne odpowiadały innym zaprezentowanym dotąd w literaturze profilom transkryptomycznym i metabolomicznym raków tarczycy, co uzupełniło obraz molekularny tych nowotworów z punktu widzenia biologii systemów oraz potwierdziło wysoki potencjał narzędzi multi-omicznych w klasyfikacji nowotworów tarczycy. Ponadto, zaproponowaliśmy sygnatury proteomiczne charakterystyczne dla poszczególnych typów nowotworów tarczycy, które w przyszłości mogą być wykorzystane do dalszych badań walidacyjnych mających na celu identyfikację specyficznych biomarkerów.

Kolejnym podjętym przeze mnie wyzwaniem w kontekście poszukiwania molekularnych klasyfikatorów raka tarczycy w próbkach tkanek było zastosowanie podejście lipidomiczne oparte o technikę obrazowania molekularnego metodą MALDI. Lipidy, będące głównymi składnikami błon komórkowych, odgrywają istotną rolę w przekazywaniu sygnałów w komórce, stanach zapalnych i różnicowaniu tkanek, stąd posiadają potencjalnie wysoką wartość w diagnostyce nowotworów [26]. Zastosowana technika obrazowania molekularnego MALDI-MSI pozwala na detekcję przestrzennego rozmieszczenia związków bioaktywnych, takich jak peptydy, białka, lipidy i metabolity, w preparatach tkankowych. Przy pomocy odpowiednich narzędzi bioinformatycznych istnieje możliwość korelacji cech molekularnych z cechami morfologicznymi i klinicznymi badanych tkanek, a także definiowanie molekularnych markerów nowotworowych. Badania z tego obszaru przeprowadziłam w ramach przyznanego mi krótkoterminowego projektu badawczego COST „*Lipidomics in thyroid cancer research*”, realizowanego w Laboratorium Spektrometrii Mas *Biomedical Research Centre Sheffield Hallam University* w Anglii, pod kierunkiem prof. Malcolma Clench. Efektem realizacji tego projektu była publikacja **H4**, dotycząca profilowania lipidów techniką MALDI-MSI w celu odróżnienia brodawkowego raka tarczycy od tkanki nienowotworowej. Badania przeprowadziłam na tkance utrwalonej w formalinie i porównałam z wynikami uzyskanymi dla tkanki mrożonej. Przeprowadziłam również próbę analizy lipidów na tkance FFPE, jednak etap pozbycia się parafiny z wykorzystaniem toluenu znacząco przyczynił się do wypłukania większości lipidów z badanej tkanki. Uzyskane w ramach prac optymalizacyjnych wyniki sugerują, że istnieje możliwość wykrycia niektórych rodzajów lipidów obecnych w próbce tkanki po odparafinowaniu, jednak ich ilość jest znikoma w porównaniu z ilością lipidów wykrytych w preparacie mrożonym lub utrwalonym w formalinie. Preparatyka tkanki mrożonej/utrwalonej w formalinie była

stosunkowo prosta i zakładała dwukrotne przemycie preparatu wodą destylowaną oraz pokrycie jej matrycą CHCA (kwas α -cyano-4-hydroksycynamonowy). Właściwe profilowanie lipidów prowadziłam z wykorzystaniem wysokorozdzielczego spektrometru HDMS SYNAPT TM G2 z technologią mobilności jonowej, umożliwiającą rozdział jonów pochodzących od związków izomerycznych i izobarycznych, co jest szczególnie istotne w przypadku analiz lipidów. Identyfikacje lipidów przeprowadziłam poprzez porównanie dokładnych mas cząsteczkowych i ścieżek fragmentacji jonów protonowanych, zarejestrowanych podczas eksperymentów MS/MS, z bazą danych LIPID MAPS.

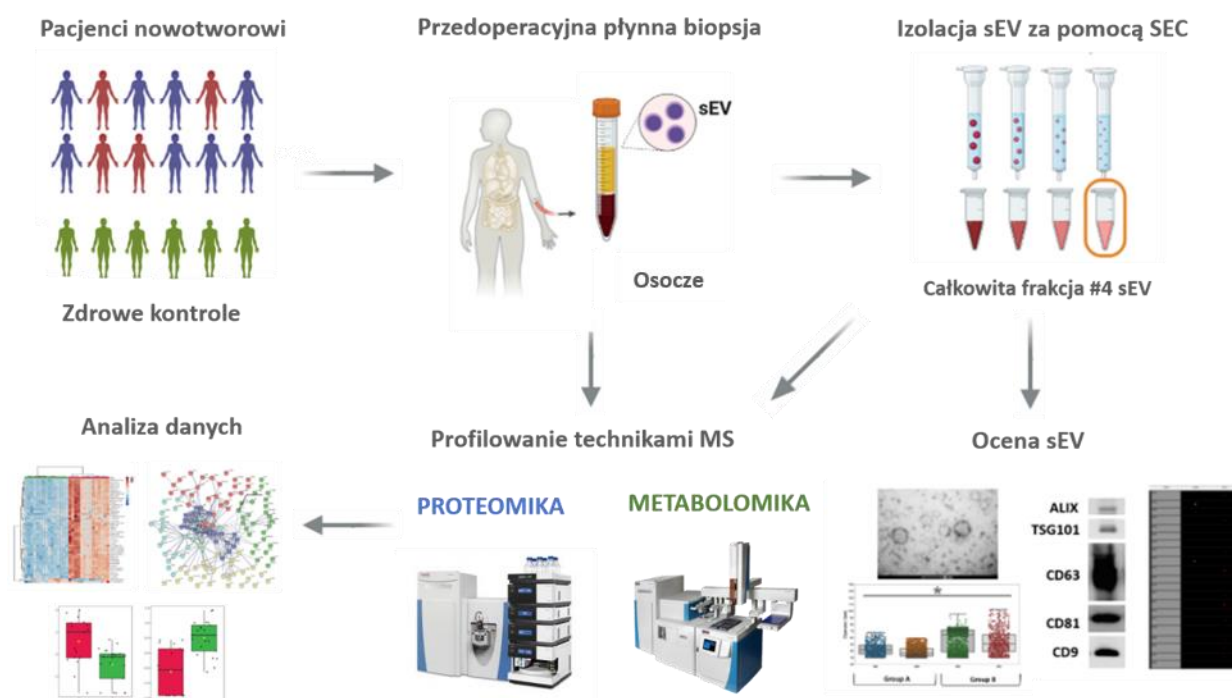
Na podstawie przeprowadzonych analiz zidentyfikowałam lipidy należące do klas fosfatydylocholin (PC), sfingomielin (SM) i kwasów fosfatydowych (PA), a ich poziom był znacząco wyższy w tkance nowotworowej w porównaniu z tarczycą nienowotworową. Osiem spośród zidentyfikowanych lipidów, PC(32:0), PC(32:1), PC(34:1), PC(36:3), PA(36:2), PA(36:3), SM (34:1) i SM(36:1), których poziom była znacząco podwyższony w PTC w stosunku nienowotworowej tkanki tarczycy, było wcześniej raportowanych w literaturze [27-29]. Te same składniki lipidowe wykryłam w preparatach utrwalonych w formalinie, jak i w tkance mrożonej, przy czym jony $[M + Na]^+$ obecne były w przewodzie w tkance utrwalonej w formalinie, podczas gdy w tkance mrożonej przeważały jony $[M + K]^+$. Należy zaznaczyć, że intensywności rejestrowanych jonów pochodzących od związków lipidowych były wyższe w materiale mrożonym w odniesieniu do tkanki utrwalonej w formalinie. Prezentowane wyniki potwierdzają możliwość wykorzystania techniki MALDI-MSI w analizie dystrybucji lipidów bezpośrednio w tkankach stabilizowanych formaliną oraz dają nadzieję na potencjalne wykorzystanie ich w klasyfikacji chorób tarczycy.

Identyfikacja proteomicznych i metabolomicznych składników egzosomów obecnych w surowicy krwi pacjentów nowotworowych technikami spektrometrii mas (H6, H7)

Wszystkie typy komórek i tkanek, w tym nowotworowe, uwalniają mieszaninę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych różniących się wielkością, pochodzeniem i zawartością. Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (sEV), które obejmują egzosomy wywodzące się z endosomów, to populacja pęcherzyków o średnicy 30–150 nm, niosących ładunek w postaci cząstek bioaktywnych (kwasy tłuszczowe, białka, metabolity i lipidy), który pod względem zawartości jest zbliżony do komórki macierzystej. sEV obecne w krwi pacjentów nowotworowych są mieszaniną pęcherzyków pochodzenia nowotworowego i pęcherzyków wytwarzanych przez komórki niezłośliwe, w większości komórki układu odpornościowego [6]. Zarówno sEV uwalniane przez komórki nowotworowe oraz jak i inne komórki obecne w mikrośrodowisku guza, są kluczowymi mediatorami w komunikacji międzykomórkowej, zaangażowanymi w różne aspekty rozwoju raka, w tym wzrost, migrację, angiogenezę, degradację macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT) a także ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego. Liczne badania dotyczące egzosomów postulują ich znaczącą rolę w progresji nowotworów, przerzutowaniu i odporności na terapie onkologiczne [30]. Stąd egzosomy, obecne w płynach ustrojowych pacjentów, są uważane za obiecujących kandydatów do płynnej biopsji, która stanowi nowe źródło potencjalnych prognostycznych i predykcyjnych biomarkerów nowotworowych.

W celu poszukiwania markerów nowotworowych opartych o egzosomy wykorzystuje się głównie podejścia transkryptomyczne i proteomiczne, natomiast wiedza na temat składowych

metabolomicznych tych pęcherzyków jest już znacznie ograniczona. Przed przystąpieniem do właściwych eksperymentów profilowania składników egzosomów w celu poszukiwania cech proteomu i metabolomu związanych z chorobą nowotworową lub odpowiedzią na leczenie (publikacje **H6** i **H7**), konieczne było wdrożenie i zoptymalizowanie metody izolacji i oceny egzosomów na potrzeby prowadzenia kompleksowych analiz proteomicznych i metabolomicznych z wykorzystaniem technik spektrometrii mas. Egzosomy izolowane były w oparciu o technikę chromatografii wykluczenia wielkości (SEC) na podstawie protokołu opracowanego przez Smolarza i wsp. [31] oraz Ludwig i wsp. [32], zoptymalizowanego na potrzeby restrykcyjnych wymagań stosowanych metod analitycznych. Metoda SEC umożliwiła nam izolację frakcji pęcherzyków (frakcja #4), które pod względem morfologii, rozmiaru (~50 nm) i obecności specyficznych biomarkerów mieściły się w kategorii egzosomów. Zastosowana metoda izolacji umożliwiła nam otrzymanie preparatu egzosomów o wysokiej jakości, niezagregowanych, funkcjonalnie aktywnych i wolnych od zanieczyszczeń wysokokopijnymi białkami surowicy (głównie albuminą). Ocena jakości pęcherzyków według wymogów MISEV 2018 [33] (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles) wymagała zastosowania różnorodnych technik analitycznych. Wielkość i morfologię pęcherzyków oceniono odpowiednio metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Obecność specyficznych dla egzosomów markerów CD9, CD63, CD81, TSG101 i ALIX analizowano techniką Western blot. Wydajność izolacji oceniono na około 1×10^{10} sEV/1ml surowicy, za pomocą pomiaru najnowocześniejszym cytometrem przepływowym Amnis ImageStream x MkII znakowanej frakcji egzosomów. W dalszej kolejności opracowaliśmy procedurę ekstrakcji białek (z wykorzystaniem deoksycholenu sodu, SDC) i metabolitów (sekwencyjne wymywanie rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności) na potrzeby analiz MS, które szczegółowo opisane są w publikacji **H7**. Metoda ekstrakcji metabolitów opisana w pracy **H6**, zakładająca prostą ekstrakcję metanolem, dawała nieznacznie niższą wydajność niż ta zastosowana w publikacji **H7**. Badania metabolomiczne prowadziliśmy w układzie GC-MS (QQQ), natomiast badania proteomiczne prowadzone były w układzie LC-MS/MS QExactive Orbitrap. Analiza uzyskanych danych obejmowała ich wstępne przetwarzanie (w tym m.in. filtrowanie jonów, normalizacja, dekonwolucja, wyrównanie, skalowanie), identyfikację związków, analizę statystyczną i bioinformatyczną, w tym integrację danych multi-omicznych oraz interpretację biologiczną. Główne etapy badań prowadzonych w celu poszukiwania proteomicznych i metabolomicznych cech egzosomów związanych z chorobą nowotworową i odpowiedzią na terapię przedstawiłam na **Rycinie 4**. Należy podkreślić, że etap ostatni, obejmujący szczegółową i globalną analizę uzyskanych danych był szczególnie czasochłonny i wymagał ode mnie dużego zaangażowania w zgłębienie metod pozwalających na integrację uzyskanych danych, co do tej pory w literaturze nie było szeroko prezentowane. Szczegółowe parametry prowadzonych analiz instrumentalnych i obliczeniowych zostały przedstawione w pracach **H6** i **H7**.



Rycina 4. Główne etapy badań prowadzonych w celu poszukiwania proteomicznych i metabolomicznych cech egzosomów/sEV związanych z chorobą nowotworową i odpowiedzią na terapię.

Wykorzystanie techniki GC-MS do profilowania metabolomicznego surowicy i egzosomów izolowanych z surowicy pacjentów z rozpoznaniem raka regionu głowy i szyi (RGiSz) leczonych samodzielną radioterapią (H6)

Rak regionu głowy i szyi (RGiSz) jest szóstym najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym i odpowiada za około 6 % wszystkich przypadków raka na świecie [34]. Główną metodą stosowaną w leczeniu raka regionu głowy i szyi jest radioterapia (RT), stosowana samodzielnie lub w połączeniu z innymi metodami (chirurgią, chemioterapią lub immunoterapią). Jedną z głównych korzyści leczenia promieniowaniem jonizującym jest zachowanie struktury i funkcji narządu docelowego, co w przypadku RGiSz jest niezwykle istotne. Należy jednak podkreślić, że skutki promieniowania jonizującego dotyczą nie tylko pożądanego uszkodzenia komórek nowotworowych, ale także uszkodzeń indukowanych w sąsiadujących z nimi zdrowych tkankach, co znajduje odzwierciedlenie na poziomie ogólnoustrojowym [35]. Z tego powodu planowanie i monitorowanie radioterapii byłoby znacznie ułatwione, gdyby w praktyce klinicznej dostępne były molekularne markery indywidualnej odpowiedzi na promieniowanie, jak również znaczniki molekularne umożliwiające przewidywanie toksyczności radioterapii.

Poszukiwania biomarkerów RGiSz pod kątem diagnostyki, oceny rokowania czy wyboru schematu leczenia, prowadzone były dotychczas na różnorodnych próbkach klinicznych (krwi, moczu, ślinie, tkankach) z wykorzystaniem wielu podejść omicznych (genomiczne, transkryptomyczne, proteomiczne, metabolomiczne). Jednak wiedza, dotycząca zmian w metabolomie pod wpływem promieniowania jonizującego oraz powiązanych z nimi mechanizmów molekularnych, wciąż pozostaje ograniczona. Zakładając, że metabolom surowicy w sposób bezpośredni odzwierciedla reakcję organizmu pacjenta zarówno na stan chorobowy, jak i wdrożone leczenie, postanowiliśmy ocenić zmiany metabolomiczne wywołane

promieniowaniem oraz zmiany w kontekście różnic między pacjentami chorymi na raka regionu głowy i szyi a osobami zdrowymi, w dwóch rodzajach materiału tj. surowicy pełnej oraz egzosomach izolowanych z surowicy. W naszym pilotażowym badaniu, opisanym w publikacji **H6**, przeprowadziliśmy kompleksowe porównanie profili metabolomicznych surowicy i egzosomów izolowanych od pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym zlokalizowanym w obrębie gardła, bezpośrednio przed i miesiąc po radioterapii (przyspieszone napromienianie dawką frakcyjną 1,8 G, dawka całkowita 64-72Gy), w celu oceny zmian pod wpływem zastosowanego leczenia. Jednocześnie dokonaliśmy analizy metabolomu surowicy i egzosomów od pacjentów przed leczeniem promieniami i od osób zdrowych, w celu oceny cech związanych z badanym nowotworem RGiSz. Na podstawie przeprowadzonej niecelowanej analizy techniką GC-MS, zaobserwowaliśmy, że badany profil metabolomiczny egzosomów, w którym dominowały głównie kwasy tłuszczowe, kwasy karboksylowe oraz cukrole, jest mniej złożony niż profil surowicy pełnej. Należy jednak podkreślić, że cechy zmodyfikowanego metabolizmu energetycznego komórek nowotworowych wykrywane były w obu typach próbek, co potwierdziło prawdopodobieństwo wykorzystania biomarkerów nowotworowych opartych o metabolity egzosomów. W raku regionu głowy i szyi, podobnie jak w wielu innych typach nowotworów, komórki nowotworowe mogą zmieniać swój metabolizm energetyczny, przełączając się z cyklu TCA na glikolizę oraz utlenianie kwasów tłuszczowych, służących jako mechanizm zapasowy do produkcji energii (wcześniej wspomniany efekt Warburga). Nasze badanie potwierdziło, że metabolity związane z procesami zaangażowanymi w metabolizm energetyczny, w tym glikolizę, glukoneogenezę, efekt Warburga, cykl TCA, metabolizm pirogronianu i mitochondrialny łańcuch transportu elektronów, wykazywały różne poziomy akumulacji w próbkach od pacjentów z RGiSz i zdrowych osób. Co ważne, cechy związane z tym charakterystycznym fenotypem raka zaobserwowaliśmy zarówno w pełnej surowicy, jak i w izolowanych z niej egzosomach. Ponadto, szlaki metaboliczne związane z związkami niskocząsteczkowymi charakterystycznymi dla egzosomów izolowanych z surowicy pacjentów z RGiSz obejmowały beta-oksydację kwasów tłuszczowych oraz metabolizm ciał ketonowych, który jest efektem podwyższonej lipolizy. Takie procesy, będące prawdopodobnie zapasowym mechanizmem produkcji energii dla komórek nowotworowych, były wcześniej raportowane w badaniach z wykorzystaniem techniki NMR u pacjentów z rakiem regionu głowy i szyi [36]. Ponadto, wcześniejsze badania sugerują, że egzosomy (bogate w kwasy tłuszczowe) mogą pośredniczyć w międzykomórkowym transporcie kwasów tłuszczowych przez błony komórkowe. Stąd, potwierdzona również w naszym badaniu, potencjalna rola małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jako mediatorów w związanym z procesami nowotworzenia zwiększonym metabolizmie lipidów, zasługuje na dalszą uwagę.

Zmiany w metabolomie pod wpływem radioterapii obserwowane były przez nas głównie w próbkach surowicy i objawiały się różnym poziomem związków zaangażowanych w metabolizm aminokwasów, cukrów, nukleotydów, kwasów tłuszczowych i lipidów. Nasze wyniki pokazały, że zmiany w metabolomie surowicy pod wpływem leczenia miejscowego promieniami w RGiSz, mogą być obserwowane miesiąc po zakończeniu leczenia i odzwierciedlać zarówno spodziewaną zmniejszoną liczbę komórek nowotworowych w guzie jak i niepożądaną toksyczność wywołaną promieniowaniem w tkankach prawidłowych. Zgodnie z najnowszymi doniesieniami, szczególnie istotną rolę w odpowiedzi pacjentów z RGiSz na RT odgrywa metabolizm aminokwasów, w szczególności alaniny, której obniżony poziom w surowicy skorelowany był z efektem ostrej toksyczności popromiennej, związanej z utratą masy ciała pacjentów po radioterapii [37]. Ponadto, reakcja całego ciała na napromienianie często obejmuje

zmiany molekularne związane ze stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym [38]. Dlatego warto podkreślić, że podwyższony poziom hipotauryny, pełniącej rolę antyoksydacyjną w komórce, został przez nas zaobserwowany w próbkach surowicy pacjentów po radioterapii. Co więcej, zmiany poziomów fosfolipidów związanych z odpowiedzią zapalną, obserwowane przez nas w surowicy pacjentów poddawanych promieniowaniu, potwierdziły ogólny fenotyp metaboliczny związany z radioterapią. Z drugiej strony, w przeciwieństwie do charakterystycznych zmian w metabolomie surowicy wywołanych promieniowaniem, nasze badanie nie ujawniło specyficznych zmian po RT w składzie metabolomu egzosomów. Znana jest rola egzosomów uwalnianych przez komórki napromieniowane jako mediatorów w tzw. popromiennym efekcie sąsiedztwa (*bystander effect*) oraz w innych związanych z promieniowaniem aspektach sygnalizacji międzykomórkowej, która przejawia się w postaci obserwowanych zmian na poziomie proteomu i miRNomu egzosomów uwalnianych przez komórki RGiSz [39-41]. Dlatego istnieje konieczność prowadzenia dalszych badań w celu weryfikacji roli metabolitów egzosomów jaką mogą potencjalnie pełnić w sygnalizacji międzykomórkowej związanej z promieniowaniem.

Proteomiczny i metabolomiczny skład egzosomów różnicuje pacjentów z rakiem odbytnicy w zależności od odpowiedzi na przedoperacyjną radioterapię (H7)

Pierwszą linią leczenia pacjentów z miejscowo zaawansowanym rakiem odbytnicy jest całkowite wycięcie mezorektum uzupełnione o terapię neoadjuwantową. W grupie pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem odbytnicy i podejrzeniem zwiększonego ryzyka wznowy miejscowej lub przerzutów odległych (tj. $T \geq 3$ lub N+), wskazane jest zastosowanie radioterapii neoadjuwantowej (neo-RT) jako składowej radykalnego leczenia [42]. Ocena odpowiedzi na leczenie promieniami zgodnie z stopniem regresji guza (TRG) jest niezbędna do planowania dalszego leczenia i prognozowania przeżycia, jednak rzeczywiste przewidywanie regresji nowotworu w dalszym ciągu pozostaje wyzwaniem. Co więcej, pomimo korzyści płynącej z zastosowania przedoperacyjnej radioterapii u pacjentów z miejscowo zaawansowanym rakiem odbytnicy, prowadzącej na ogół do zmniejszenia masy guza, takie leczenie może również wywoływać toksyczność i inne niekorzystne skutki uboczne [43]. Stąd właściwy dobór pacjentów wymagających bardziej agresywnego leczenia przedoperacyjnego byłby wysoce pożądanym elementem terapii personalizowanej. Niestety nadal brak jest specyficznych markerów molekularnych, służących do prognozowania zarówno odpowiedzi na przedoperacyjną radioterapię jak i jej toksyczności w miejscowo zaawansowanym raku odbytnicy.

Z doniesień literaturowych wynika, że egzosomy mogą być wykorzystywane jako biomarkery do przewidywania i monitorowania odpowiedzi na leczenie, jednak wiedza w tym obszarze w odniesieniu do raka odbytnicy pozostaje ograniczona [44]. Niemniej jednak ogólnie przyjmuje się, że promieniowanie ma wpływ na ładunek molekularny egzosomów, a pęcherzyki te są zaangażowane w przenoszenie oporności na promieniowanie. W naszym badaniu zaprezentowanym w publikacji **H7**, wykorzystaliśmy nowatorskie zintegrowane podejście proteomiczne i metabolomiczne, w celu ujawnienia składników egzosomów związanych z różną odpowiedzią pacjentów z gruczolakorakiem odbytnicy na neoadjuwantową radioterapię (całkowita dawka 39–54 Gy) oraz powiązanych z nimi zmian w procesach metabolicznych i sygnałowych. Ponadto analizowaliśmy równoległe skład egzosomów pochodzących z surowicy i całego osocza, w celu porównania potencjału biomarkerów identyfikowanych w obu badanych

próbkach. Badanie przeprowadziliśmy na dwóch grupach pacjentów, sklasyfikowanych jako „dobrze odpowiadający” (guzy wrażliwe na promieniowanie: TRG 0–1) i „słabo odpowiadający” (guzy odporne na promieniowanie: TRG 2–3) na przedoperacyjną radioterapię.

Nasze badanie wykazało, że składniki proteomu egzosomów izolowanych z surowicy mają względnie najwyższą zdolność różnicowania pacjentów z rakiem odbytnicy pod względem odpowiedzi na neo-RT, spośród obu typów badanych próbek (osocze, egzosomy) oraz w odniesieniu do badanych składników molekularnych (białka, metabolity, lipidy) technikami spektrometrii mas. W przypadku analizy proteomicznej pełnego osocza znaleziono mniej białek różnicujących, a różnice te wykazywały niższą istotność statystyczną niż w przypadku białek egzosomów. Wśród białek najlepiej różnicujących pacjentów pod względem odpowiedzi na radioterapię znalazły się GPLD1 (AUC = 0.85, dokładność 74%) identyfikowane w osoczu oraz C8G (AUC = 0.91, dokładność 81%), SERPINF2 (AUC = 0.91, dokładność 79%) and CFHR3 (AUC = 0.90, dokładność 81%) identyfikowane w egzosomach. Różnicujące białka były funkcjonalnie powiązane z takimi procesami jak: aktywacja odpowiedzi immunologicznej, aktywacja dopełniacza i funkcji płytek krwi, a także metabolizm lipoprotein i cholesterolu. Kilka spośród zidentyfikowanych przez nas białek różnicujących badane grupy pacjentów, było wcześniej raportowanych w literaturze jako związane z odpowiedzią na RT w raku jelita grubego, w tym FGB, CD44, GLUT1/SLC2A1, PON1. Na szczególną uwagę zasługuje podwyższony poziom enzymu GLUT1 (odpowiedzialnego za transport glukozy i bezpośrednio związany z efektem Warburga) w egzosomach pacjentów słabo odpowiadających na RT, który również korelował z podwyższonym poziomem glukozy w tych samych próbkach egzosomów. Wysoką ekspresję GLUT1 obserwowano wcześniej w radioopornych komórkach nowotworowych, co przypuszczalnie było powiązane ze stymulacją hipoksji i regulacją szlaków sygnałowych, takich jak MAPK i PI3K/AKT [45-46]. Co ciekawe, zaobserwowaliśmy podwyższony poziom białek transdukcji sygnału S100A8 i S100A9, w egzosomach pacjentów słabo odpowiadających na RT. Białka te wcześniej raportowane były jako markery egzosomalne specyficzne dla raka jelita grubego, zaangażowane m.in. migrację, rekrutację leukocytów, procesy zapalenia promujące progresję nowotworu i tworzenie nisz przedprzerzutowych [47]. Pomimo tego, że egzosomy wykazywały wyższy potencjał różnicowania pacjentów pod względem odpowiedzi na RT, zidentyfikowaliśmy dziewięć wspólnych białek różnicujących, zarówno w próbkach egzosomów jak i osocza. Wśród nich znalazły się białko wiążące galektynę-3 (LGALS3BP) i białko CD5L, których podwyższony poziom zarówno w osoczu jak i egzosomach pacjentów słabo odpowiadających na RT, związany był z kontrolą odpowiedzi zapalnej i nadzorem immunologicznym [48].

Większość badań dotyczących roli egzosomów w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące dotyczy zmian w transkryptomie i proteomie. Znacznie mniej jest wiadomo o zmianach w profilach metabolomicznych tych pęcherzyków, a ponadto brak jest danych o ich potencjale do różnicowania pacjentów różnie odpowiadających na radioterapię. Nasze badania pokazały, że metabolity obecne zarówno w osoczu jak i egzosomach różnicują pacjentów z rakiem odbytnicy w zależności od odpowiedzi na RT. Na szczególną uwagę zasługują różnicujące związki niskocząsteczkowe związane z metabolizmem lipidów i aminokwasów, których poziom był podwyższony u pacjentów dobrze odpowiadających na leczenie. Co interesujące poziom różnicujących białek związanych z metabolizmem lipidów również był podwyższony w tej samej grupie pacjentów. Ponadto kilka lipidów, w tym pochodne triacylogliceroli (TAG), fosfatydyloetanolin (PE), fosfatydyloinozytoli (PI), sfingomielin (SM) i diacylogliceroli

(DAG), miało znacząco różne poziomy w osoczu pacjentów dobrze i słabo odpowiadających na RT. Dlatego należy podkreślić, że identyfikowane molekularne składniki osocza (w tym białka, metabolity i lipidy), istotnie różnicujące obie grupy pacjentów, są ogólnie powiązane z metabolizmem lipidów. Obserwacja ta zgodna jest z danymi literaturowymi na temat wpływu radioterapii na uszkodzenie błon komórkowych i indukcję odpowiedzi zapalnej, przejawiającej się zmianami poziomu lipidów [49]. Z drugiej strony różnicujące metabolity identyfikowane w egzosomach były głównie związane z metabolizmem energetycznym, w tym glikolizą i glukoneogenezą. Obserwowany przez nas podwyższony poziom glukozy w egzosomach pacjentów słabo odpowiadających na RT i zwiększony z tym poziom glikolizy jest zgodny z ogólnym fenotypem związanym ze zjawiskiem oporności na promieniowanie jonizujące (co prawdopodobnie wynika z indukcji szlaków naprawy DNA) [50].

Integracja danych proteomicznych i metabolomicznych umożliwiła identyfikację wspólnych szlaków molekularnych, istotnych z punktu widzenia odpowiedzi pacjentów z rakiem odbytnicy na neo-RT, w tym procesy związane z odpowiedzią układu immunologicznego, aktywacją układu dopełniacza i funkcji płytek krwi, metabolizmem lipidów oraz szlaków sygnałowych związanych z chorobą nowotworową. Coraz więcej dowodów literaturowych potwierdza istotną rolę dopełniacza w rozwoju nowotworu, a zwiększenie aktywności tego układu koreluje ze złym rokowaniem w raku jelita grubego [51]. Podobnie zarówno płytki krwi i egzosomy pochodzące z płytek (prawdopodobnie stanowiące najliczniejszą populację pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w osoczu) służą jako regulatory progresji nowotworu, mogą promować proliferację, uczestniczyć w komunikacji z mikrośrodowiskiem guza i sprzyjać przerzutowaniu [52-53].

Nasze badania wykorzystujące zintegrowane podejście proteomiczne i metabolomiczne potwierdziły, że egzosomy transportują enzymy i związki niskocząsteczkowe biorące udział w różnych aspektach zaburzonego metabolizmu komórek nowotworowych, oraz są zaangażowane w odpowiedź na promieniowanie jonizujące na poziomie komórkowym, w tym glikolizę, stres oksydacyjny oraz reakcje układu immunologicznego i procesy zapalne. Ponadto potwierdziliśmy znany w literaturze fenotyp komórek nowotworowych związany z opornością na promieniowanie, objawiający się zwiększoną glikolizą. Udowodniliśmy, że egzosomy są ważnym mediatorem przeprogramowania metabolicznego w odpowiedzi komórek nowotworowych na radioterapię, co objawiało się wzrostem poziomu glukozy i fosforanu oraz dwóch kluczowych enzymów biorących udział w metabolizmie glukozy (transporter glukozy GLUT1 i dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego GAPDH) w egzosomach pacjentów ze słabą odpowiedzią na RT. Dodatkowo wykazaliśmy na poziomie proteomicznym i metabolomicznym, że odpowiedź na promieniowanie jonizujące w przypadku egzosomów jest również związana z metabolizmem lipidów. Egzosomy izolowane od pacjentów dobrze odpowiadających na RT były wzbogacone w cholesterol i kwasy tłuszczowe, w tym wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), które odgrywają ważną rolę w sygnalizacji międzykomórkowej, procesach prozapalnych, oraz antyoksydacyjnych w reakcji na promieniowanie [54]. Ponadto, w tej samej grupie pacjentów zaobserwowaliśmy podwyższony poziom paraoksonazy-1 (PON1), która jest ważnym enzymem antyoksydacyjnym, powiązanym z błonami mitochondrialnymi oraz lipoproteinami o dużej gęstości (HDL). Z drugiej strony, dwa inne białka związane z metabolizmem lipidów, FABP5 i CD5L, wykazywały obniżony poziom u pacjentów ze słabą odpowiedzią na RT. Z danych literaturowych wynika, że CD5L jako kluczowy regulator syntezy lipidów, zmniejsza zawartość PUFA i ogranicza ekspresja genów prozapalnych, natomiast białko

wiążące kwasy tłuszczowe FABP5 dostarcza ligandy do receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów PPAR- β/δ w jądrze i wpływa na zwiększenie angiogenezy poprzez transdukcję sygnału PPAR- γ -VEGF [55].

Podsumowując, zastosowane przeze mnie podejście multi-omiczne umożliwiło zidentyfikowanie białkowych i metabolicznych składników egzosomów, które różnicowały pacjentów pod względem odpowiedzi na przedoperacyjną radioterapię. Ponadto, byliśmy w stanie powiązać te związki z procesami metabolicznymi i sygnałowymi, które ulegały zaburzeniu pod wpływem leczenia, w tym reakcje systemu immunologicznego, układ dopełniacza, funkcje płytek krwi, metabolizm glukozy i lipidów. Wykazaliśmy, że białkowe składniki egzosomów wykazywały najwyższą siłę różnicowania pacjentów z rakiem odbytnicy różniących się odpowiedzią na przedoperacyjną radioterapię. Stąd proteomiczne składniki egzosomów wydają się być dobrym potencjalnym źródłem biomarkerów odpowiedzi na leczenie promieniami w miejscowo zawansowanym raku odbytnicy. Dodatkowo, integracja danych metabolomicznych i proteomicznych prezentuje nowe spojrzenie na analizę globalnej odpowiedzi na leczenie nowotworu.

4.3.4. Podsumowanie i perspektywy

Za najważniejsze efekty mojego osiągnięcia naukowego uważam:

- Opracowanie i zoptymalizowanie metodyki prowadzenia badań proteomicznych i metabolomicznych z wykorzystaniem retrospektywnego materiału tkankowego, analizowanego technikami spektrometrii mas.
- Wykazanie, że profilowanie białek, metabolitów i lipidów technikami spektrometrii mas, może służyć jako pomocnicze narzędzie diagnostyczne wspierające klasyfikację nowotworów tarczycy.
- Opracowanie i optymalizację metodyki prowadzenia kompleksowych analiz proteomicznych i metabolomicznych egzosomów izolowanych z surowicy.
- Porównanie profilu metabolicznego egzosomów izolowanych z surowicy oraz pełnej surowicy krwi pacjentów z rozpoznaniem RGiSz leczonych samodzielną radioterapią.
- Wykazanie, że skład molekularny egzosomów izolowanych z surowicy może służyć do przewidywania odpowiedzi na neoadjuwantową radioterapię w raku odbytnicy.
- Zidentyfikowanie zaburzonych procesów metabolicznych i sygnałowych w przebiegu choroby nowotworowej i w odpowiedzi na leczenie promieniami.
- Wykazanie, że integracja danych metabolomicznych i proteomicznych prezentuje nowoczesne spojrzenie na analizę globalnej odpowiedzi na leczenie nowotworu z poziomu biologii systemów.

Badania z zakresu wykorzystania podejść multi-omicznych opartych o techniki spektrometrii mas nadal są przeze mnie kontynuowane w ramach projektu NCN SONATA pt. „Identyfikacja biocząsteczek uwalnianych przez komórki raka jelita grubego i wykrywanych w surowicy krwi lub/i egzosomach”. W projekcie poszukuję składników molekularnych charakterystycznych dla komórek raka jelita grubego, które mogą być uwalniane i transportowane do innych komórek i tkanek poprzez egzosomy, co jest związane z mechanizmem inwazyjności i przerzutowania tego nowotworu. Obecność w krwi egzosomów uwalnianych przez komórki nowotworowe, tj.

egzosomów posiadających znaczniki charakterystyczne dla tych komórek, mogłaby być w przyszłości wykorzystana jako podstawa do poszukiwania biomarkerów raka jelita grubego w płynnej biopsji. Ponadto, w dalszej kolejności zamierzam rozwijać badania nad prognostyczną rolą egzosomów w raku jelita grubego i szczegółowo określić ich związek z funkcjami immunomodulującymi, ryzykiem przerzutów (w szczególności do regionalnych węzłów chłonnych) i skutecznością neoadjuwantowej radioterapii.

4.3.5. Literatura

1. Dolens EDS, Dourado MR, Almangush A, et al. The Impact of Histopathological Features on the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2021;11:784924. doi:10.3389/fonc.2021.784924.
2. Mehta S, Shelling A, Muthukaruppan A, et al. Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Ther Adv Med Oncol.* 2010;2(2):125-148. doi:10.1177/1758834009360519.
3. El-Sahli S, Wang L. Cancer Stem Cell-Associated Pathways in the Metabolic Reprogramming of Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9125. doi: 10.3390/ijms21239125.
4. Fernández LP, Gómez de Cedrón M, Ramírez de Molina A. Alterations of Lipid Metabolism in Cancer: Implications in Prognosis and Treatment. *Front Oncol.* 2020;10:577420. doi:10.3389/fonc.2020.577420.
5. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science.* 2020;367(6478):eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
6. Whiteside TL. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(10):1293-310. doi: 10.1586/14737159.2015.1071666.
7. de Anda-Jáuregui G, Hernández-Lemus E. Computational Oncology in the Multi-Omics Era: State of the Art. *Front Oncol.* 2020;10:423. doi: 10.3389/fonc.2020.00423.
8. Klopffleisch R, Weiss AT, Gruber AD. Excavation of a buried treasure--DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol Histopathol.* 2011;26(6):797-810. doi: 10.14670/HH-26.797.
9. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, et al. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* 1985;33(8):845-53. doi: 10.1177/33.8.3894502.
10. Tanca A, Pagnozzi D, Addis MF. Setting proteins free: progresses and achievements in proteomics of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics Clin Appl.* 2012;6(1-2):7-21. doi: 10.1002/prca.201100044.
11. Geoui T, Urlaub H, Plessmann U, et al. Extraction of proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using the Qproteome extraction technique and preparation of tryptic peptides for liquid chromatography/mass spectrometry analysis. *Curr Protoc Mol Biol.* 2010;Chapter 10:Unit 10.27.1-12. doi: 10.1002/0471142727.mb1027s90.
12. Wiśniewski JR, Duś K, Mann M. Proteomic workflow for analysis of archival formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples to a depth of 10 000 proteins. *Proteomics Clin Appl.* 2013;7(3-4):225-33. doi: 10.1002/prca.201200046.
13. Wiśniewski JR, Gaugaz FZ. Fast and sensitive total protein and Peptide assays for proteomic analysis. *Anal Chem.* 2015;87(8):4110-6. doi: 10.1021/ac504689z.
14. Kelly AD, Breitkopf SB, Yuan M, et al. Metabolomic profiling from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using targeted LC/MS/MS: application in sarcoma. *PLoS One.* 2011;6(10):e25357. doi: 10.1371/journal.pone.0025357.
15. Richter S, Peitzsch M, Rapizzi E, et al. Krebs cycle metabolite profiling for identification and stratification of pheochromocytomas/paragangliomas due to succinate dehydrogenase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(10):3903-11. doi: 10.1210/jc.2014-2151.
16. Yuan M., Breitkopf S., Yang X. et al. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc.* 2012; 7(5):872-81. doi: 10.1038/nprot.2012.024.
17. Sahn F, Capper D, Pusch S, et al. Detection of 2-hydroxyglutarate in formalin-fixed paraffin-embedded glioma specimens by gas chromatography/mass spectrometry. *Brain Pathol.* 2012;22(1):26-31. doi: 10.1111/j.1750-3639.2011.00506.x.

18. Denkert C, Budczies J, Kind T, et al. Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Res.* 2006;66(22):10795-804. doi: 10.1158/0008-5472.
19. Salabè GB. Pathogenesis of thyroid nodules: histological classification? *Biomed Pharmacother.* 2001;55(1):39-53. doi: 10.1016/s0753-3322(00)00010-x.
20. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, et al. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol.* 2013;965212. doi: 10.1155/2013/965212.
21. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14. doi: 10.1126/science.123.3191.309.
22. Fernandis AZ, Wenk MR. Lipid-based biomarkers for cancer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(26):2830-5. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.06.015.
23. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):431-40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1059.
24. Bae YJ, Schaab M, Kratzsch J. Calcitonin as Biomarker for the Medullary Thyroid Carcinoma. *Recent Results Cancer Res.* 2015;204:117-37. doi: 10.1007/978-3-319-22542-5_5.
25. Trimboli P, Giovanella L. Serum calcitonin negative medullary thyroid carcinoma: a systematic review of the literature. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(10):1507-14. doi: 10.1515/cclm-2015-0058.
26. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-867. doi:10.1038/nature01322.
27. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem.* 1997;69(23):4751-60. doi: 10.1021/ac970888i.
28. Schwamborn K, Caprioli RM. Molecular imaging by mass spectrometry--looking beyond classical histology. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(9):639-46. doi: 10.1038/nrc2917.
29. Seeley EH, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives. *Trends Biotechnol.* 2011;29(3):136-43. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.12.002.
30. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, et al. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer.* 2019;18(1):75. doi: 10.1186/s12943-019-0991-5.
31. Smolarz M, Pietrowska M, Matysiak N, et al. P. Proteome Profiling of Exosomes Purified from a Small Amount of Human Serum: The Problem of Co-Purified Serum Components. *Proteomes.* 2019;7(2):18. doi: 10.3390/proteomes7020018.
32. Ludwig N, Hong CS, Ludwig S, et al. Isolation and Analysis of Tumor-Derived Exosomes. *Curr Protoc Immunol.* 2019;127(1):e91. doi: 10.1002/cpim.91.
33. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
34. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology.* 2016;91(1):13-23. doi: 10.1159/000446117.
35. Baskar R, Lee KA, Yeo R, et al. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012;9(3):193-9. doi: 10.7150/ijms.3635.
36. Tiziani S, Lopes V, Günther UL. Early stage diagnosis of oral cancer using ¹H NMR-based metabolomics. *Neoplasia.* 2009;11(3):269-76, 4p following 269. doi: 10.1593/neo.81396.
37. Boguszewicz Ł, Bieleń A, Mrochem-Kwarciak J, et al. NMR-based metabolomics in real-time monitoring of treatment induced toxicity and cachexia in head and neck cancer: a method for early detection of high risk patients. *Metabolomics.* 2019;15(8):110. doi: 10.1007/s11306-019-1576-4.
38. Jelonek K, Pietrowska M, Widlak P. Systemic effects of ionizing radiation at the proteome and metabolome levels in the blood of cancer patients treated with radiotherapy: the influence of inflammation and radiation toxicity. *Int J Radiat Biol.* 2017;93(7):683-696. doi: 10.1080/09553002.2017.1304590.
39. Abramowicz A, Wojakowska A, Marczak L, et al. Ionizing radiation affects the composition of the proteome of extracellular vesicles released by head-and-neck cancer cells in vitro. *J Radiat Res.* 2019;60(3):289-297. doi: 10.1093/jrr/rrz001.
40. Abramowicz A, Łabaj W, Mika J, et al. MicroRNA Profile of Exosomes and Parental Cells is Differently Affected by Ionizing Radiation. *Radiat Res.* 2020;194(2):133-142. doi: 10.1667/RADE-20-00007.

41. Jella KK, Rani S, O'Driscoll L, et al. Exosomes are involved in mediating radiation induced bystander signaling in human keratinocyte cells. *Radiat Res.* 2014;181(2):138-45. doi: 10.1667/RR13337.1.
42. Millan M, Merino S, Caro A, et al. Treatment of colorectal cancer in the elderly. *World J Gastrointest Oncol.* 2015;7(10):204-220. doi:10.4251/wjgo.v7.i10.204.
43. Roeder F, Meldolesi E, Gerum S, et al. Recent advances in (chemo-)radiation therapy for rectal cancer: a comprehensive review. *Radiat Oncol.* 2020;15(1):262. doi: 10.1186/s13014-020-01695-0.
44. Ni J, Bucci J, Malouf D, et al. Exosomes in Cancer Radioresistance. *Front Oncol.* 2019;9:869. doi:10.3389/fonc.2019.00869.
45. Tang L, Wei F, Wu Y, et al. Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):87. doi:10.1186/s13046-018-0758-7.
46. Fang J, Zhou SH, Fan J, et al. Roles of glucose transporter-1 and the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in cancer radioresistance (review). *Mol Med Rep.* 2015;11(3):1573-81. doi: 10.3892/mmr.2014.2888.
47. Lafitte M, Lecointre C, Roche S. Roles of exosomes in metastatic colorectal cancer. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019;317(5):C869-C880. doi: 10.1152/ajpcell.00218.2019.
48. Sanjurjo L, Aran G, Téllez É, et al. CD5L Promotes M2 Macrophage Polarization through Autophagy-Mediated Upregulation of ID3. *Front Immunol.* 2018;9:480. doi: 10.3389/fimmu.2018.00480.
49. Lacombe J, Azria D, Mange A, et al. Proteomic approaches to identify biomarkers predictive of radiotherapy outcomes. *Expert Rev Proteomics.* 2013;10(1):33-42. doi: 10.1586/epr.12.68.
50. Heeran AB, Berrigan HP, Buckley CE, et al. Radiation-induced Bystander Effect (RIBE) alters mitochondrial metabolism using a human rectal cancer ex vivo explant model. *Transl Oncol.* 2021;14(1):100882. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100882.
51. Ytting H, Christensen IJ, Thiel S, et al. Serum mannan-binding lectin-associated serine protease 2 levels in colorectal cancer: relation to recurrence and mortality. *Clin Cancer Res.* 2005;11(4):1441-6. doi: 10.1158/1078-0432.
52. Żmigrodzka M, Witkowska-Piłaszewicz O, Winnicka A. Platelets Extracellular Vesicles as Regulators of Cancer Progression-An Updated Perspective. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5195. doi:10.3390/ijms21155195.
53. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):123-34. doi: 10.1038/nrc3004.
54. Laiakis EC, Mak TD, Anizan S, et al. Development of a metabolomic radiation signature in urine from patients undergoing total body irradiation. *Radiat Res.* 2014;181(4):350-61. doi: 10.1667/RR13567.1.
55. Butler LM, Perone Y, Dehairs J, et al. Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;159:245-293. doi: 10.1016/j.addr.2020.07.013.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH - Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.

Nurtem przewodnim prowadzonych przeze mnie prac badawczych jest wykorzystanie technik spektrometrii mas w badaniach z zakresu nauk biochemicznych i biomedycznych. Prowadzę badania z wykorzystaniem narzędzi proteomiki, metabolomiki i lipidomiki, w celu poznania złożonych zależności na poziomie molekularnym i komórkowym, będących przedmiotem zainteresowania biologii systemów. Istotną część moich badań stanowi opracowanie i optymalizacja metodyki prowadzenia analiz z wykorzystaniem technik spektrometrii mas (m.in. LC-MS/MS, GC-MS, MALDI-MSI) na różnorodnym materiale biologicznym (tkanki roślinne, surowica, osocze, egzozomy tkanki ludzkie, tkanki zwierzęce, materiał retrospektywny). Szeroki warsztat analityczny pozwala mi realizować projekty badawcze z pogranicza biologii, chemii i medycyny.

Poniżej przedstawiam listę współprac naukowych z grupami badawczymi z kraju i świata, które zakończyły się powstaniem publikacji naukowych (ich liczba podana jest w nawiasie) wraz z ich bliższym omówieniem w kolejnych podrozdziałach:

- 2020-2022: dr hab. Justyna Gołębiewska, Gdański Uniwersytet Medyczny (1);
- 2017-2022: dr Marcin Zeman, Narodowy Instytut Onkologii, Oddział w Gliwicach (1);
- 2017-2020: dr hab. Dorota Tarnawska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (1);
- 2015-2022: Zespół dr Arkadiusza Liśkiewicza, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach oraz Zespół dr Marty Nowackiej-Chmielewskiej, Akademia Wychowania Fizycznego w Katowicach (5);
- 2015-2019: Zespół prof. dr hab. Joanny Polańskiej, Politechnika Śląska w Gliwicach (7);
- 2014-2022: dr Krzysztof Polański, *Wellcome Sanger Institute*, Cambridge, **Wielka Brytania** (7);
- 2014-2018: Zespół prof. Malcolm Clench, *Biomedical Research Centre Sheffield Hallam University*, **Wielka Brytania** (1);
- 2013-2022: dr Mykola Chekan, Narodowy Instytut Onkologii, Oddział w Gliwicach (6);
- 2013-2022: Zespół prof. dr hab. Piotra Wiślaka i dr hab. Moniki Pietrowskiej, Narodowy Instytut Onkologii, Oddział w Gliwicach (20);
- 2013-2015: dr Magdalena Grajzer, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu (2);
- 2012-2014: dr Wojciech Ostrowski, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (1);
- 2012-2013: dr Agnieszka Szuba, Instytut Dendrologii PAN w Kórniku (1);
- 2012-2013: Zespół prof. dr hab. Cezarego Mądrzaka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (1);
- 2011-2015: Zespół prof. dr hab. Michała Jasińskiego, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (3);
- 2010-2013: Zespół dr Juana Francisco Zamora-Natera, Uniwersytet w Guadalajarze, **Meksyk** (2);
- 2009-2015: Zespół prof. dr hab. Piotra Kachlickiego, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznaniu (5).

5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora

Podczas realizacji pracy doktorskiej w Zakładzie Biochemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem prof. Macieja Stobieckiego, prowadziłam badania z zakresu wykorzystania technik spektrometrii mas do profilowania i analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych w materiale roślinnym. W ramach uzyskanego projektu badawczego NCN PRELUDIUM opracowałam metodykę prowadzenia eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją, pozwalającą na uzyskanie informacji strukturalnych na temat badanych związków fenolowych. Zoptymalizowane podejście metodyczne prowadzenia eksperymentów MS/MS, wykorzystywałam w badaniach nad rolą, jaką pełnią fenolowe metabolity wtórne podczas infekcji łubinu patogennym grzybem *C.lupini* (projekt badawczy MNiSW – główny wykonawca). Udowodniłam, że roślinne mechanizmy obronne przejawiają się w poziomie syntezy i akumulacji fenolowych metabolitów wtórnych oraz ekspresji genów szlaku ich biosyntezy. Wykazałam ponadto udział prenylacji oraz acylacji kwasem malonowym izoflawonów oraz ich pochodnych w procesach związanych z patogenezą [Wojakowska i wsp. *Metabolomics*. 2013;9(3):575-589]. Równocześnie prowadziłam badania z zakresu analizy strukturalnej i profilowania fenolowych metabolitów wtórnych w ekstraktach

tkankowych z niebadanego dotychczas materiału roślinnego, w tym różnych gatunków łubinu [Wojakowska i wsp. *Phytochemistry*. 2013;92:71-86], tkankach korzeniowych oraz zawiesinowych kulturach komórkowych modelowej rośliny *Medicago truncatula* [Staszko i wsp. *Metabolomics*. 2011;7(4):604-613] a także liściach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) [Wojakowska i wsp. *Journal of Mass Spectrometry*. 2013;48(3):329-39]. Przy użyciu opracowanych metod analizy MS² i ISCID (dysocjacja indukowana w źródle) zidentyfikowałam blisko 200 pochodnych flawonoidów. Uzyskane widma masowe wybranych związków przekazałam do międzynarodowej bazy wysokorozdzielczych widm masowych MassBank (<http://msbi.ipb-halle.de/MassBank/>). Ponadto, wybrane widma masowe zostały wprowadzone do utworzonej przeze mnie biblioteki widm masowych w programie Bruker Library Editor (Bruker) i zostały udostępnione zainteresowanym użytkownikom systemów masowych LC/ESI-Qq-ToF firmy Bruker (w Polsce i na świecie).

Wyniki realizowanych przeze mnie badań w ramach pracy doktorskiej, prezentowałam w formie referatów i prezentacji plakatowych na kilkunastu konferencjach naukowych o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym. Moja praca w dziedzinie metabolomiki roślinnej została doceniona przez *The Samuel Roberts Noble Foundation* i wyróżniona pierwszą nagrodą za najlepszą prezentację plakatową podczas konferencji Międzynarodowego Towarzystwa Metabolomicznego „Metabolomics 2012”, odbywającej się w Waszyngtonie. Ponadto, z uwagi na charakter prowadzonych badań wyróżniona rozprawa doktorska została uznana za strategiczną z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski, wynikiem czego stałam się stypendystką Projektu Stypendialnego Wojewódzkiego Urzędu Pracy w latach 2011/2012. Poza prowadzeniem badań własnych, swój warsztat badawczy wykorzystywałam również we współpracy z innymi grupami badawczymi, w tym m.in. zespołem prof. Michała Jasińskiego w pracy nad rolą transporterów ABCG w modulacji poziomu izoflawonów podczas odpowiedzi obronnej *M.truncatula* [Banasiak i wsp. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(4):1005-15] oraz dr Agnieszką Szubą w badaniach metabolomicznych nad wpływem ektomikoryz na tolerancję topoli na ołów, gdzie pełniłam rolę wykonawcy w granicie NCN SONATA [Szuba i wsp. *Electrophoresis*. 2013;34:3234-3243]. Potwierdzeniem wysokiej jakości prowadzonych przeze mnie badań z zakresu metabolomiki fenolowych metabolitów wtórnych są publikacje naukowe w uznanych międzynarodowych czasopismach z listy JCR o łącznym IF=22,706 i liczbie cytowań 230, które ukazały się w latach 2010-2013.

5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora

5.2.1. Metabolomika roślinnych związków fenolowych

Po obronie doktoratu na początku 2013 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki ICHB PAN, gdzie kontynuowałam prace z zakresu metabolomiki roślinnej. W ramach kontynuacji realizowanych badań nad rolą izoflawonoidów w procesach patogenezy łubinu wywołanej grzybem *C.lupini*, powodującym antraknozę, kontynuowałam współpracę z zespołami badawczymi prof. Piotra Kachlickiego z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu oraz prof. Cezarego Mądrzaka z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Hodowla roślin prowadzona była w ramach współpracy z HR Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR – Oddział Przebędowo. Korelacja danych dotyczących profili izoflawonoidów, pełniących rolę związków antybiotycznych, z informacjami na temat zachorowalności roślin na infekcje grzybowe pozwoliły na wskazanie odmian łubinów o podwyższonej odporności na

antraknozę, co stanowi podstawową wskazówkę podczas prowadzenia hodowli odpornościowej nowych odmian [Wojakowska i wsp. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015;37(8):152]. Podjęłam również kolejną współpracę z dr Magdaleną Grajzer z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, która dotyczyła analizy kwasów fenolowych i ich pochodnych w ekstraktach z olejów roślinnych tłoczonych na zimno [Grajzer i wsp. *Food Chemistry*. 2015;188:459-66], na potrzeby której opracowałam dedykowane podejście metodyczne prowadzenia eksperymentów z kolizyjnie indukowaną dysocjacją w układzie LC/ESI/MS [Ostrowski i wsp. *Journal of Chromatography B*. 2014;967:21-7]. Podsumowując wiedzę i zdobyte doświadczenie, zarówno w zakresie wykorzystania układów LC-MS do analizy strukturalnej pochodnych flawonoidów [Stobiecki i wsp. *Phytochemistry Letters*. 2015;11:358-367], jak i w badaniach zmian metabolomicznych w odpowiedzi rośliny na stres [Rodziewicz i wsp. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2014; 36(1):1-19], zostałam współautorką dwóch prac przeglądowych, które zakończyły moją przygodę z metabolomiką roślinną. Prace dotyczące metabolomiki roślinnych związków fenolowych prowadzone po doktoracie, ukazały się w latach 2013-2015 w uznanych czasopismach z listy JCR o łącznym IF=10,643 i liczbie cytowań 223.

5.2.2. Metabolomika i proteomika nowotworów, z uwzględnieniem udziału egzosomów

Z końcem 2013 roku rozpoczęłam staż podoktorski w Narodowym Instytucie Onkologii Oddział w Gliwicach, gdzie poza realizacją własnego projektu NCN FUGA, uczestniczyłam w badaniach multi-omicznych nad innego typu nowotworami, w tym m.in. prostaty [Pietrowska i wsp. *Proteomes*. 2015;3(3):117-131], regionu głowy i szyi [Jelonek i wsp. *Acta Biochimica Polonica*. 2015;62(2):265-72], żołądka [Abramowicz i wsp. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13:304], piersi [Walaszczyk i wsp. *Protein And Peptide Letters*. 2017;24(1):37-45] oraz płuc [Roś-Mazurczyk i wsp. *Acta Biochimica Polonica*. 2017;64(3):513-518]. Warsztat badawczy, który w dalszym ciągu rozwijałam i poszerzałam o nowe techniki stosowane w metabolomice (głównie oparte o GC-MS) oraz proteomice (oparte o LC-MS/MS z analizatorem typu Orbitrap), wykorzystywałam do analiz różnego typu materiału, w tym próbek klinicznych (surowica oraz tkanki nowotworowe), a także komórek z hodowli *in vitro* oraz egzosomów. Specjalistyczna wiedza analityczna z zakresu wykorzystania technik MS w badaniach metabolitów i białek, oraz nowe doświadczenia zdobywane w obszarze biologii klinicznej, w tym dotyczące roli egzosomów w procesach związanych z chorobą nowotworową, pozwoliły mi pełnić wspierającą rolę w indywidualnych projektach kolegów z zespołu dr hab. Moniki Pietrowskiej oraz prof. Piotra Widłaka, w którym miałam przyjemność pracować. Poza realizacją badań własnych, włączyłam się w prace Zespołu dotyczące m.in. wpływu promieniowania jonizującego na skład metabolomu [Roś-Mazurczyk i wsp. *Acta Biochimica Polonica*. 2017;64(1):189-193] i proteomu surowicy pacjentów nowotworowych [Widlak i wsp. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2015;92(5):1108-1115]. Ponadto, miałam istotny udział w pracach optymalizacyjnych dotyczących analizy proteomicznej egzosomów, izolowanych z hodowli komórkowych raka regionu głowy i szyi [Abramowicz i wsp. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205496] oraz badaniu zmian proteomu egzosomów wywołanych promieniowaniem [Abramowicz i wsp. *Journal of Radiation Research*. 2019;60(3):289-297]. Na tym etapie mojej kariery naukowej zainteresowałam się również udziałem metabolitów przenoszonych przez egzosomy oraz ich rolą w procesie rozwoju nowotworu. Kończąc moją przygodę z NIO w Gliwicach i jednocześnie rozpoczynając kolejny etap mojej drogi naukowej po powrocie do ICHB z nowym projektem NCN SONATA, zostałam

współautorką dwóch prac przeglądowych dotyczących względnie słabo poznanej metabolomiki egzosomów oraz ich udziału w procesach związanych z nowotworzeniem [Włosowicz i wsp. *Na pograniczu Chemii i Biologii*. 2017;XXXVII:177-188 oraz Żebrowska i wsp. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(14):346].

Staż podoktorski w NIO był niewątpliwie punktem zwrotnym w mojej karierze naukowej. Zaowocował współautorstwem w kilkunastu artykułach z zakresu wykorzystania spektrometrii mas w badaniach biomedycznych, opublikowanych w latach 2015-2019, których łączny IF (nie wliczając prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego) wynosi 22,132 a liczba cytowań 186. Brałam aktywny udział w licznych konferencjach i zjazdach naukowych, w ramach których byłam współautorką kilkudziesięciu doniesień konferencyjnych. W trakcie stażu w NIO odbyłam również inne krótkoterminowe wyjazdy naukowe m.in. do *Biomedical Research Centre Sheffield Hallam University* w Anglii (w ramach grantu STSM COST), *Max-Planck-Institute for Biochemistry* w Niemczech (w ramach konsultacji naukowych nowatorskiej techniki MED-FASP) oraz Europejskiego Centrum Bioinformatyki i Genomiki w Poznaniu, gdzie obecnie pracuję. Istotnym dla mnie efektem stażu odbytego w NIO było nawiązanie życzliwej, owocnej i trwałej współpracy ze znakomitymi naukowcami, specjalizującymi się w biologii egzosomów, proteomice klinicznej oraz radio-onko-biologii, dr hab. Moniką Pietrowską i prof. Piotrem Widłakiem. Wśród grona lekarzy, naukowców i specjalistów, z którymi nadal współpracuję w realizowanych projektach badawczych z pogranicza chemii, biologii, medycyny i bioinformatyki, chcę podkreślić istotny udział dr Krzysztofa Polańskiego z *Wellcome Sanger Institute*, Cambridge w Anglii, specjalizującego się w analizach statystycznych i wielkoskalowych analizach obliczeniowych. Dzięki otwartej współpracy z osobami różnych specjalności miałam i nadal mam możliwość owocnego realizowania złożonych projektów z zakresu biologii systemów.

5.2.3. Metabolomika i proteomika w badaniach na modelu zwierzęcym

Kolejny projekt, który wspierałam od strony kompleksowych analiz metabolomicznych, opartych o techniki spektrometrii mas (GC-MS i LC-MS), dotyczył badania mechanizmów działania diety ketogenicznej (KD) w szczurzym modelu stwardnienia guzowatego. Badania metabolomiczne związane ze stosowaniem KD, realizowane we współpracy z dr Arkadiuszem Liśkiewiczem ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, rozpoczęłam w trakcie trwania stażu w NIO, a następnie kontynuowałam przez kolejne lata po powrocie do ICHB. W wyniku pierwszych wspólnych prac badawczych na szczurzym modelu stwardnienia guzowatego wykazaliśmy, że długotrwała wysokotłuszczowa dieta ketogeniczna sprzyja wzrostowi guzów nerek zależnych od mTOR i MAPK [Liśkiewicz A. i wsp. *Scientific Reports*. 2016;6:21807]. W kolejnej pracy badaliśmy wpływ KD na autofagię wątroby w modelu mysim. Wykazaliśmy, że podwyższona na skutek KD autofagia wątroby zależy od składu stosowanej diety, ze szczególnym wpływem składu kwasów tłuszczowych stosowanych karm ketogenicznych [Liśkiewicz D. i wsp. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2021;93:108620]. Mój udział w powstaniu powyższych prac polegał na optymalizacji metody ekstrakcji metabolitów z tkanek zwierzęcych (nerka szczurza, mysia wątroba) oraz pasz ketogenicznych (głównie kwasów tłuszczowych), przygotowaniu prób, analizie w układzie GC-MS oraz analizie uzyskanych danych metabolomicznych.

W kolejnym projekcie podjętym we współpracy z dr Liśkiewiczem badaliśmy wpływ aktywności fizycznej na funkcje mózgu w modelu dobrowolnego biegania u myszy [Liśkiewicz A i wsp. *Molecular Brain*. 2020;13(1):62]. Badania dotyczyły zmian w profilach metabolomicznych hipokamu i kory czołowej pod wpływem wysiłku fizycznego, ze szczególnym uwzględnieniem udziału kwasów tłuszczowych. Przeprowadzone przeze mnie profilowanie metabolomiczne badanych struktur mózgu myszy poddanych wysiłkowi fizycznemu, wykazało istotne zmiany w składzie metabolitów hipokampu i kory czołowej związanych z przemianami energetycznymi. Szczególnie istotne zmiany dotyczyły profili kwasów tłuszczowych, które były związane ze zmniejszonym poziomem lęku u biegających myszy.

Efektom mojego udziału w badaniach metabolomicznych prowadzonych na modelu zwierzęcym, było podjęcie kolejnej współpracy z zespołem dr Marty Nowackiej-Chmielewskiej z Akademii Wychowania Fizycznego w Katowicach. Badania realizowane we współpracy dotyczyły wpływu aktywności fizycznej na zmiany mózgowego metabolizmu i transportu glukozy indukowane dietą zachodnią lub przewlekłym stresem u samic szczurów. Mój udział w tych badaniach polegał na przeprowadzeniu analiz proteomicznych tkanek mózgu szczurów poddawanych aktywności fizycznej, ekspozycji na dietę zachodnią oraz przewlekłemu stresowi. Efektom podjętej współpracy było współautorstwo w dwóch publikacjach zespołu dr Nowackiej-Chmielewskiej [Nowacka-Chmielewska M. i wsp. *Nutritional Neuroscience*. 2020;1-14 oraz Nowacka-Chmielewska M. i wsp. *Nutrients*. 2021, 13, 4242.].

Współpraca z zespołami naukowców z SUM i AWF w Katowicach, prowadzona w obszarze metabolomiki oraz proteomiki na modelu zwierzęcym, rozpoczęła się jeszcze podczas mojego pobytu na stażu podoktorskim w Gliwicach i nadal jest kontynuowana. W ramach dotychczasowych wspólnych badań prowadzonych w latach 2016-2021 ukazało się 6 publikacji w czasopismach z listy JCR o łącznym IF=10,643 i liczbie cytowań 41.

5.2.4. Zmiany metabolomiczne w patologii rogówki

Molekularna etiologia stożka rogówki (KC-keratoconus), który jest patologicznym stanem ludzkiej rogówki, pozostaje niejasna. W pilotażowym badaniu profili metabolomicznych, przeprowadzonym w oparciu o technikę GC-MS, wykazałam różnice w składzie metabolitów między stożkiem rogówki a rogówką prawidłową [Wojakowska i wsp. *Molecules*. 2020;25(12):2933]. Szlaki metaboliczne związane ze związkami różnicującymi były zaangażowane w produkcję energii, metabolizm lipidów i aminokwasów. Uzyskane sygnatury metabolomiczne wskazują na istotny udział stresu oksydacyjnego oraz procesów zapalnych w rozwój badanej patologii rogówki, które to obserwacje są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi procesów komórkowych zaangażowanych w rozwój KC. Praca realizowana we współpracy z prof. dr hab. Dorotą Tarnawską, okulistką specjalizującą się w chorobach rogówki, jest pierwszym zastosowaniem profilowania metabolomicznego opartego na GC-MS, które wykazało różnice w składzie metabolitów między stożkiem rogówki a rogówką prawidłową. Z uwagi na unikalny oraz trudny do analizy materiał uzyskane wyniki są tym bardziej cenne. Konieczne jest jednak kontynuowanie badań w tym obszarze, w celu uzyskania pełnego obrazu zmian metabolicznych odgrywających kluczową rolę w etiopatologii stożka rogówki.

5.2.5. Udział egzosomów w mechanizmie odrzucania przeszczepów

Poza znanymi funkcjami jakie egzosomy pełnią w procesach związanych

z nowotworzeniem, mogą również odgrywać rolę immunomodulacyjną w procesach komórkowych związanych z mechanizmem odrzucania przeszczepionych narządów. Wpływ egzosomów na rozwój odrzucenia lub tolerancji przeszczepionego narządu oraz próby wykorzystania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako nieinwazyjnej metody monitorowania stanu narządu po przeszczepieniu i przewidywania ryzyka odrzucenia, zostały opisane w pracy przeglądowej Gołębiowska i wsp. [Cells. 2021;10:2989], której jestem współautorem. Niedawno rozpoczęta współpraca z dr hab. Justyną Gołębiowską z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, zaowocowała również złożeniem wspólnego wniosku grantowego NCN OPUS 22 (w którym występuję jako kierownik konsorcjant z ramienia ICHB), który obecnie znajduje się w drugim etapie oceny merytorycznej. Wraz z dr hab. Justyną Gołębiowską (GUMed) oraz dr hab. Moniką Pietrowską (NIO PIB Gliwice) rozpoczęliśmy badania proteomiczne w kontekście poszukiwania mechanizmów odrzucania przeszczepionej nerki ze szczególnym uwzględnieniem udziału egzosomów w tym procesie. Możliwość oceny ilościowej poziomu składników swoistych dla egzosomów uwalnianych przez przeszczepiony narząd może w przyszłości posłużyć jako nieinwazyjna metoda monitorowania stanu narządu po przeszczepieniu i przewidywania ryzyka odrzucenia przeszczepu.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Opieka naukowa nad doktorantami, studentami i stażystami:

- **2019-2022:** mgr Urszula Strybel: III rok studium doktoranckiego przy ICHB PAN w Poznaniu.
Funkcja: Promotor pomocniczy/opiekun naukowy doktorantki, realizującej badania do rozprawy doktorskiej w ramach projektu NCN SONATA, którego jestem kierownikiem.
Opublikowane prace: Strybel U. i wsp. *Cancers*. 2022;14(4):99 (H7).
- **2021:** Igor Karasiński: III rok studiów licencjackich na kierunku Analityka Kryminalistyczna i Sądowa, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu.
Funkcja: Opieka naukowa podczas miesięcznego stażu realizowanego w ramach projektu „Kształcenie, kompetencje, komunikacja i konkurencyjność - cztery filary rozwoju Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu”.
- **2021:** Katarzyna Wilczyńska: III rok studiów licencjackich na kierunku Technologia Chemiczna, Politechnika Poznańska;
Funkcja: Opieka naukowa podczas 1,5-miesięcznych praktyk studenckich w Pracowni Spektrometrii Mas IChB PAN.
- **2018:** mgr Agata Włosowicz/Skowronek: III rok studiów doktoranckich, Narodowy Instytut Onkologii Państwowy Instytut Badawczy, oddział w Gliwicach.
Funkcja: Opieka naukowa podczas stażu w Pracowni Spektrometrii Mas IChB PAN.
Opublikowane prace: Wojakowska i wsp. *Journal of Personalized Medicine*. 2020;10(4):229 (H6).
- **2013:** mgr Magdalena Grajzer: II rok studiów doktoranckich, Wydział Farmaceutyczny UM,

Wrocław.

Funkcja: Opieka naukowa podczas stażu w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki IChB PAN.

Opublikowane prace: Ostrowski i wsp. *Journal of Chromatography B*. 2014;967:21-7 oraz Grajzer i wsp. *Food Chemistry*. 2015;188:459-66.

- **2013**: Wojciech Smulek: V rok studiów magisterskich na kierunku Inżynieria chemiczna i procesowa, Politechnika Poznańska.

Funkcja: Opieka naukowa podczas stażu w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki IChB PAN.

- **2013**: Marta Nolka: V rok studiów magisterskich na kierunku Chemia, UAM, Poznań.

Funkcja: Opieka naukowa podczas stażu w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki IChB PAN.

- **2013**: dr Marta Olech, mgr Marta Drozd, mgr Wioleta Pietrzak z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Funkcja: Opieka naukowa podczas stażu w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki IChB PAN.

- **2012**: mgr Wojciech Ostrowski: II rok studiów doktoranckich, Wydział Chemii UAM, Poznań.

Funkcja: Opieka naukowa podczas stażu w Pracowni Proteomiki i Metabolomiki IChB PAN.

Opublikowane prace: Ostrowski i wsp. *Journal of Chromatography B*. 2014;967:21-7.

6.2. Osiągnięcia organizacyjne oraz popularyzujące naukę

6.2.1. Kierowanie projektami badawczymi

- **04/2018-04/2023**: NCN SONATA nr 2017/26/D/NZ2/00964
Tytuł projektu: Identyfikacja biocząsteczek uwalnianych przez komórki raka jelita grubego i wykrywanych w surowicy krwi lub/i egzosomach.
Habilitantka pełni funkcję opiekuna naukowego/promotora pomocniczego doktorantki mgr Urszuli Strybel, realizującej badania do rozprawy doktorskiej w ramach grantu.
Opublikowane prace: H6 i H7.
- **11/2013-04/2018**: NCN FUGA nr 2013/08/S/NZ2/00868
Tytuł projektu: Wykorzystanie technik spektrometrii mas do profilowania i identyfikacji proteomicznych i metabolomicznych składników guza swoistych dla poszczególnych typów raka tarczycy.
Opublikowane prace: H1- H5
- **01-31/10/2014**: grant zagraniczny STSM COST nr BM1104-011014-046331
Tytuł projektu: Lipidomics in thyroid cancer research.
Opublikowane prace: H4.
- **05/2013-10/2013**: grant wewnętrzny IChB PAN na realizację zadania badawczego służącego rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich. Tytuł projektu: Zastosowanie techniki nanoLC-ESI-IT-MS do analizy fenolowych metabolitów wtórych obecnych w złożonych ekstraktach roślinnych.
Opublikowane prace: Wojakowska i wsp. *Journal of Mass Spectrometry*. 2013;48(3):329-39.
- **12/2011-06/2013**: **Kierownik** grantu NCN PRELUDIUM nr 2011/01/N/NZ2/00025
Tytuł projektu: Wykorzystanie technik tandemowej spektrometrii mas z kolizyjnie

indukowaną dysocjacją do profilowania i analizy strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych w wieloskładnikowych ekstraktach materiału roślinnego.

Opublikowane prace: Wojakowska A. i wsp. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015;37(8):152; Wojakowska A. i wsp. *Phytochemistry*. 2013;92: 71-86; Wojakowska A i wsp. *Metabolomics*. 2013;9(3):575-589; Wojakowska i wsp. *Journal of Mass Spectrometry*. 2013;48(3):329-39.

6.2.2. Członkostwo w komitetach organizacyjnych konferencji międzynarodowych

- Seminarium naukowe „Zastosowania proteomiki i metod analizy danych w badaniach biologicznych”, organizowane przez Polskie Towarzystwo Proteomiczne i Stowarzyszenie na Rzecz Wspierania Badań nad Rakiem, 4-5.06.2014, Gliwice.
- Joint Conference of Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society, 4-7.03.2012, Poznań.
- 2nd Conference of Polish Mass Spectrometry Society, 24-26.03.2010, Poznań.

6.2.3. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

- Polskie Towarzystwo Proteomiczne, Członek założyciel, Sekretarz w latach 2019-2022.
- International Society for Extracellular Vesicles, członek w latach 2020-2022.
- Metabolomics Society, członek od roku 2010.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.

Szczegółowe informacje związane z prowadzoną przez mnie aktywnością naukową, w tym:

- pełen wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (38), publikacji pokonferencyjnych (8), wykładów (11) i doniesień konferencyjnych (17 jako autor prezentujący i 19 jako współautor);
- informacje o udziale w projektach badawczych jako wykonawca (5);
- wykaz odbytych szkoleń i warsztatów kraju i zagranicą (11);
- informacje o recenzowanych pracach naukowych (13);
- informacje o uczestnictwie w programach europejskich (2);
- nagrody i wyróżnienia (5);

znajdują się w załączniku nr 6. Wykaz osiągnięć naukowych.

.....
(podpis wnioskodawcy)