PODPIS ZAUFANY
MAGDALENA
BUSZEWSKA-FORAJTA
17.05.2022 09:47:53 (GMT+2)
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Toruń, 10 m

Rada Naukowa Dyscypliny Nauki Medyczne,
Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn
za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Dr inż. Magdalena Buszewska-Forajta
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

Wniosek

z dnia **10.05.2022 roku**

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie **nauk medycznych i nauk o zdrowiu** w dyscyplinie[1] **nauki medyczne**.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego Magdaleny Buszewskiej-Forajta,

„Metabolomika - nowe narzędzie analityczne w poszukiwaniu deskryptorów molekularnych raka prostaty".

Wskazanie jednostki do przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego:

Rady Naukowa Dyscypliny nauki medyczne, Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn

Wnioskuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu ~~**tajnym**~~**/jawnym***[2]

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

---

[1] Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

[2] * Niepotrzebne skreślić.

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl , tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

.....
(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

1. Dane wnioskodawcy – załącznik nr 1
2. Autoreferat – załącznik nr 2
3. Wykaz osiągnięć -załącznik nr 3
4. Oświadczenia o wkładzie habilitantki w prace objęte osiągnięciem - załącznik nr 4
5. Oświadczenia o wkładzie współautorów w prace objęte osiągnięciem - załącznik nr 4
6. Kopia dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia doktora
7. Kopia potwierdzenia odbycia staży zagranicznych

PODPIS ZAUFANY
MAGDALENA
BUSZEWSKA-FORAJTA
17.05.2022 09:50:43 [GMT+2]
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

1. Dane naukowe wnioskodawcy.

Imię i nazwisko: **Magdalena Buszewska-Forajta**

ORCID: **0000-0003-1401-2558**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2015 **Doktor nauk farmaceutycznych** w dyscyplinie analizy farmaceutycznej; Rada Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;
dyscyplina: farmacja
specjalność: analiza farmaceutyczna
tytuł pracy doktorskiej: „*Identyfikacja składników odwłoka owadów z rodziny szarańczowatych w oparciu o przesłanki etnofarmakologiczne*".
promotor: prof. dr hab. Roman Kaliszan; rozprawa wyróżniona

2011-2015 **Studia doktoranckie**; Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny

2011 **Magister Inżynier** biotechnologii; Politechnika Gdańska; Wydział Chemii;
specjalność: Technologia, biotechnologia i analiza żywności,
tytuł pracy magisterskiej: „*Wpływ sposobu utrwalania oraz warunków przechowywania na zawartość substancji bioaktywnych w sokach z aronii i jagody kamczackiej*".
promotor dr Barbara Kusznierewicz

2006-2011 Jednolite studia magisterskie; kierunek Biotechnologia; Politechnika Gdańska; Wydział chemiczny; studia zakończone z oceną bardzo dobry

2014-2015 **Studia podyplomowe** Analytical Chemistry in Environmental Sciences, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział chemii.

2011 **Kurs "Zarządzanie projektami naukowymi",** STS Sauter Training and Simulation SA licence, Project Management, ukończony certyfikatem 20/2011/9655, Gdynia, Polska.

3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

V 2022- obecnie: **Adiunkt** naukowy, Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w ramach stanowiska **PostDoc** w projekcie BIO-GNET pt.:"Zaawansowane biokompozyty dla Gospodarki jutra BIO-GNET"; Projekt finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 (PO IR), Oś IV: Zwiększenie potencjału naukowo-badawczego, Działanie 4.4: Zwiększenie potencjału kadrowego sektora B+R, konkurs TEAM-NET

2021 -obecnie : **Adiunkt** naukowo – dydaktyczny; Instytut Medycyny Laboratoryjnej, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika

V- XII 2021 **Analityk**, Alpinus Chemia sp. z.o.o

VII 2017 - II 2021: **Adiunkt** naukowy; Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

VII 2016 - VI 2017: **Asystent** naukowy, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

IV 2016 - VI 2016: **specjalista**, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

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

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt.:

„Metabolomika - nowe narzędzie analityczne w poszukiwaniu deskryptorów molekularnych raka prostaty"

4.2 Wykaz opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Na cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, stanowiących osiągnięcie naukowe składa się **8 prac** opublikowanych w latach 2019 – 2022 w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR), w których jestem współautorem. We **wszystkich** pracach byłam pierwszym autorem, zaś w **5** pełniłam funkcję autora korespondencyjnego.

Wybrane i zestawione poniżej prace były niezależnie cytowane 27 razy (dane z dnia 23.04.2022 wg Scopus). Sumaryczny współczynnik oddziaływania jednotematycznego cyklu prac wynosi **30,811** (Impact Factor wg roku produkcji), zaś sumaryczna liczba punktów z listy czasopism MEiN z dnia 23.04.2022 roku wynosi **780** (Tabela 1).

Przedstawione prace obejmują zagadnienie wykorzystania metabolomiki w poszukiwaniu deskryptorów raka prostaty z wykorzystaniem łączonych technik analitycznych sprzężonych ze spektrometrią mas jak również zaawansowanych, wielkoskalowych metod bioinformatyczno chemometrycznych.

Opis merytorycznego i szacowanego procentowego wkładu pracy w publikacje będące częścią cyklu, zawarty jest w **Załączniku 4** do wniosku oraz w oświadczeniach, określających indywidualny wkład pracy każdego z współautorów w publikacjach **[H1-H8]** stanowią część **Załącznika 5** do wniosku.

* - *autor korespondencyjny*

[H1] **Buszewska-Forajta M,** Rafińska K, Buszewski B. Tissue sample preparations for preclinical research determined by molecular imaging mass spectrometry using matrix-

assisted laser desorption/ionization. J Sep Sci. 2022. doi: 10.1002/jssc.202100578. Impact Factor: 3.645; Punktacja MNiSW: 70.000

[H2] **Buszewska-Forajta M**, Patejko M, Macioszek Sz, Sigorski D, Iżycka-Świeszewska E, Markuszewski MJ. Paraffin-embedded tissue as a novel matrix in metabolomics study: optimization of metabolite extraction method. Chromatographia. 2019; 82;10: 1501-1513. Impact Factor: 1.596, Punktacja MNiSW: 40.000

[H3] **Buszewska-Forajta M***, Raczak-Gutknecht J, Artymowicz M, Wesołowski W, Buczkowski K, Iżycka-Świeszewska E, Markuszewski MJ. The potential role of fatty acids in prostate cancer determined by GC-MS analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. J Pharm Biomed Anal. 2021; 20;196:113907. Impact Factor: 3.209; Punktacja MNiSW: 100.000

[H4] **Buszewska-Forajta M**, Pomastowski P., Maślak E., Fijałkowski P., Buszewski B., Zastosowanie technik laserowej desorpcji/jonizacji w identyfikacji lipidów jako biomarkerów raka prostaty. Wiadomości Chemiczne. 2021; . 75; z. 7-8; 893-909. Punktacja MNiSW: 20.000

[H5] **Buszewska-Forajta M***, Pomastowski P, Monedeiro F, Walczak-Skierska J, Markuszewski M, Matuszewski M, Markuszewski MJ, Buszewski B. Lipidomics as a Diagnostic Tool for Prostate Cancer. Cancers (Basel). 2021; 21;13(9):2000. doi: 10.3390/cancers13092000. Impact Factor: 6.126; Punktacja MNiSW: 140.000

[H6] **Buszewska-Forajta M***, Pomastowski P, Monedeiro F, Król-Górniak A, Adamczyk P, Markuszewski MJ, Buszewski B. New approach in determination of urinary diagnostic markers for prostate cancer by MALDI-TOF/MS. Talanta. 20221;236:122843. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122843. Impact Factor: 6.057; Punktacja MNiSW: 100.000

[H7] **Buszewska-Forajta M***, Raczak-Gutknecht J, Struck-Lewicka W, Nizioł M, Artymowicz M, Markuszewski M, Kordalewska M, Matuszewski M, Markuszewski MJ. Untargeted Metabolomics Study of Three Matrices: Seminal Fluid, Urine, and Serum to Search the Potential Indicators of Prostate Cancer. Front Mol Biosci. 2022 Mar 4;9:849966. doi: 10.3389/fmolb.2022.849966 Impact Factor: 5.246; Punktacja MNiSW: 140.000

[H8] **Buszewska-Forajta M***, Monedeiro F, Gołębiowski A, Adamczyk P, Buszewski B. Citric Acid as a Potential Prostate Cancer Biomarker Determined in Various Biological Samples. Metabolites. 2022, 21;12 (3):268. doi: 10.3390/metabo12030268. Impact Factor: 4.932; Punktacja MNiSW: 140.000

Tabela 1 Cykl prac wchodzących w zakres osiągnięcia „Metabolomika - nowe narzędzie analityczne w poszukiwaniu deskryptorów molekularnych raka prostaty"

Lp.	Publikacja	IF*	Liczba punktów MEiN	Liczba cytowań wg Scopus
H1	J Sep Sci. 2022, 45: 1345-1361	3,645	70	0
H2	Chromatographia. 2019, 82: 1501-1513	1,596	40	7
H3	J Pharm Biomed Anal. 2021, 196:113907.	3,209	100	7
H4	Wiadomości Chemiczne. 2021, 75, 7-8; 893-909.		20	0
H5	Cancers. 2021, 21:13(9):2000.	6,126	140	12
H6	Talanta, 2022, 236:122843	6,057	100	2
H7	Front Mol Biosci. 2022, 4, 9 : 849966.	5,246	140	0
H8	Metabolites. 2022, 21, 12 :268.	4,932	140	0
	SUMA	**30,811**	**750**	**28**

*wg 2022 roku

4.3. Opis badań będących podstawą osiągnięcia naukowego

1. Wprowadzenie

1.1 Metabolomika

Metabolomika jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki, należącą do biologii systemowej. Obok, genomiki, transkryptomiki czy proteomiki stanowi cenne źródło informacji na temat procesów i przemian zachodzących w organizmie żywym. Przełomowym wydarzeniem w rozwoju terapii spersonalizowanej było odkrycie genomu ludzkiego. Wraz z rozwojem technologicznym, a co za tym idzie postępem naukowym wykazano, że wiedza dostarczana poprzez analizy genomiczne czy proteomiczne nie są wystarczające aby wytłumaczyć procesy zachodzące podczas rozwoju choroby. Zarówno genomika jak i transkryptomika umożliwia rozpoznanie informacji genetycznej, zaś proteomika ukierunkowana jest na oznaczaniu białkowych produktów biosyntezy prowadzonej w oparciu o informację genetyczną. Metabolomika zaś, jest selektywnym narzędziem badawczym, który umożliwia oznaczanie i identyfikacje małocząsteczkowych związków endogennych. Technika ta bazuje na założeniu, że każda choroba wywiera wpływ na wszystkie procesy biochemiczne, które zachodzą w organizmie żywym. Poprzez monitorowanie przebiegu poszczególnych szlaków biochemicznych jesteśmy w stanie zidentyfikować zmiany zachodzące na poziomie molekularnym [1-3]. Wykorzystanie zaawansowanych technik analitycznych, bazujących na metodach rozdzielania sprzężonych ze spektrometrią mas jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, ang. *high pressure liquid chromatography*), chromatografia gazowa (GC, ang. *gas chromatography*) czy jonizacji wspomaganej matrycą (MALDI, ang. *matrix assisted laser desorption and ionization*) sprzężoną ze spektrometrią mas możliwe jest oznaczenie i identyfikacja metabolitów na poziomie komórkowym. Niezaprzeczalnie jest to zaletą metabolomiki, w porównaniu do genomiki, transkryptomiki czy też proteomiki. Przewagą tej techniki nad innymi podejściami diagnostycznymi jest możliwość rozpoznania fenotypów pośrednich, czyli zmian w poziomach metabolitów. W istocie metabolomika definiowana jest jako kompleksowa analiza mająca na celu oznaczenie metabolitów w danej matrycy biologicznej, a co za tym idzie na monitorowaniu zmian profili metabolomicznych.

Metabolity są to endogenne substancje niskocząsteczkowe, których masa cząsteczkowa nie przekracza 1500 Da. Należą do nich lipidy, kwasy organiczne, węglowodany, aminokwasy, nukleotydy czy też sterydy [1]. Ze względu na zróżnicowane właściwości fizykochemiczne i biochemiczne, metabolity mogą pełnić wiele funkcji, od udziału w konwersji

energii poprzez funkcje sygnalizacyjne do roli kofaktora. Metabolity, jako produkty przemian na poziomie komórkowwym, mogą również wywoływać wpływ epigenetyczny [4,5].

Pełen panel tych związków nazywany jest metabolomem, którego profil jest dynamiczny i zależy od wielu czynników jak: wiek, płeć, styl życia czy stan zdrowia. Takie podejście zapewnia globalną odpowiedź metaboliczną na różne bodźce np.: modyfikacja genetyczna, progresja choroby, stosowana farmakoterapia czy dieta, a także inne czynniki środowiskowe. Rozwój danej jednostki chorobowej indukuje zmiany profili metabolicznych, które są bezpośrednio wykorzystywane do diagnozowania złożonych chorób, a także zaburzeń jednogenowych, takich jak wrodzone wady metabolizmu [1,6,7].

Pomimo licznych badań, niewiele metabolitów zostało uznanych jako istotne z punktu widzenia klinicznego i wprowadzone do codziennej diagnostyki. Przykładem może być pomiar glukozy do monitorowania przebiegu cukrzycy, acetonu jako specyficznego wskaźnika cukrzycy, czy też oznaczanie fenyloalaniny jako marker fenyloketonurii u noworodków [8]. Dlatego też metabolomika, wykorzystywana jest jako nowoczesne podejście szeroko stosowane do lepszego zrozumienia potencjalnych mechanizmów różnych chorób i stanów klinicznych [1,6,7]. Jej nieodzownym elementem, stanowiącym wyzwanie analityczne jest identyfikacja specyficznych związków chemicznych. Wymaga to nie tylko wysokiej staranności i powtarzalności uzyskanych wyników ale również zastosowania zaawansowanych metod obliczeniowych i chemometrycznych, które umożliwiają precyzyjną analizę setek, a nawet tysięcy metabolitów, a w konsekwencji szczegółową charakterystykę fenotypów metabolicznych. W praktyce metabolomika przyczynia się do rozpoznania podłoża rozwoju wielu zaburzeń metabolicznych leżących u podstaw patogenezy chorób człowieka, monitorowania efektu terapeutycznego czy odkrycia specyficznych wskaźników jednostki chorobowej (potencjalne biomarkery), które można wykorzystać do diagnozowania schorzenia.

1.2. Strategie badawcze stosowane w metabolomice

Ze względu na złożoność metabolomu, a w konsekwencji różnorodność we właściwościach fizykochemicznych metabolitów nie ma jednej, uniwersalnej metody pozwalającej na oznaczenie całego, złożonego spektrum związków w czasie jednej analizy. Niektóre związki cechują się wysoką polarnością, inne znikomą lotnością czy też brakiem grupy chromoforowej. Z tego względu analizy metabolomiczne przeprowadza się z wykorzystaniem kilku technik analitycznych, w taki sposób aby móc oznaczyć jak najpełniejszy metabolom.

Podstawą analiz metabolomicznych jest wykorzystanie zawansowanych technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas.

W metabolomice wykorzystuje się dwie główne strategie badawcze: celowana i niecelowana analiza metaboliczna. **Metabolomiczny odcisk palca** (*ang. metabolic fingerprint*), jest typem **niecelowanej analizy** i koncentruje się na oznaczaniu jak największej liczby metabolitów. Strategia ta wykorzystywana jest jako analiza poznawcza, która umożliwia uzyskanie globalnej informacji na temat analizowanych próbek. Jej celem jest rozpoznanie danego metabolomu i scharakteryzowanie procesów zachodzących wskutek ekspozycji na dany czynnik zewnętrzny-ekspozom (*ang. exposome*). Dlatego też, strategia ta umożliwia wyznaczanie nowych kierunków badań, jak również globalne rozpoznanie problemu. Wykorzystując analizę porównawczą profili próbek badanych do profili uzyskanych dla próbek kontrolnych, przyczynia się do wstępnej selekcji potencjalnych deskryptorów danej jednostki chorobowej. Z punktu widzenia analitycznego analizy przeprowadzane są w trybie pełnego skanowania (SCAN). Wyniki uzyskane za pomocą tej strategii badawczej muszą zostać zweryfikowane. Walidację przeprowadzić można z zastosowaniem celowanej analizy metabolicznej (w przypadku jednego metabolitu bądź panelu związków) lub profilowania metabolicznego, kiedy monitorowany jest cały szlak biochemiczny [8,9, H2, H3, H8]. W obrębie celowanej analizy metabolomicznej, wyróżnić należy również **metaboliczny odcisk stopy** *(ang. metabolic footprinting)*, który w swoich analizach ma na celu oznaczyć metabolity zewnątrzkomórkowe, produkowane i wydzielane do medium pohodowlanego. Celem tych analiz jest oznaczenie egzometabolomu specyficznego dla wyselekcjonowanego szczepu bakteryjnego.

Drugą strategią badawczą wykorzystywaną w metabolomice jest **celowana analiza metabolomiczna** (*ang. targetted metabolomic analysis*). Strategia ta ma na celu oznaczenie wyselekcjonowanego w pierwszym etapie metabolitu bądź panelu związków, o dużym znaczeniu klinicznym. Analiza opiera się na ilościowym bądź półilościowym oznaczaniu związków z wykorzystaniem różnych platform analitycznych o wysokiej czułości i selektywności. Podstawą analizy ilościowej jest oznaczanie związków w oparciu o krzywą kalibracyjną. Cechuje ją wysoka specyficzność i selektywność, co w praktyce przekłada się na możliwość oznaczeń bardzo niskich stężeń. Analizy przeprowadzane są również w ściśle określonym trybie tj. monitorowania pojedynczego, charakterystycznego dla danego związku jonu (SIM, *ang, single ion monitoring*) bądź też monitorowania reakcji wielokrotnych (*MRM, ang. multiple reaction monitoring*), które umożliwiają oznaczenie specyficznej dla danego związku pary jonów złożonej z jonu molekularnego i potomnego [10].

Alternatywę stanowi **profilowanie metabolomiczne** *(ang. metabolic profiling)*, które jest niejako połączeniem analizy celowanej jak i niecelowanej, gdyż często obejmuje zarówno analizę jakościową jak i ilościową. Profilowanie metabolomiczne ukierunkowane jest na oznaczanie panelu metabolitów należących do jednej klasy związków (aminokwasów, węglowodanów, kwasów tłuszczowych) czy też monitorowaniu konkretnego szlaku metabolomicznego (np. cyklu Crebsa) [11].

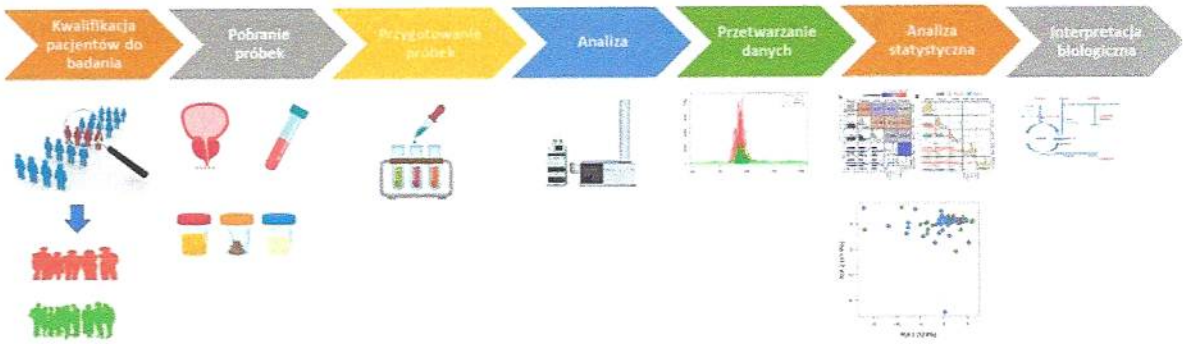
1.3. Metabolomika w rozpoznawaniu chorób

Jednym z głównych obszarów zastosowań metabolomiki jest poszukiwanie mechanizmów chorób nowotworowych czy cywilizacyjnych. Dzięki określeniu metabolomu oraz zmian zachodzących na poziomie komórkowym możliwe jest dostarczenie wiedzy na temat submolekularnego mechanizmu rozwoju danej jednostki chorobowej. Wymaga to współpracy specjalistów z kilku dziedzin nauki tj, klinicystów odpowiedzialnych za zakwalifikowanie pacjentów do badania i pobór materiału biologicznego, analityków, których zadaniem będzie opracowanie procedur przygotowania próbek oraz metod analitycznych umożliwiających weryfikację hipotezy analitycznej oraz biostatystyków- którzy wykorzystują narzędzia bioinformatyczne oraz analizę chemometryczną do wykrycia związków różnicujących badane grupy. Interdyscyplinarna analiza metabolomiczna obejmuje 3 moduły działań.

Pierwszy z nich to moduł kliniczny mający na celu przeprowadzenie wywiadu lekarskiego, opracowanie protokołu zakwalifikowania pacjentów do badania na bazie określonych kryteriów włączania i wyłączania, opracowanie protokołu pobierania i zabezpieczania materiału. **Drugim etapem** jest analiza metabolomiczna przeprowadzana przez specjalistów z zakresu chemii analitycznej. W etapie tym opracowywane są odpowiednie protokoły przygotowania próbki, opracowanie metod analitycznych dedykowanych hipotezie badawczej, a w finalnym etapie przeprowadzane jest oznaczanie i identyfikacja związków obecnych w analizowanej próbce. Uzyskane dane poddawane są procesowaniu obejmującemu wyrównanie danych, filtrowanie czy normalizację w celu uzyskania matrycy danych do przeprowadzenia analiz statystycznych.

Ostatni etap obejmuje analizę biostatystyczną i chemometryczną, zwieńczoną interpretacją biologiczną. Ma to na celu integrację danych uzyskanych z analiz biochemicznych i metabolomicznych w celu lepszego wglądu w patogenezę danej jednostki chorobowej bądź wyselekcjonowanie specyficznych wskaźników danej jednostki chorobowej.

Ogólny schemat analiz został przedstawiony na Rys.1.



Rys 1. Schemat ogólny analizy metabolomicznej.

1.4. Rak prostaty

Jak podają badania statystyczne Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization, WHO*) rak gruczołu krokowego jest drugim, najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn, oraz czwartym najczęściej występującym rakiem w ogóle [12].

W 2020 roku u ponad 1,4 miliona mężczyzn zdiagnozowano raka prostaty, a ponad 375 tysięcy pacjentów zmarło z jego powodu. W przypadku Europy zachorowalność na ten rodzaj raka jest najwyższa. Na całym świecie, aż 33,5% nowych przypadków CaP stanowią Europejczycy. Od 2015 roku liczba zgonów w Europie spadła o 7%, co niezaprzeczalnie jest zasługą lepszej diagnostyki (wczesne wykrycie nowotworu gruczołu krokowego daje nawet 90% szans na wyleczenie). Najnowsze dane podane przez American Cancer Society wskazują na wzrastającą liczbę przypadków zachorowania na raka prostaty. Według danych w roku 2021, w USA, odnotowano ponad 248 tysięcy potwierdzonych przypadków zachorowania na raka prostaty, co stanowiło ponad 30% wzrost względem roku 2020. Tendencję wzrostową zaobserwowano również w liczbie przypadków śmiertelnych. W 2021 roku liczba ta wynosiła 34 130 i wzrosła o 2,34% względem roku ubiegłego [13].

W Polsce rak prostaty został uznany za drugi, najczęściej występujący typ raka u mężczyzn. Według danych opublikowanych przez Globocan, w 2020 roku odnotowano 18 079 przypadków raka prostaty, co stanowi ponad 17,6% wszystkich chorób nowotworowych, a liczba ta jest porównywalna do zdiagnozowanych przypadków raka płuc (18 277, co stanowi 17,8%). Jest to konsekwencja bezobjawowego wzrostu nowotworu, a co za tym idzie diagnostyki choroby w jej zaawansowanym stadium.

Ze względu na mało specyficzne symptomy, a często bezobjawowy rozwój choroby, diagnostyka raka prostaty jest niezwykle trudna. Obejmuje ona ocenę wielu parametrów biochemicznych, obrazowanie i testy kliniczne. Podstawowym badaniem przesiewowym jest oznaczenie specyficznego antygenu prostaty (PSA, *ang, prostate specific antigen*) w próbce surowicy, chociaż PSA jest niezaprzeczalnie antygenem tkankowo specyficznym, ale nie do końca swoistym biomarkerem raka prostaty. Jego ekspresję reguluje receptor androgenowy [14]. PSA kumuluje się w prostacie i jest 106 razy wyższy w prostacie niż w układzie krążenia. Biorąc pod uwagę architekturę gruczołu, stwierdzono, że do układu krążenia przedostają się tylko śladowe ilości PSA. Jest to również zgodne z główną rolą PSA, która polega na upłynnianiu ejakulatu [14].

W efekcie oznaczanie tego parametru nie daje jednoznacznej odpowiedzi w kierunku rozpoznania raka prostaty. Podwyższony poziom PSA obserwuje się w wielu innych stanach i może być konsekwencją odpowiedzi komórkowej na łagodny przerost gruczołu krokowego, ostre i przewlekłe zapalenie gruczołu krokowego, infekcję dróg moczowych czy chociażby procedurę cewnikowania. Dlatego też podwyższony poziom PSA uniemożliwia jednoznaczne rozpoznanie choroby. Mimo wszystko procedura ta jest szeroko stosowana w codziennej diagnostyce PCa. Ze względu na wysoki odsetek fałszywie dodatnich wyników diagnoza oparta na oznaczeniu antygenu prostaty jest uważana za główną potencjalną wadę badań przesiewowych.

Uzyskanie rzetelnej diagnozy wymaga zatem przeprowadzenia dodatkowych badań. W praktyce klinicznej pacjenci z podwyższonym PSA (poziom powyżej 10 ng/ml) są kwalifikowani do dalszej diagnostyki[15].

Pomocniczymi testami diagnostycznymi są: poziom wolnego PSA czy współczynnik określający stosunek wolnego PSA do całkowitego stężenia PSA. Diagnostyka może być również rozszerzona o przeprowadzenie testu genetycznego, oceniającego ekspresję genu PCA3 (ang. *Prostate Cancer Gene* 3).

Diagnostyka końcowa PCa obejmuje bezpośrednie badanie *per rectum*, ultrasonografię transrektalną, a u wybranych pacjentów wieloparametrowy rezonans magnetyczny. Ostateczna weryfikacja diagnozy opiera się na badaniu histopatologicznym skrawka pobranego podczas przezodbytniczej biopsji prostaty.

Badanie histopatologiczne jest jedynym badaniem, które może w 100% potwierdzić występowanie nowotworu prostaty. Podczas zabiegu materiał pobierany jest z obszaru podejrzewanego przez lekarza jako zmieniony chorobowo. Niestety powoduje to dyskomfort

pacjenta i przyczynia się do rozwoju stanu zapalnego. Warunkiem uzyskania wiarygodnego wyniku jest pobranie materiału tkankowego z bardzo dobrze sprecyzowanego miejsca.

Pobrany materiał tkankowy zostaje poddany ocenie histopatologicznej, na podstawie której dokonuje się klasyfikacji do właściwego stopnia histologicznego wg skali Gleasona. Z punktu widzenia klinicznego, skala ta jest najistotniejszym wskaźnikiem prognostycznym PCa a prawidłowa charakterystyka przyczynia się do wyboru odpowiedniej terapii. W 2016 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wprowadziła pięciostopniową klasyfikację, która zakładała ułatwioną stratyfikację prognostyczną z obniżeniem ryzyka nadrozpoznania CaP [H3].

Zgodnie z nią wartość jeden w skali Gleason odpowiada komórkom nowotworowym o wysokim zróżnicowaniu. Tym samym jest to najłagodniejsza forma nowotworu raka prostaty, o powolnej progresji i stosunkowo niewielkim powinowactwie do przerzutów. Wraz ze wzrostem liczby w skali Gleason, komórki cechuje coraz to mniejsze zróżnicowanie z dużą tendencją do szybkiego postępu oraz rozprzestrzeniania się nowotworu. Całkowity obraz, określany jest jako *Gleason score*, który sumuje dwa najczęściej występujące obrazy morfologiczne w preparacie, zaś wartość sumy odzwierciedla stopień złośliwości nowotworu.

Najczęstszym histologicznym typem raka prostaty jest gruczolakorak zakładający ponad 90% przypadków. Rozprzestrzenia się poprzez miejscowy naciek i przerzuty do węzłów chłonnych oraz przerzuty ogólnoustrojowe najczęściej skierowane do kości.

Inne ważne wskaźniki prognostyczne PCa obejmują takie parametry kliniczne, jak: wiek, styl życia, wskaźnik BMI czy choroby współistniejące, stopień zaawansowania raka opisany w skali pTNM czy poziom PSA.

Diagnostyka raka prostaty i kwalifikacja leczenia to złożony i często problematyczny proces, na który składa się wiele parametrów biochemicznych oraz badania obrazowe i kliniczne. Pomimo postępów w medycynie, u wielu pacjentów z PCa rozpoznanie nowotworu jest opóźnione z powodu trudności diagnostycznych, bezobjawowego przebiegu choroby. Ze względu na dyskomfort i niepokój związany z badaniem transrektalnym czy biopsją prostaty, pacjenci z dolegliwościami często opóźniają wizytę u lekarza i w konsekwencji są zdiagnozowani w zaawansowanym stadium choroby. Z tego względu, konieczne jest poszukiwanie nowych nieinwazyjnych metod diagnostycznych oraz specyficznych testów prognostycznych, które umożliwią szybką i precyzyjną diagnostykę w kierunku raka prostaty. Dlatego też niezbędne jest przeprowadzanie badań naukowych mających na celu poszukiwania submolekularnego mechanizmu PCa.

2. Cel badań

Głównym celem badań było poszukiwanie specyficznych deskryptorów raka prostaty prowadzących do rozpoznania patomechanizmu tej jednostki chorobowej. W ramach omawianego osiągnięcia naukowego zrealizowano poniższe, cząstkowe cele badawcze:

I. Opracowanie protokołu przygotowania próbek skrawków parafinowych jako nowatorskiego materiału biologicznego do analiz metabolomicznych
II. Oznaczenie profilu metabolicznego raka prostaty z wykorzystaniem podejścia niecelowanej analizy metabolomicznej za pomocą technik analitycznych sprzężonych ze spektrometrią mas oraz zaawansowanej analizy bioinformatycznej.
III. Identyfikacja kwasów tłuszczowych jako specyficznych, tkankowych wskaźników raka prostaty.
IV. Opracowanie nowych strategii badawczych do oznaczania profilu lipidomicznego z wykorzystaniem nowego podejścia jak MALDI-ToF/MS jako nowej analizy diagnostycznej raka prostaty we wczesnym stadium choroby.
V. Określenie roli kwasów tłuszczowych oraz fosfolipidów w patomechanizmie raka prostaty
VI. Poszukiwanie nowych biomarkerów raka prostaty w moczu pozwalających na wczesne rozpoznanie zaburzeń funkcjonowania gruczołu krokowego.
VII. Opracowanie protokołu przygotowania próbki nasienia jako innowacyjnej i alternatywnej matrycy biologicznej do poszukiwania patomechanizmu CaP.
VIII. Poznanie profilu metabolicznego próbek nasienia jako nowej i obiecującej matrycy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas.
IX. Określenie roli kwasu cytrynowego w rozwoju raka prostaty oraz zaburzeń syntezy i metabolizmu związków tłuszczowych.
X. Identyfikacja związków, pozwalających na różnicowanie badanych grup oraz korelacja danych metabolomicznych z danymi klinicznymi w celu poprawy metod predykcyjno klasyfikacyjnych.

Przedłożony cykl artykułów naukowych jest odpowiedzią na wyżej przedstawione problemy badawcze i obejmuje realizację celów naukowych prowadzących do:

- ✓ Opracowania nowatorskich metod przygotowania próbek biologicznych (ejakulat, skrawki parafinowe) do analiz metabolomicznych **[H1-H3, H6-H8]**

- ✓ Nowe podejście do diagnostyki raka prostaty dotyczące zastosowania technik separacyjnych sprzężonych ze spektrometrią mas oraz zaawansowanej analizy chemometrycznej **[H2, H3, H5-H8]**

- ✓ Opracowanie procedury oznaczania kwasu cytrynowego jako szybkiej metody oznaczania potencjalnego deskryptor raka prostaty **[H8]**

Do zrealizowania powyższych badań zaproponowałam i zastosowałam opracowane przeze mnie użycie procedury przygotowania próbek. Analizy metabolomiczne zostały przeprowadzone z użyciem chromatograficznych i spektrometrycznych technik instrumentalnych. Uzyskane dane zostały przygotowane w oparciu o kryteria zapewnienia jakości i poddane analizie bioinformatycznej i chemometrycznej.

3. Charakterystyka oraz omówienie uzyskanych wyników

Publikacje wchodzące w skład przedstawionego osiągnięcia naukowego są efektem realizacji projektu Sonata finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (grant nr.: 2016/21/D/ST4/03730) oraz z subwencji JM Rektora GUMed dla Młodych Naukowców (GUMed - MN 00083/2017) pod moim kierownictwem we współpracy z:

A) Zakładem Patologii i Neuropatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego [H2, H3]
B) Katedra i Kliniką Urologii, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego [H5, H7]
C) Oddziałem Urologii Ogólnej i Onkologicznej, Specjalistycznego Szpitala Miejskiego w Toruniu [H6, H8]
D) Katedrą Chemii Środowiska i Bioanalityki, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu [H1, H4, H5, H6, H8].

Wstępny etap obejmował analizę danych literaturowych w zakresie zastosowania tkanki jako materiału biologicznego do obrazowania metabolomicznego **[H1].** Rozwój danej jednostki chorobowej powoduje zaburzenia homeostazy komórkowej, a tym samym zmiany w profilach metabolicznych. Oznaczanie profili jakościowych czy ilościowych skupionych na

poszczególnych metabolitach bądź specyficznych grupach związków wymaga zastosowania dedykowanych im strategii badawczych, ściśle powiązanych z opracowaniem protokołu przygotowania próbek. Celem tego opracowania było przedstawienie aktualnej wiedzy na temat klinicznego zastosowania desorpcji/jonizacji laserowej wspomaganej matrycą – obrazowej spektrometrii mas w badaniach onkologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem etapu przygotowania próbki. Zastosowanie w pełni informacyjnego materiału jakim jest tkanka, pozwala na uzyskanie złożonego i niepowtarzalnego profilu analizowanych próbek. Wiedza ta prowadzi do diagnozowania choroby, badania mechanizmu rozwoju nowotworu, selekcji potencjalnych biomarkerów oraz korelacji uzyskanego obrazu z rokowaniem dla pacjenta. W tym celu porównano kilka protokołów opartych na zastosowaniu **zamrożonych tkanek i preparatów tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie** (FFPE, *ang. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*).

W opracowaniu przedstawiono najnowsze osiągnięcia w zakresie opracowania i aplikacji różnych procedur przygotowania próbek, które mogą znaleźć zastosowanie w obszarze klinicznym. W osiągnięciu **H1** zestawione zostały wady i zalety stosowania obu form materiału tkankowego. Poruszono też wagę wpływu protokołu przygotowania próbki, obejmujący pobranie materiału biologicznego, jego zabezpieczenie i obróbkę na wynik analizy. Przedyskutowano też wpływ procedury utrwalania tkanki w parafinie na profil metaboliczny próbki. Zebrane informację stały się podstawą naukową do opracowania procedury przygotowania skrawek parafinowych, jako innowacyjnej matrycy do niecelowanej analizy metabolomicznej.

Tematem przewodnim badań wskazanych jako osiągnięcie naukowe i przedstawione w publikacjach **H2 i H3 było opracowanie protokołu przygotowania próbki tkanki, a następnie wdrożenie tego protokołu do analizy metabolomicznej w celu poszukiwania deskryptorów raka prostaty**. Szczególne znaczenie poznawcze ma praca oznaczona jako **H2,** która dotyczyła doboru optymalnych parametrów przygotowania próbki. Skrawki parafinowe są cennym materiałem biologicznym powszechnie stosowanym w analizie genetycznej. Dzięki specyficznej procedurze utrwalania, tkanki mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej przez relatywnie długi czas bez wpływu na ich profil jakościowy i ilościowy. Jednakże sieciowanie tkanek oraz utrwalanie w parafinie wprowadza pewne ograniczenia zastosowania tej matrycy w diagnostyce chorób. Z tego względu FFPE są powszechnie stosowne w oznaczeniach genetycznych, ale jak do tej pory niewiele prac dotyczy zastosowania tego materiału w analizie metabolomicznej. Głównym problemem analitycznym jest etap deparafinizacji i oczyszczania tkanki. Żmudna procedura może skutkować utratą pewnej grupy

związków np. aminokwasów, co prowadzi do uzyskania niepełnego profilu próbki. Jest to wysoce niepożądane w przypadku niecelowanej analizy metabolomicznej skupionej na oznaczeniu jak największej liczby związków. Nadzieję stanowią związki tłuszczowe, uważane za stabilną grupę związków nawet podczas procesu deparafinizacji. Niemniej jednak, tylko nieliczne prace dotyczyły zastosowania FFPE w metabolomice, a opublikowane dotychczas protokoły nie przedstawiały procesu optymalizacji warunków oznaczania i wpływu poszczególnych parametrów protokołu przygotowania próbki na profil metabolomiczny próbek. Dlatego też, jednym z celów było opracowanie protokołu przygotowania próbek skrawków parafinowych do niecelowanych analiz metabolomicznych. Badania przedstawione w osiągnieciu **H2 należą do pionierskich** w zakresie zastosowania tego typu matrycy do badań metabolomicznych. W celu opracowania protokołu przygotowania próbki porównano wpływ takich etapów jak: metoda deparafinizacji, rodzaj i objętość rozpuszczalnika niezbędną do etapu deprafinizacji, liczbę cykli oczyszczania tkanki, rodzaj rozpuszczalnika stosowanego do oczyszczania oraz grubość skrawka parafinowego. W badaniu wykorzystano 67 preparatów tkankowych, które zostały podzielone w następujący sposób:

9 próbek użyto do opracowania metody deparafinizacji, 24 próbki posłużyły do optymalizacji procedury oczyszczania tkanki, 25 próbek wykorzystano do oceny wpływu grubości skrawka parafinowego na profil metabolomiczny i 9 próbek wykorzystano w celu badania aplikacyjności metody.

W pierwszym etapie porównano efektywność procesu deparafinizcji z zastosowaniem dwóch metod tj.: metody na bazie ksylenu jak również procedury z użyciem gorącej wody.

Dodatkowo, badano wpływ grubości skrawka tkankowego na jakość i powtarzalność profilu metabolomicznego. W odniesieniu do literatury, w warunkach klinicznych, grubość stosowanej tkanki waha się od 7 do 40 μm, podczas gdy w metabolomice najczęściej wykorzystywano preparat o grubości 40 μm [15, 16].

Sprawdzano dwa warianty oczyszczania, tj. jednoetapowa procedura oczyszczania etanolem, dwuetapowa procedura oczyszczania przy użyciu etanolu i acetonu, w stosunku do braku zastosowania procedury oczyszczania.

Oczyszczoną tkankę zważono i poddano procedurze ekstrakcji wykorzystując czteroskładnikowy układ. Uzyskane w ten sposób ekstrakty odparowano do sucha i poddano reakcji konwersji chemicznej. W tym procesie wykorzystano reakcję sililowania z udziałem mieszaniny BSTFA z TMCS (N,O-bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid z trimetylochlorosilanem), mającą na celu modyfikację cech fizykochemicznych metabolitów. Jest to niezbędny etap warunkujący możliwość oznaczania profili metabolicznych za pomocą

chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Do rozdzielenia analitów wykorzystano kolumnę kapilarną Zebron ZB-5MS (30 m× 0, 25 mm śr. wewn., grubość filmu 0,25 µm) (Phenomenex, Torrance, Kalifornia, USA) z zastosowaniem gradientowego programu temperatury, z temperaturą początkową wynoszącą 70 °C (1 min), wzrastającą z szybkością 8 °C/min do 320 °C (10 min) w celu elucji wszystkich związków. Analizy przeprowadzono w trybie stałego ciśnienia (65,2 kPa) i całkowitym przepływie helu, jako gazu nośnego, z prędkością 10 ml/min. Całkowity czas analizy wynosił 43 min. Analizy wykonano w trybie skanowania w zakresie mas 50–1000 m/z. Uzyskane dane analityczne poddano procesowaniu z zastosowaniem opracowanych przeze mnie algorytmów dedykowanych analizie metabolomicznej. Przetwarzanie danych metabolomicznych obejmowało normalizację względem sygnału i intensywności wzorca wewnętrznego jak i masy tkanki, dekonwolucję, wyrównanie widm, filtrowanie z zastosowaniem kryterium zapewnienia jakości, transformację oraz skalowanie. Uzyskana matryca została poddana zarówno jedno jak i wielowymiarowej analizie statystycznej. W zależności od rozkładu normalnego uzyskanych danych eksperymentalnych zastosowano test t-Studenta, Welcha, U Manna Whitneya czy też ANOVA. Ponadto uzyskane wyniki zostały skorygowane pod względem istotności testów z zastosowaniem korekty Benjamini-Hochberg, która ma na celu ograniczyć frakcję fałszywych odkryć (FDR, ang. *false discovery rate*). Do graficznej wizualizacji danych wykorzystano wielowymiarową analizę statystyczną. Jedną z nich jest analiza głównych składowych (PCA, ang. *principal component analysis*), która wykorzystywana jest do weryfikacji uzyskanych danych eksperymentalnych. Przeprowadzenie analizy umożliwia nie tylko wykrycie prób odstających, ale jej głównym celem jest znalezienie nowych zmiennych, które umożliwią kompresję danych i charakterystykę próbek. **Uzyskane dane analityczne, poparte analizą statystyczną umożliwiły opracowanie innowacyjnej procedury przygotowania skrawek parafinowych do analiz metabolomicznych [H2].** Wykazano, że najefektywniejszą metodą jest deparafinizacja z zastosowaniem ksylenu, chociaż zastosowanie FFPE do analiz metabolomicznych wymaga również przeprowadzenie procesu oczyszczania tkanki z zastosowaniem etanolu. Wykazano, że zastosowanie trzech porcji rozpuszczalnika (0,7 mL etanolu każda) eliminuje kontaminację próbki pozostałościami parafiny. W ramach omawianego osiągniecia badawczego sprawdzano również wpływ grubości tkanki parafinowej na profil metaboliczny. W tym celu badano pięć różnych grubości skrawków parafinowych tj.: 10 µm, 15 µm, 20 µm, 30 µm i 40 µm. Uzyskane dane poddano normalizacji przez intensywność piku wzorca wewnętrznego, masę tkanki i grubość skrawka parafinowego. Wyniki wskazują, że grubość tkanki wpływa na złożoność profilu. Największe różnice

wykazano między profilami uzyskanymi dla skrawek parafinowych o grubości 10 μm, 15 μm i 20 μm. Na bazie przeprowadzonej jednowymiarowej analizy statystycznej wyselekcjonowano cztery metabolity różnicujące uzyskane profile w zależności od grubości skrawka. Wśród nich znajdowały się glicyna, inozytol, kwas cytrynowy i prolina. Zestaw tych czterech związków posłużył do oceny wpływu grubości skrawka parafinowego na intensywność związków. Wykazano, że profile uzyskane dla skrawków o grubości 30 μm i 40 μm różnią się od profili uzyskanych dla próbek o grubości 10 μm, 15 μm i 20 μm. Wyniki wskazują, że najwyższe a zarazem najbardziej powtarzalne intensywności uzyskano dla ekstraktów tkankowych uzyskanych ze skrawek parafinowych o grubości 30 μm. Opracowana procedura została zastosowana do analizy próbek rzeczywistych pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty. Przeprowadzone analizy statystyczne umożliwiły selekcję 10 związków, których poziomy różnicują dwie badane grupy w sposób istotny statystycznie. Wśród nich wyróżnić można **kwas cytrynowy oraz grupę kwasów tłuszczowych**. Wyselekcjonowane specyficzne deskryptory molekularne zostały zestawione w Tabeli 2.

Tabela 2 Deskryptory molekularne wyznaczone za pomocą niecelowanej analizy metabolomicznej w ramach osiągniecia H2

Nr.	Związek	RT [min]	*P* value	*P* value po FDR korekcie	Grupa związków
1.	Kwas heptadekanowy	24,22	2,40E-04	0,002	Kwasy tłuszczowe
2.	Kwas 2,3 Oktadekanowy	30,86	0,016	0,030	Kwasy tłuszczowe
3.	2-Amino-2-metylo-1,3-propanediol	11,41	0,016	0,030	Alkohol aminowy
4.	Kwas nonanowy	12,83	0,001	0,033	Kwasy tłuszczowe
5.	Kwas 13-oktadekenowy	25,09	0,004	0,041	Kwasy tłuszczowe
6.	Kwas heksanowy	7,51	0,004	0,041	Kwasy tłuszczowe
7.	Kwas cytrynowy	19,93	0,016	0,049	Kwasy organiczne
8.	Kwas butadienowy	11,98	0,009	0,049	Kwasy organiczne

9.	Kwas heksadekanowy	23,02	0,017	0,049	Kwasy tłuszczowe
10.	Benzamid	8,74	0,009	0,049	Amid aromatyczny

Osiągnięcia opisane w H2 zostały zastosowane do niecelowanej analizy lipidomicznej próbek prostaty przeprowadzonych w ramach osiągnięcia H3.

Według danych literaturowych rak prostaty jest jednym z nowotworów ściśle skorelowanych z biosyntezą oraz metabolizmem lipidów [H3, 17, 18]. Dane naukowe wskazują, że w przypadku raka prostaty dochodzi do wzmożonej lipogenezy w komórkach nowotworowych[16, 17]. Jeden z proponowanych mechanizmów wskazuje na syntezę *de novo* kwasów tłuszczowych, jako efekt kancerogenezy. Postępujący rozwój choroby nowotworowej, zaburza homeostazę egzogennych i endogennych związków tłuszczowych, aczkolwiek mechanizm zmian zachodzących w komórce nie został do końca poznany. Z tego powodu niecelowana analiza lipidomiczna wydaje się być cennym narzędziem do charakterystyki metabolomu raka prostaty. Takie podejście dostarcza informacji na temat fizjologicznych funkcji związków tłuszczowych. Pozwala też zidentyfikować nowe czynniki biochemiczne, które mogą mieć znaczenie dla szybkiej diagnozy lub prognozy CaP.

Głównym celem tego badania było wykonanie niecelowanej analizy tkanek nowotworowych i nienowotworowych prostaty. **Do badania wykorzystano skrawki parafinowe jako innowacyjny materiał biologiczny do badań metabolicznych. Procedura przygotowania próbki została opracowana i stanowiła główny cel osiągnięcia H2. Badania w ramach osiągnięcia H3 miały na celu oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych w skrawkach parafinowych tkanki prostaty.**

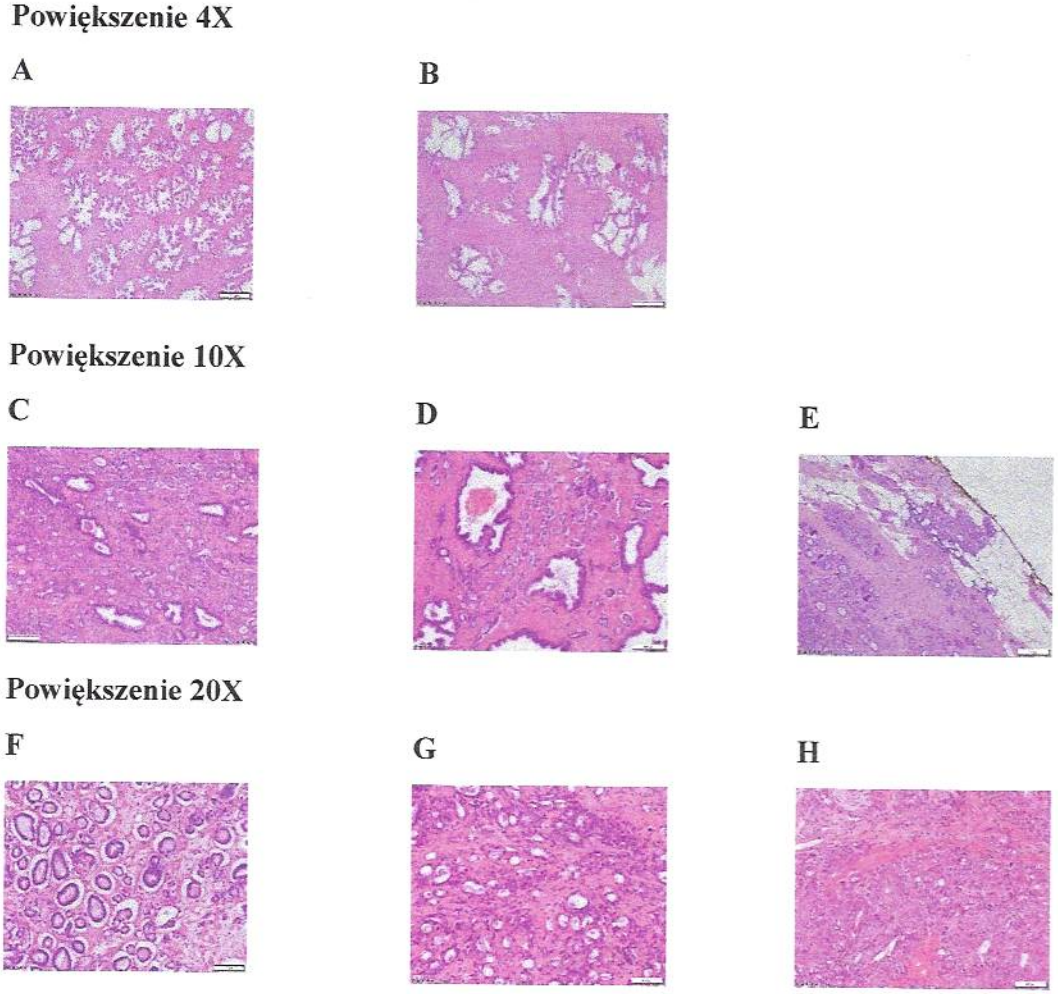
Jednym z głównych walorów osiągnięcia jest zastosowanie próbek FFPE do lipidomiki. W tego typu materiale tkankowym zmiany molekularne związane z rozwojem raka można śledzić podobnie jak w tkankach świeżych, ale problemy z dostępnością i przechowywaniem są ograniczone. Niezaprzeczalną zaletą wykorzystania próbek FFPE jest ich trwałość w temperaturze otoczenia przez długi czas. Z tego powodu w przypadku biobankowania procedura utrwalania tkanek w parafinie jest preferencyjna w porównaniu do zamrażania. W związku z tym FFPE są bardziej dostępne do analizy retrospektywnej, na przykład dla analiz metabolomicznych. Po drugie, zastosowanie FFPE umożliwia bezpośrednią ocenę histopatologiczną danego fragmentu tkanki, który w kolejnym etapie badań można poddać analizie lipidomicznej. Dzięki temu uzyskane wyniki ściśle obrazują zmiany zachodzące

wskutek rozwoju choroby nowotworowej. W osiągnieciu naukowym **H3** matryca ta została wykorzystana do analizy lipidomicznej tkanek prostaty z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Wybór tej techniki analitycznej jest dedykowany oznaczaniu kwasów tłuszczowych będących głównym celem tych badań. Jednakże, profilowanie lidpidomiczne z wykorzystaniem chromatografii gazowej wymaga przeprowadzenia procesu konwersji chemicznej, w celu zwiększenia lotności metabolitów i redukcji ich polarności. Dlatego też, pierwszy etap obejmował porównanie trzech procedur konwersji chemicznej, które umożliwiają oznaczenie kwasów tłuszczowych z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Wśród nich zastosowano konwersję chemiczną z użyciem 2% wodnego roztworu kwasu siarkowego(VI), 8% metanolowy roztwór kwasu solnego oraz roztwór trifluorku boru. Weryfikacji uzyskanych wyników dokonano za pomocą analizy porównawczej intensywności pików oraz powtarzalności reakcji konwersji chemicznej wyrażonej jako współczynnik zmienności (CV), dla dwóch wybranych kwasów tłuszczowych, których poziom jest najwyższy w tkance prostaty. W efekcie metoda bazująca na zastosowaniu kwasu siarkowego(VI) wykazała się najwyższą powtarzalnością. W tym przypadku współczynnik zmienności dla kwasu heksadekanowego i oktadekanowgo wynosił odpowiednio 19,77% i 18,33%. Dlatego też metoda ta została zastosowana do oznaczania profili kwasów tłuszczowych dla próbek rzeczywistych.

Grupę badawczą w tej pracy stanowiły 52 próbki FFPE uzyskane od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty, zaś grupę kontrolną 50 próbek FFPE pozyskanych od pacjentów z łagodnym przerostem prostaty. Każdy preparat został oceniony i opisany na podstawie punktacji Gleasona i stopnia zaawansowania pTNM. Badania te były prowadzone we współpracy z Zakładem Patologii i Neuropatologii, Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, co umożliwiło przeprowadzenie szczegółowej analizy histologicznej preparatów tkankowych W tym celu przeprowadzono rutynową procedurę, która umożliwiła charakterystykę histologiczną analizowanych próbek. **Pionierskim podejściem tych badań było jednoczesne przeprowadzenie analiz metabolicznych oraz oceny histologicznej próbek FFPE w celu oznaczenia specyficznego profilu metabolicznego raka prostaty (CaP).**

Ocena histologiczna wykazała, że najczęściej występujący obraz histologicznym opisany w skali Gleasona jest jako 3+4 i stanowi ponad 40% analizowanych przypadków. Kolejne, najczęściej występujące obrazy opisane są w skali Gleasona jako 3+3 oaz 4+3 i stanowiły po 20% ocenianych przypadków.

Przykładowe zdjęcia preparatów tkankowych wykonane podczas badań histopatologicznych zostały przedstawione na rys.1, gdzie 1A i 1B odpowiadają tkance uzyskanej z grupy kontrolnej, podczas gdy 1C do 1H przedstawiają próbki tkanki nowotworowej.



Rys. 2. Obraz histopatologiczny grupy kontrolnej z łagodnym przerostem (A i B) i rakiem prostaty (C-H) (barwienie H&E, powiększenie x100 i x200).

Zgodnie z procedurą opisaną w osiągnięciu naukowym **H2,** skrawki parafinowe zostały poddane deparafinizacji. Następnie materiał biologiczny poddano homogenizacji i ekstrakcji z zastosowaniem metody Bligh'a &Dyer'a [19]. Metoda ta jest dedykowana izolacji związków tłuszczowych z materiału biologicznego i bazuje na zastosowaniu mieszaniny wody, metanolu oraz chloroformu w danych proporcjach. Tak uzyskane ekstrakty tkankowe zostały odparowane do sucha i poddane procesowi konwersji chemicznej z zastosowaniem metanolowego roztworu kwasu siarkowego(VI). Reakcja upochadniania ma na celu uzyskanie pochodnych metylowych kwasów tłuszczowych, w celu redukcji ich polarności oraz zwiększenia lotności.

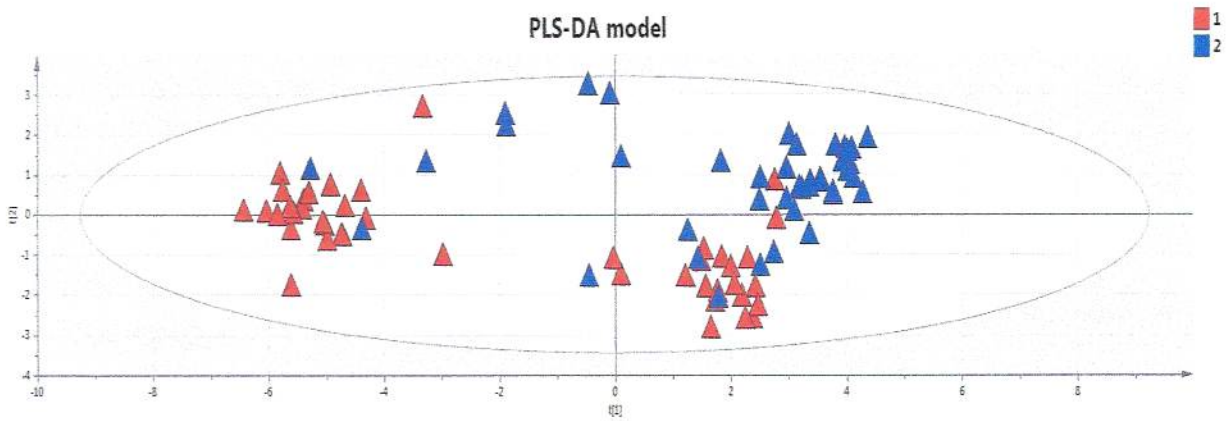
Analizę lipidomicznego odcisku palca przeprowadzono za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. W badaniu zastosowano kolumnę kapilarną Zebron ZB-WAX (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 m o grubości filmu), dedykowaną oznaczaniu metabolitów o charakterze hydrofobowym. Analiza została przeprowadzona w trybie stałego ciśnienia, z użyciem helu jako gazu nośnego. Związki rozdzielono stosując następujący program gradientu temperatury: temperatura początkowa w piecu wynosiła 60°C (1min), a następnie przyrost temperatury z prędkością 8 °C /min do osiągnięcia wartości końcowej 320°C. Aby rozpoznać pełny profil metabolomiczny próbek prostaty, analizy zostały przeprowadzone w trybie przemiatania (SCAN), a uzyskane dane zostały poddane procesowaniu za pomocą programu AMDIS oraz identyfikacji w oparciu o bibliotekę NIST, bazując na trzech podstawowych parametrach tj. czas retencji, indeks retencji oraz widmo masowe dla poszczególnych metabolitów. Uzyskane dane zostały poddane jedno oraz wielowymiarowej analizie statystycznej, mającej na celu oznaczenie związków różnicujących dwie badane grupy. W przypadku jednowymiarowej analizy statystycznej wykorzystano test t-Studenta oraz test U Manna–Whitneya. Przeprowadzenie analiz metabolicznych warunkuje zastosowania korekty poziomu istotności (wartość *p*) z użyciem metody FDR. Finalnie wyselekcjonowano 10 metabolitów, których poziomy różniły się w sposób istotny statystycznie dla dwóch analizowanych grup. Panel metabolitów został przedstawiony w Tabeli 3.

Tabela 3 Metabolity wyselekcjonowane podczas analiz przeprowadzanych w ramach osiągnięcia H3.

Związek	**Wartość *p***	**Wartość *p* po korekcie Benjamini–Hochberg**	**Wartość *p* po korekcie Bonferroni**	**Szlak metaboliczny**
Kwas 5, 8, 11, 14-Eikozatetraenowy	5,01 *E^{-15}	1,90* E^{-13}	1,90* E^{-13}	Metabolizm kwasu alfa-linolenowego i kwasu linolowego Peroksydacja lipidów
Kwas 9 - Oktadekenowy	2,13* E^{-6}	4,04* E^{-5}	8,08* E^{-5}	Metabolizm kwasów tłuszczowych, Peroksydacja lipidów

Kwas 9, 12 - Oktadekadienowy	$6,66* E^{-6}$	$8,44* E^{-5}$	$2,53* E^{-4}$	Metabolizm kwasu alfa-linolenowego i kwasu linolowego Peroksydacja lipidów
Kwas dodekanowy	$5,54* E^{-5}$	$3.46* E^{-4}$	$2.11* E^{-3}$	Utlenianie beta kwasów tłuszczowych o bardzo długim łańcuchu Biosynteza kwasów tłuszczowych Mitochondrialne beta-utlenianie nasyconych kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha Szlak metabolizmu lipidów
Kwas 2-Hydroksyglutarowy	$1,15* E^{-4}$	$4,84* E^{-4}$	$4,36* E^{-3}$	TCA Biotransformacja kwasów tłuszczowych
Kwas glukarowy	$1,47* E^{-4}$	$5,09* E^{-4}$	$5,60* E^{-3}$	Metabolizm węglowodanów Metabolizm średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych
Monoetylomalonian	$2,25* E^{-4}$	$7,13* E^{-4}$	$8,55* E^{-3}$	Synteza i metabolizm kwasów tłuszczowych i
3-Amino-1-propanol	$7,02* E^{-4}$	$1,63* E^{-3}$	$2,67* E^{-2}$	reakcja redukcji aldehydów
Kwas metylomalonowy	$7,70* E^{-4}$	$1,63* E^{-3}$	$2,93* E^{-2}$	TCA, Katabolizm degradacji waliny, leucyny i izoleucyny kwasów tłuszczowych Metabolizm propanianu
Enterodiol	$9,58* E^{-4}$	$1,92* E^{-3}$	$3,64* E^{-2}$	Metabolizm bakterii, lignan powstający w wyniku działania bakterii jelitowych
Stearamid	$2,95* E^{-2}$	$4,48* E^{-2}$	1,00	Peroksydacja lipidów Metabolizm kwasów tłuszczowych i lipidów

Uzyskane dane zostały również poddane wielowymiarowej analizie statystycznej, mającej na celu zobrazowanie danych analitycznych, sprawdzenie stabilności warunków w czasie trwania analizy oraz wyselekcjonowanie metabolitów o największym znaczeniu dyskryminacyjnym dla dwóch badanych grup. W tym celu w pierwszym etapie zastosowano analizę głównych składowych. Ponadto dane uzyskane podczas jednowymiarowej analizy statystycznej posłużyły do przeprowadzenia analizy cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną, PLS-DA (ang. *partial last squares discriminant analysis*). Na podstawie uzyskanych danych został zbudowany model predykcyjny, wskazujący na istotne różnice pomiędzy porównywanymi grupami. Model ten przedstawiono na Rys 3.



Rys. 3 Model predykcyjny PLS-DA dla wyników uzyskanych za pomocą GC–QqQ/MS. Parametry: R2 = 0,67; Q2 = 0,525. Czerwone trójkąty: (1) – PCa; (2) — grupa kontrolna.

Uzyskane wyniki wskazują na różnice w profilach metabolicznych pacjentów grupy badanej (czerwone trójkąty) względem grupy kontrolnej (oznaczonej jako niebieskie trójkąty). Ponadto, zaobserwowano, że próbki pochodzące od pacjentów z PCa tworzą dwie podgrupy. Zestawienie danych analitycznych z wynikami histopatologicznymi sugeruje, że grupy te odpowiadają próbkom raka o niższym stopniu złośliwości i są widoczne w prawej części wykresu. Próbki te odpowiadają przypadkom opasanym w skali Gleasona jako 1-3, przy czym dominujące są te, należące do klasy 1-2. Klaster próbek skumulowany w lewej części wykresu odpowiada próbkom o względnie wyższym stopniu złośliwości guza. Klaster ten obejmuje próbki o stopniu Gleasona w zakresie od 1 do 5, przy czym przypadki opisany jako klasy 3, 4 są dominujące.

Ponadto przeprowadzenie analiz zmiennych istotnych dla projekcji (VIP, ang. *variables important into projection*) i współczynnika selektywności (SR, ang. *selectivity ratio*) umożliwiło wybór trzech metabolitów, które w sposób istotny statystycznie dyskryminują dwie badane grupy. W efekcie wyselekcjonowano 3 kwasy tłuszczowe: kwas 9,12 oktadekadienowy,

kwas 5,8,11,14 eikozatetraenowy oraz kwas 9 oktadekaneowy, których poziom był wyższy w grupie badanej względem kontrolnej. Można przypuszczać, że rozwój PCa wiąże się z podwyższoną *de novo* biosyntezą kwasów tłuszczowych związanych z hormonami steroidowymi i β-oksydacją kwasów tłuszczowych. Niezaprzeczalnie uzyskanie specyficznego profilu metabolomicznego potwierdziło zmiany w szlaku metabolizmu lipidów w PCa.
Analiza danych została też wzbogacona o analizę korelacji pomiędzy poziomem wybranych metabolitów a deskryptorami histopatologicznymi opisującymi stopień złośliwości raka (wyrażony w skali Gleason), oraz stopień zaawansowania nowotwory pTNM określający : guza pierwotnego (T), obecność komórek nowotworowych w regionalnych węzłach chłonnych (N) oraz stan marginesu chirurgicznego (M). We wszystkich badanych wariantach nie wykazano wpływu analizowanych czynników na metabolom. W wyniku przeprowadzonych analiz nie stwierdzono też istotnych statystycznie różnic związanych z wiekiem pacjenta. Przeprowadzenie niecelowanej analizy lipidomicznej (**H3**) umożliwiło wyselekcjonowanie trzech kwasów tłuszczowych jako potencjalnych deskryptorów raka prostaty tj. kwasu 9-oktadekanowego, 9,12-oktadekadienowego oraz 5,8,1,14-eikozatetraenowego. W praktyce związki te można uznać za specyficzne markery biochemiczne o potencjale diagnostycznym, mając na uwadze, że ich znaczenie powinno zostać zweryfikowane na większym zestawie próbek.

Prostatę można również rozważać jako niewielki gruczoł, którego funkcjonalność zależna jest od hormonów, głównie androgenów [20].W procesie kancerogenezy androgeny wpływają na proliferację komórek, różnicowanie funkcji wydzielniczej i indukowanie tworzenia cytoplazmatyczne kropelki lipidów [21]. Co więcej, receptor androgenowy moduluje ekspresję kilku enzymów lipogennych, zarówno w guzach pierwotnych, jak i przerzutowych. Uzyskane w osiągnieciu **H3** wyniki wskazują na zaburzenia lipidomu komórkowego. Podwyższony poziom kwasów tłuszczowych w przypadku rozwoju raka prostaty może wpływać nie tylko na wzmożoną syntezę kwasów tłuszczowych, co było udowodnione w osiągnięciu **H3**, ale również zaburzać biosyntezę i transformację lipidów. W przypadku PCa podwyższenie poziomu kwasów tłuszczowych, cholesterolu, fosfolipidów i androgenów może być obserwowane w wyniku nadekspresji syntazy kwasów tłuszczowych (FAS, ang. *fatty acid synthase*) lub zewnątrzkomórkowej lipolizy triglicerydów [**H3**, 20, 21, 22].

W przeciwieństwie do stanu fizjologicznego, wzmożona proliferacja wzmaga zapotrzebowanie na lipidy, które są wykorzystywane nie tylko jako źródło energii czy podstawowy budulec

komórki ale również do sygnalizacji [23]. Ponadto, badania wskazują na podwyższony poziom fosfolipidów jak: fosfatydylocholiny (PC) i fosfatydyloetanoloaminy (PE).

Większość dostępnych technik analitycznych umożliwia oznaczanie od jednego do kilkunastu metabolitów w trakcie jednej analizy. Ze względu na zróżnicowaną budowę lipidów, a co za tym idzie odmienne właściwości fizykochemiczne wciąż poszukuje się alternatywnych metod umożliwiających jak najpełniejszą charakterystykę lipidomu. Jednym z alternatywnych podejść jest zastosowanie technik obrazowania bazujących na laserowej desorpcji w identyfikacji lipidów jako biomarkerów CaP.

Wśród tych technik, użycie laserowej jonizacji próbki wspomaganej matrycą z detektorem czasu przelotu *MALDI*-TOF/MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time of Flight Mas Spectrometry*) wydaje się mieć największe znaczeniu z punktu widzenia szybkości analizy oraz możliwości wprowadzenia tej techniki do diagnostyki klinicznej. Zastosowanie MALDI-TOF/MS pozwala na globalne obrazowanie aktualnego stanu fizjologicznego organizmu na poziomie molekularnym. Ponadto metoda ta wymaga niewielkiej ilości próbki, a protokół przygotowania próbki jest stosunkowo prosty. Technika ta jest powszechnie stosowana w proteomice i genomice, zaś wiedza na temat jej aplikacji w analizach lipidomicznych jest bardzo ograniczona [23, 24].

Nie znaleziono też uniwersalnego protokołu przygotowania próbki do oznaczeń fosfolipidów w tkance prostaty za pomocą MALDI-TOF/MS. Dlatego też kolejnym etapem rozprawy było zebranie danych literaturowych dotyczących zastosowania tej techniki w lipidomice. Osiągnięcie **H4** obejmowało zestawienie danych literaturowych opisujących wykorzystanie technik laserowej desorpcji do poszukiwania swoistych wskaźników raka prostaty. W osiągnięciu **H4** omówiono podstawową rolę lipidów w kancerogenezie raka, specyfikę i podwaliny kancerogenezy, jak również przegląd możliwości aplikacyjnych technik bazujących na laserowej desorpcji w identyfikacji lipidów jako biomarkerów CaP. Zestawienie przedstawione w **H4** było wstępem teoretycznym do badań przedstawionych w osiągnięciu **H5**, którego przedmiotem było oznaczenie profilu jakościowego oraz ilościowego fosfolipidów w tkance prostaty. Zastosowane podejście lipidomiczne bazuje na wykorzystaniu spektrometrii mas w celu identyfikacji fosfolipidów, ilościowej analizy ale również zrozumienia struktury i funkcji tej klasy metabolitów w patomechanizmie raka prostaty. Wykorzystuje ono nie tylko unikatową strukturę związków chemicznych, ale także specyficzną fragmentację tych indywiduów.

Zastosowanie spektometrii mas umożliwia uzyskanie informacji o strukturze cząsteczki z wysoką czułością i selektywnością. Innowacyjnym podejściem w zakresie osiągnięcia **H5** było

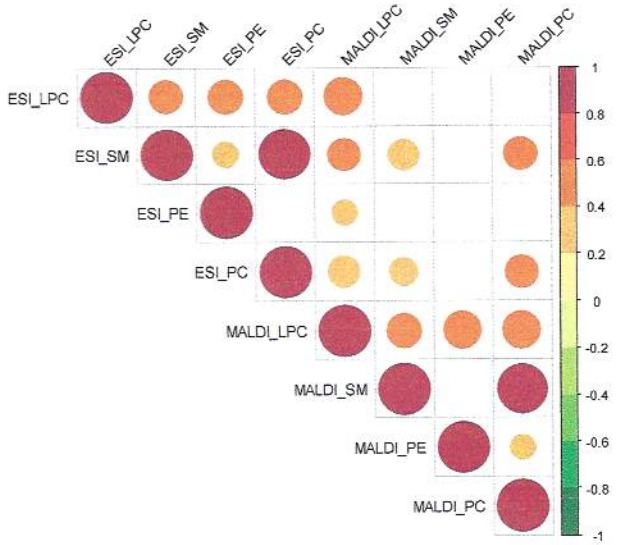
wykorzystanie laserowej jonizacji próbki wspomaganej matrycą z detektorem czasu przelotu *MALDI-TOF/MS* ze względu na jej wysoką czułość (kilka atomów analitu)[24].

Dlatego też, wyzwaniem analitycznym było opracowanie procedury do oznaczania fosfolipidów w tkance prostaty z zastosowaniem MALDI-TOF/MS. Technika ta umożliwiła przeprowadzenie obrazowania fosfolipidów charakterystycznych dla raka prostaty.

Ponadto, w celu ilościowego oznaczenia poszczególnych fosfolipidów wykorzystano jonizację próbki w trybie elektrorozpylania sprzężoną z analizatorem typu potrójny kwadrupol (ESI-QqQ). Zastosowanie dwóch komplementarnych technik analitycznych miało na celu identyfikację fosfolipidów, które mogą potencjalnie służyć jako prognostyczne i/lub wczesne deskryptory diagnostyczne PCa. W tym celu 80 próbek świeżej tkanki zostało pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (n=40) oraz łagodnym przerostem prostaty (n=40). Ponadto, każdy preparat tkankowy został oceniony pod kątem histologicznym w odniesieniu do skali Gleasona. Spośród ocenianych próbek 11 przypadków otrzymało wskaźnik Gleasona 6, 14 przypadków opisano wskaźnikiem Gleasona 7, 4 przypadki opisano w skali Gleason jako 8, 10 przypadków zakwalifikowano jako 9 i jeden przypadek został opisany jako 10. Grupa kontrolna składała się z próbek pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym łagodnym przerostem prostaty. Metabolity były ekstrahowane za pomocą procedury Folcha, która jest dedykowana izolacji związków o charakterze tłuszczowym. Tak przygotowane ekstrakty odparowano, a suchą pozostałość rozpuszczono ponownie w czystym metanolu. Profilowanie fosfolipidów zostało przeprowadzone za pomocą techniki MALDI-ToF/MS z zastosowaniem klasycznej metody suchej kropli, a następnie pokryte dedykowaną matrycą. Analizy prowadzono w liniowym trybie dodatnim przy napięciu przyspieszenia 25 kV. Widma rejestrowano ręcznie w zakresie m/z 150–2000 [25]. Zastosowanie tej techniki umożliwiło oznaczenie 33 związków. Ponadto zaproponowano potencjalny mechanizm fragmentacji związków lipidowych podczas jonizacji z zastosowaniem techniki MALDI-ToF/MS. Badanie mechanizmu jonizacji nosi znamiona nowości w przypadku analiz lipidomicznych. W kolejnym etapie przeprowadzono celowaną analizę lipidomiczną z zastosowaniem techniki ESI-QqQ w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM, ang. *multiple reaction monitoring*). Zastosowanie trybu MRM umożliwia zarówno identyfikację metabolitów na podstawie fragmentów, jak również oznaczanie ilościowe tych związków w analizowanych próbkach. W efekcie oznaczono stężenie 37 fosfolipidów o potencjalnym znaczeniu klinicznym w tkankach prostaty. Dla każdej z technik uzyskane dane analityczne zostały poddane zaawansowanej analizie bioinformatyczno-chemometrycznej. Zgodnie z obowiązującym protokołem w pierwszym etapie przeprowadzono analizę głównych składowych, która umożliwiła

wizualizację ogólnych trendów danych oraz dostarczanie informacji o potencjalnych wartościach odstających [26]. W modelu PCA nie zaobserwowano klastrów co wskazuje, że suma wariancji w zbiorze danych przypisuje się różnym czynnikom (wiek, stadium zaawansowania guza, przyjmowanie leków, dieta, międzyzmienność metabolizmu itp.). Ponadto przeprowadzono analizę korelacji, w której jako kryterium zastosowano współczynnik rang Speramana. Podejście to uwzględniało 29 metabolitów oznaczonych za pomocą dwóch stosowanych technik analitycznych (MALDI-ToF/MS i ESI-QqQ/MS), które można sklasyfikować do 4 głównych klas fosfolipidów jak lisofosfatydylocholin (LPC), fosfatydyloetanoloamin (PE), sfingomielin (SM), fosfatydylocholin (PC) .

Dla obu stosowanych technik analitycznych, wykazano dodatnią korelację moderacji (współczynnik Sparmana, rho > 0,4) pomiędzy całkowitą sumą sygnałów LPC a całkowitą sumą sygnałów SM/PE/PC. Ponadto, zaobserwowano silną korelację dodatnią (rho > 0,9) między całkowitą SM a PC. Graficzną interpretacją analizy korelacji przedstawiono na Rys.4.



Rys. 4 Macierz korelacji zbudowana na podstawie całkowitej odpowiedzi fosfolipidów, dla danych uzyskanych za pomocą obu technik (analiza MALDI—MALDI-ToF/MS, analiza ESI—ESI-QqQ/MS). Kod koloru odnosi się do współczynnika rho; wielkość kół jest proporcjonalna do siły korelacji; puste komórki odpowiadają nieistotnym korelacjom (p>0,05).

Uzyskane dane analityczne zostały poddane analizie z nadzorem nauczyciela, która ma na celu wyselekcjonowania deskryptorów raka prostaty w obrębie fosfolipidów. Wyniki analiz zostały przedstawione w sposób graficzny z zastosowaniem wykresów Volcano, opisujących zarówno wielokrotność zmiany odpowiedzi analitu w stosunku do grupy kontrolnej, jak również również znaczenie tej zmiany. Pierwszy parametr wyrażony jest jako log 2 intensywności analitu w grupie dodatniej podzielony przez jego intensywność w grupie kontrolnej, drugi zaś jako log10

wartości p. W przypadku danych uzyskanych za pomocą MALDI-ToF/MS, przeprowadzona analiza dyskryminacyjna umożliwiła identyfikację jednej zmiennej tj.: PC 18:0/22:5 różnicującej dwie testowane grupy. Wyniki wskazują, że poziom metabolitu w próbkach CaP jest niższy w stosunku do próbek grupy kontrolnej. W przypadku danych uzyskanych za pomocą analizy ESI-QqQ/MS 8 zmiennych z 57 uznano za istotne statystycznie. Wśród nich wyróżnić można 7 fosfofatydylocholin (PC): PC 16:0/16:1, PC 18:1/18:2, PC 18:0/18:1, PC 18:1/18:1, PC 18:1/20:0, PC 18:1/20:1, PC 18:1/20:2 i jedną sfingomielinę (SM): SM d18:1/24:0. Poziom wszystkich metabolitów był wyższy u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty. Zastosowanie modeli statystycznych z nadzorem nauczyciela umożliwia rozróżnienie stanów klinicznych na podstawie wybranych metabolitów z analizowanego lipidomu.

Ze względu na fakt, że diagnostyka raka prostaty jest wciąż wyzwaniem należy poszukiwać nowych narzędzi, które umożliwią identyfikacją jednostki chorobowej w jej bardzo wczesnym stadium. W tym celu wykorzystuje się modele predykcyjne. Uzyskane dane analityczne posłużyły do zbudowania modeli predykcyjnych umożliwiających diagnostykę CaP. W tym celu wykorzystano dwa podejścia tj podejścia drzew decyzyjnych (RF, ang. *random forest*) oraz sztucznych sieci neuronowych (ANN, ang. *artificial neuron network*). Podejście RF używane jest do identyfikacji deskryptorów choroby i opiera się na generowaniu wielu drzew decyzyjnych z niezależnych zbiorów uczących. Wykorzystując to podejście wybrano 14 cech uznanych za najistotniejsze dla modelu. Wykazano, że dla danych uzyskanych za pomocą MALDI-TOF/MS, SM d18:1/18:3 została zidentyfikowana jako zmienna wykazująca najwyższą moc decyzyjną, specyficzną dla próbek uzyskanych od pacjentów z PCa. W przypadku analiz przeprowadzonych za pomocą ESI-Qqq/MS, fosfatydylocholiny zostały zidentyfikowane jako klasa metabolitów różnicujących obie grupy badane. PC 18:1/18:2 jest dodatnio skorelowana z grupą nowotworową, zaś PC 16:0/14:1 i PC 18:1/20:1 były w większości dodatnio skorelowane z grupą kontrolną i ujemnie skorelowane z PCa. Wyselekcjonowane metabolity posłużyły do wykreślenia krzywych ROC, odzwierciedlających dokładność klasyfikacji. Zastosowanie walidacji zgodnie z algorytmem Monte Carlo umożliwiło oszacowanie, zarówno czułości jak i specyficzności proponowanych modeli i wynosiły odpowiednio od 64,5 do 74,2% i od 84,5 do 89,0%.

Zwieńczeniem analizy chemometrycznej było zbudowanie modelu predykcyjnego z zastosowaniem algorytmu sztucznych sieci neuronowych (ANN, ang. *artificial neuron network*). Algorytm ten inspirowany jest neuronami mózgu, w których dane wejściowe

wywołują odpowiedzi reprezentowane przez wagi połączeń międzywarstwowych, wpływających w specyficznym stopniu na wynik końcowy [27].

W przypadku danych uzyskanych za pomocą ESI-QqQ/MS wyselekcjonowano 3 metabolity PC 16:0/18:1, PC 16:0/18:2 i PC 12:0/12:0 przedstawione jako szczególnie cenne z punktu widzenia diagnostyki CaP. Wszystkie te związki były dodatnio skorelowane z grupą nowotworową i ujemnie skorelowane z grupą kontrolną. Odnośnie wyników analizy MALDI-ToF/MS 5 związków wykazywało moc predykcyjną w obszarze diagnostyki CaP. Spośród nich PC 16:0/14:1, LPC 20:3, LPC 17:0, LPC 16:1 i PE 7:0/7:0 były dodatnio skorelowane z próbkami PCa, wykazując negatywny związek z próbkami kontrolnymi. Walidacja uzyskanych wyników wykazała wyższą dokładność modeli zbudowanych dla algorytmu ANN. Wartość parametrów określających dokładność modeli wynosiła odpowiednio 72,5% i 87,5% dla technik ESI-QqQ/MS i MALDI-ToF/MS. Pole powierzchni pod krzywą ROC wykazały, że czułość i specyficzność proponowanego klasyfikatora ANN wahała się od 82,2 do 91,1% i od 64,5 do 96,8%. Rozważając adekwatność parametrów czułości i swoistości, wykazano, że model ANN jest bardziej odpowiedni dla dostępnych danych niż model bazujący na algorytmie RF. Ponadto, niepodważalną zaletą modeli ANN jest wyższa dokładność modelu predykcyjnego w przypadku występowania istotnych zależności nieliniowych czy wysokiego poziomu szumu danych analitycznych.

Zastosowanie dwóch komplementarnych technik umożliwiło uzyskanie charakterystycznego dla raka prostaty profilu fosfolipidów. Analiza półilościowa przeprowadzona za pomocą ESI-QqQ/MS, po której następuje zaawansowana analiza chemometryczna umożliwiła selekcję metabolitów różniących badane grupy w sposób istotny statystycznie. Kompleksowa analiza bazująca na zastosowaniu metabolomiki i analizy chemometrycznej dostarczająca informacji o zmianach metabolicznych zachodzących podczas karcenogenezy.

W efekcie zidentyfikowano cztery grupy związków PC (15 metabolitów), LPC (7 metabolitów), PE (1 metabolit) i SM (3 metabolity), których monitorowanie może być kluczowe do diagnostyki raka prostaty w szczególności we wczesnym, bezobjawowym stadium choroby. Zidentyfikowane metabolity zostały przedstawione na Tabeli 4.

Tabela 4 Fosfolipidy zidentyfikowane jako istotne statystycznie metabolity różnicujące badane grupy wyselekcjonowane w ramach osiągnięcia [H 5].

Związek	Metoda statystyczna		
	Volcano plot	RF	ANN
LPC 16:1			+
LPC 17:0			+
LPC 18:0		+	
LPC 18:1			+
LPC 18:3			+
LPC 20:3			+
LPC 20:4	+	+	+
PC 16:0/14:1		+	+
PC 16:0/16:0			+
PC 16:0/16:1	+	+	+
PC 16:0/18:0		+	
PC 16:0/18:2		+	
PC 16:0/22:6			+
PC 18:0/18:1	+	+	
PC 18:0/22:5	+		+
PC 18:1/18:2	+	+	+
PC 18:1/18:1	+		
PC 18:1/20:0	+	+	
PC 18:1/20:1	+	+	
PC 18:1/20:2	+	+	
PC 18:1/20:3		+	
PC 18:1/24:0		+	
PE 7:0/7:0			+
SM d18:1/16:1			+
SM d18:1/24:0	+	+	
SM d18:1/24:1		+	

Zaproponowane do klinicznego, alternatywne podejście opiera się na połączeniu technik analitycznych i statystycznych, aby lepiej przedstawić odpowiednie relacje między zmiennymi [28]. Niemniej jednak przedstawiona strategia ma wartość eksploracyjną. Umożliwia wskazanie cech różnicujących oba stany, które należy poddać eksperymentalnym procedurom walidacji w celu potwierdzenia ich statusu jako potencjalnych deskryptorów CaP. Ponadto pozostaje niejasne, czy obserwowane zmiany metaboliczne są spowodowane przeprogramowaniem AR, czy też to zmiana metabolomu prowadzi do przeprogramowania aktywności AR. Z tego powodu niniejsze badanie skupiło się na wykazaniu zmian w syntezie i katabolizmie lipidów w CaP. Wykorzystanie dwóch platform analitycznych potwierdziło zaburzenia lipidomu związane z rozwojem choroby nowotworowej. Ponieważ liczne publikacje opisują rolę lipidów w postawaniu CaP, wiele prac ma na celu poprawę efektywności analizy lipidów przy użyciu zarówno różnych technik analitycznych jak i matryc biologicznych.

Kontynuacją badań były eksperymenty opisane jako osiągnięcie **H6**. Wykazane zaburzenia w metabolizmie i biosyntezie fosfolipidów przyczyniły się do poszukiwania specyficznych wskaźników CaP w różnych matrycach biologicznych. Poszukiwanie nowych deskryptorów danej choroby nowotworowej ma na celu zwiększenie czułości i specyficzności danej metody diagnostycznej. W praktyce, metoda ta powinna bazować na mało inwazyjnym materiale biologicznym. Dlatego też celem osiągnięcia **H6** było opracowanie i optymalizacja protokołu przygotowania próbki oraz metody MALDI-TOF/MS do oznaczania profilu lipidomicznego w próbkach moczu. Niezaprzeczalnym atutem moczu, jako matrycy biologicznej, jest jego wysoka dostępność i bezinwazyjność pobierania materiału. Mocz jest też swoistym odzwierciedleniem wszystkich procesów komórkowych. Z tego punktu widzenia, zawiera on całe spektrum metabolitów powstałych wskutek reakcji biochemicznych przebiegających w naszym organizmie. Dlatego też, do profilowania lipidomicznego niezbędne jest rzetelne przygotowanie próbki, które umożliwi ekstrakcję danej grupy związków, a co za tym idzie poszukiwanie nowych markerów CaP.

Zawartość lipidów w próbkach biologicznych jest ważnym parametrem stosowanym w wielu badaniach biochemicznych i fizjologicznych. Tradycyjnie ekstrakcja lipidów odbywa się za pomocą metodyki zaproponowanej przez Folcha [29] lub Metoda Bligha i Dyera [19]. Pierwszym celem osiągnięcia **H6** było opracowanie protokołu przygotowania próbki do analiz MALDI-TOF/MS. Niezbędnym etapem było porównanie procedury ekstrakcji na efektywność izolacji analitów z próbek moczu. Ponadto, sprawdzano wpływ danej matrycy na efektywność jonizacji. Jednym z głównym parametrów warunkujących rzetelność analiz i efektywność procesu jonizacji jest zastosowana matryca. Użycie specyficznej matrycy nie tylko poprawia transfer energii, ale także umożliwia jonizację i desorpcję analitów [30, 31]. Wcześniejsze badania [32, 33] opisują zastosowanie takich matryc jak kwas 2, 5-dihydroksybenzoesowy (DHB); kwas α-cyjano-4-hydroksycynamonowy (HCCA); i 6,7-dihydroksykumaryna (eskuletyna). Pomimo kilku doniesień, mechanizm jonizacji w zależności od zastosowanej matrycy i konkretnej próbki biologicznej nie został poznany. Problem jest wciąż aktualny i tym bardziej ważny w przypadku lipidów, ze względu na odmienne właściwości fizykochemiczne, które są konsekwencją obecności różnych grup funkcyjnych. Z punktu widzenia analitycznego przekłada się to na ograniczenie efektywności desorpcji i jonizacji. Dlatego też niezbędne było badanie wpływu danej matrycy na efektywność jonizacji metabolitów wyizolowanych z próbek moczu. Finalnie opracowana metoda analityczna umożliwiła badanie zmian składu lipidowego w dwóch badanych grupach. Do badania zakwalifikowano 139 pacjentów od których pobrano materiał biologiczny. Próbki te zostały sklasyfikowane w odniesieniu do stopnia

zaawansowania nowotworu opisanego za pomocą dwóch niezależnych klas tj. skali Gleasona oraz skali pTNM. W efekcie uzyskano 5 grup badawczych, w obrębie których monitorowano zmiany zachodzące w profilach lipidomicznych. Pierwszą - grupę kontrolną stanowili pacjenci ze zdiagnozowanym łagodnym przerostem gruczołu krokowego. Druga zawierała 31 próbek pobranych od pacjentów z wynikiem w skali Gleasona niższy niż 6. Trzecia zawierała 62 próbki, których suma w skali Gleasona wynosiła 7, zaś czwarta grupa składała się z 26 próbek z ustalonym wynikiem Gleasona wyższym niż 7. Drugiej klasyfikacji dokonano w oparciu o stadium zaawansowania nowotworu w odniesieniu do pierwotnego opisu guza. Pierwsza grupa opierała się na 18 próbkach uzyskanych od pacjentów zakwalifikowanych do grupy kontrolnej, druga zawierała 18 przypadków opisanych jako drugie stadium zaawansowania nowotworu, której cechą charakterystyczną jest obecność komórek nowotworowych tylko w jednym płacie prostaty. Trzecia grupa obejmowała 70 próbek opisanych jako średnio zawansowany stopień nowotworu, którego komórki zostały wykryte w obu płatach prostaty. Ostatnia zaś zawierała 33 próbki od pacjentów z zaawansowanym stanem nowotworu. Każdy z pacjentów włączony do badania miał oznaczony panel wskaźników biochemicznych obejmujących oznaczanie cholesterolu, lipidogramu oraz prolaktyny. Pierwszy etap obejmował określenie wpływu metody ekstrakcji lipidów oraz stosowanej matrycy na profil lipidomiczny. Próbki moczu zostały poddane ekstrakcji za pomocą dwóch procedur dedykowanych izolacji związków lipidowych z matrycy biologicznej. Tak przygotowane ekstrakty odparowano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu. W kolejnym etapie próbkę naniesiono na spot a następnie pokryto wyselekcjonowaną matrycą. Anality oznaczano za pomocą MALDI-ToF/MS, gdzie widma zbierano w zakresie mas od 60 do 1500 Da. Ponadto zastosowano procedurę MALDI- ToF- LIFT w celu rozpoznania mechanizmu fragmentacji związków.

W tym celu zbudowano bazę danych zawierającą sygnały pochodzące od 200 najpowszechniejszych jonów. Dane analityczne zostały poddane jedno- i wielowymiarowej analizie statystycznej. W pierwszej kolejności dane zostały przedstawione i znormalizowane za pomocą analizy typu *gel view*, która umożliwia wizualizację ogólnego trendu danych. Wyniki wskazują na różnice profili metabolicznych uzyskanych dzięki zastosowaniu dwóch różnych metod ekstrakcji. Analiza wskazała, że w przypadku obu stosowanych protokołów liczba wyizolowanych metabolitów jest porównywalna. Ponadto, analiza *gel view* wskazała na obszary specyficzne dla każdej z zastosowanych metod, jak również obszar odpowiadający wspólnym związkom dla obu stosowanych metod ekstrakcji. Znaczące różnice wykazano w przypadku zastosowania dwóch typów matrycy. Wyniki potwierdziły, że zarówno intensywność i liczba sygnałów jest znacznie wyższa w przypadku zastosowania matrycy

HCCA. Potwierdza to hipotezę jak duży wpływ na profil lipidomiczny ma dobór właściwej matrycy. Wykazano, że w przypadku zastosowania matrycy DHB niemożliwa jest detekcja związków o masie zawierającej się w przedziale *m/z* = 700-1300. Przeprowadzona analiza korelacji została wykorzystana do oceny stopnia podobieństwa uzyskanych profili lipidów dla każdego zestawu parametrów analitycznych. Uzyskane wyniki wskazały, że zastosowanie matrycy HCCA umożliwia wzrost wydajności procesy bardziej wydajną jonizację charakterystycznych cząsteczek. W efekcie dzięki zastosowaniu tej matrycy możliwe jest oznaczenie większego spektrum profili lipidomicznych.

Uzyskane dane zostały poddane analizie klastrów, dzięki której możliwe jest identyfikacja zmiennych, które w sposób nieoczywisty różnicują analizowane dane. Ponadto, analiza chemometryczna została rozszerzona o algorytm samoorganizujących się mapy (SOM) tworzą umożliwiają uproszczoną reprezentację wielowymiarowych danych. Zarówno analiza korelacji, jak i SOM sugeruje, że zastosowanie ekstrakcji wg. Bligh i Dyer oraz HCCA jako matrycy jest kompatybilne z oznaczaniem związków lipidowych w próbkach moczu z zastosowaniem MALDI-ToF/MS. Zastosowanie metody Bligh i Dyera prowadzi do uzyskania bogatszego profilu lipidomicznego próbek moczu, zaś matryca HCCA potęguje jonizację związków lipidowych. W celu identyfikacji sygnałów różnicujących obie analizowane grupy zastosowano algorytm drzew decyzyjnych. W przypadku zastosowanie metody Folcha z matrycą HCCA wykazano, że jony *m/z* 580, 905 i 1156 (wartość *rho* mieściła się w zakresie od 0,31 do 0,34 oraz wartość *p* wahała się od $7{,}9*10^{-5}$ do $2{,}0*10^{-4}$) różnicowała dwie grupy. W przypadku zastosowania metody Folcha związanej z macierzą DHB wyselekcjonowano następujące jony: m/z 373, 871, 949 i 1186 (zakres wartości *rho* od 0,30 do 0,33, a wartość *p* wahała się od $2{,}0*10^{-4}$ do $6{,}3*10^{-4}$).

Wykazano, że jon *m/z* 512 jest skorelowany z wcześniejszym stadium guza, zaś jon *m/z* 198 i 193 wydają się być specyficzne dla wskaźnika Gleasona wynoszącego 7. Ponadto jony *m/z* 799, 273, 822 i 747 zostały uznane za specyficzne dla zaawansowanego stadium CaP. Analiza chemometryczna umożliwiła również identyfikację jonu *m/z* 404 jako jonu specyficznego dla raka prostaty. Jon ten został zidentyfikowany jako dyskryminujący dla różnych stadiów klinicznych (Gleason = 7 lub >7).

Wyniki badań potwierdzają, że największy wpływ na zidentyfikowane jony różnicujące ma zastosowana matryca. To jej wybór determinuje grupy związków, które mogą być oznaczone. Według danych literaturowych zastosowanie matryc jak DHB i HCCA umożliwia oznaczenie prawie wszystkich klas lipidów, od niepolarnych (np. TG) [33,34] do wysoce polarnych (np.

PI. Jest to konsekwencją odmiennego charakteru krystalizacji, struktury zastosowanych matryc oraz różnego powinowactwa lipofilowego do lipidów [36].

Uzyskane dane zostały również poddane analizie korelacji, której celem było określenie wpływu poszczególnych zmiennych biochemicznych jak całkowity cholesterol czy jego poszczególne frakcje na profil lipidomiczny. Przeprowadzona analiza korelacji wykazała silną dodatnią korelację między lipoproteinami o niskiej gęstości (LDL) i całkowitym poziomem cholesterolu (TCh) (rho = 0,94, $p = 1*10^{-10}$) oraz umiarkowaną ujemną korelację między lipoproteinami o wysokiej gęstości (HDL) i całkowitym poziomem trójglicerydów (TGs) (rho = – 0,42, $p = 4*10^{-8}$). Ponadto wykazano korelację pomiędzy PRL a poszczególnymi jonami pochodzącymi od lipidów.

W ostatnim etapie przeprowadzono analizy z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas w celu identyfikacji związków lipidowych w moczu poprzez badanie ich szlaków fragmentacji w trybie LIFT. Ponadto, przeprowadzenie analizy fragmentacyjnej dostarczyło wiedzy w obszarze molekularnego patomechanizmu raka prostaty, co może wspomagać diagnostykę tej choroby w jej wczesnym etapie.

Wyniki badań wskazują, że zmiana profilu lipidomicznego jest nie tylko konsekwencją rozwoju nowotworu ale jest również specyficzna w odniesieniu do stopnia zaawansowania choroby.

W przypadku wczesnego stadium raka (stadium 1) zidentyfikowano pięć lipidomicznych metabolitów dyskryminujących analizowane grupy. Wśród nich wyróżnić można cztery fosfatydylocholiny: PC (38:6), PC (26:0), PC (36:5), PC (36:5) i jedną lizofosfatydiloetanioloamina (LPE 18:0). W przypadku średniozaawansowanego stadium choroby dwie fosfatydylocholiny, czyli PC (36:4) i PC (36:5) zostały uznane jako specyficzne metabolity lipidowe. Ponadto, dla średniozaawansowanego stadium choroby oznaczono podwyższony poziom TD 46:1 w porównaniu z innymi stadiami PCa. Analiza korelacji z późnym stadium raka umożliwiła identyfikację PC(36:0) i LPC (18:0) jako specyficznych deskryptorów tej fazy choroby.

Większość zidentyfikowanych związków należy do grupy fosfatydylocholiny i fosfocholin, które są podstawowymi składnikami błony lipidowej. Stąd też związki te są również zaangażowane w kilka procesów komórkowych, w tym metabolizm i sygnalizację. Warto jednak zauważyć, że biosynteza i rozkład fosfatydylocholiny jest regulowany przez dwa przeciwstawne szlaki kontrolujące proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek. Jedna ze ścieżek polega na fosforylacji choliny do fosfocholiny, a następnie konwersję do cytykoliny (CDP-choliny). Ta ścieżka jest preferencyjna w przypadku zwierząt i odgrywa kluczową rolę w formowaniu błony dwuskładnikowej nowo powstałych komórek nowotworowych.

W przypadku komórki nowotworowej podwyższony poziom choliny można wytłumaczyć jako konsekwencją wzrastającego poziomu kwasów tłuszczowych, które są wykorzystywane do syntezy fosfolipidów [**H5**, 37].

W przypadku wczesnego i średniego stadium raka, nienasycone fosfatydylocholiny zostały uznane za najbardziej dyskryminujące metabolity lipidomiczne, natomiast dwa nasycone metabolity zostały wybrane jako specyficzne dla zaawansowanego stadium nowotworu.

Związki te mogą brać udział w procesie utleniania lipidów, a zjawisko to może być nasilone w komórce rakowej i powodować degradację lipidów.

Innym metabolitem różnicującym badane grupy jest lizofosfatydyloetanoloamina. LPE nie oznaczono we wczesnym stadium raka, natomiast jej obecność stwierdzono w przypadku średniego i późnego stadium choroby. LPE jest jednym z kluczowych metabolitów biorących udział w szlaku sygnałowym różnych typów komórek. Ponadto zakłada się, że LPE jest odpowiedzialne za aktywację szlaku enzymów sygnałowych [37,38].

Wykazano, że LPE ma bezpośredni wpływ na proces nowotworowy [38]. LPE stymuluje migrację i inwazję komórek rakowych. Wyniki wskazują, że LPE indukuje wzrost jonów wapnia wewnątrz komórki, jednak w porównaniu z LPA, jego wpływ jest znacznie słabszy. Dodatkowo opisano, że zjawisko zachodzi z wykorzystaniem receptora LPA1 [39]. W tym badaniu opracowano warunki analizy za pomocą MALDI-TOF/MS jako nowej i szybkiej metody oznaczania lipidów w próbkach moczu pacjentów z CaP. Lipidy zostały wyekstrahowane przez dwa różne protokoły opracowane przez Folcha i Bligha & Dyera. Obie metody wykazują duże podobieństwo pod względem uzyskanych profili lipidowych. Dodatkowo sprawdzono dwie różne matryce i ich wpływ na rozdział jonów za pomocą MALDI-TOF/TOF-MS. Zastosowane matryce skutecznie jonizują próbki lipidów. Zastosowanie HCCA zapewnia określenie większej liczby sygnałów i większej ich intensywności. Zgodnie z naszymi wynikami, metoda Bligha i Dyera wraz z zastosowaniem HCCA jest obiecującym protokołem przygotowania próbki do analizy lipidomicznej.

Ponadto, przeprowadzono fragmentację lipidów za pomocą MS/MS, co pozwoliło na opisanie szlaków fragmentacji 5 klas lipidów: LPC, PC, PI, PE i TG.

Podsumowując, zaproponowana w niniejszym opracowaniu metoda umożliwia skuteczną, prostą i szybką identyfikację składników lipidowych w ludzkim moczu. Ponadto zastosowanie opracowanych metod umożliwia szczegółową charakterystykę fragmentacji poszczególnych klas lipidów.

Zastosowana technika MALDI-ToF/MS wydaje się obiecującym narzędziem w diagnostyce i prognozowaniu CaP poprzez analizę profilu lipidowego.

Wiele badań w poszukiwania biomarkerów raka prostaty było przeprowadzonych z wykorzystaniem osocza lub moczu, ale tylko nieliczne koncentrowały się na analizie płynu nasiennego [40 - 42]. Oprócz nasienia, które stanowi około 1% składu ejakulatu, zawiera również wydzieliny gruczołów układu moczowo-płciowego, wśród których wyróżnić można: sperminę i spermidynę - związki z grupy poliamin, kadawerynę - odpowiedzialne za zapach i smak spermy, kwas askorbinowy, cytrynian, prostaglandyny, enzymy, aminokwasy, hormony steroidowe, kobalamina, fruktoza, mocznik, cholesterol, minerały (potas, cynk i wapń) . W poprzednich badaniach wykazano, że markery molekularne i metabolomiczne w ejakulacie lub płynie nasiennym poprawiają diagnostykę w porównaniu z oznaczamiem PSA w surowicy [44-46]. Jest to niejako konsekwencją wydzielniczych funkcji prostaty. Jedna z nich jest wydzielanie specyficznego antygenu prostaty. Pomimo, faktu że białko to jest produkowane przez gruczoł, jego 5-6 krotnie wyższe stężenie oznaczono w płynie nasiennym niż w surowicy krwi [47]. Złośliwe komórki nabłonka gruczołu krokowego i ich produkty mogą dostać się do krążenia dopiero po przekroczeniu bariery krew-tkanka, podczas gdy wydzieliny mogą w fizjologiczny sposób mogą migrować do płynu nasiennego. Z tego powodu można założyć, że poziom niektórych metabolitów może być wyższy w ejakulacie niż w innych matrycach biologicznych. Z klinicznego punktu widzenia sugeruje to, że niektóre biomarkery można wykryć w płynie nasiennym znacznie wcześniej niż we krwi. Ze względu na funkcje wydzielnicze prostaty, płyn nasienny może również zawierać komórki rakowe. Dlatego zmiany w profilach metabolicznych można wykryć znacznie szybciej w próbkach nasienia niż w tradycyjnych badaniach histopatologicznych. Dlatego tez głównym celem osiągnięcie **H8** była charakterystyka metaboliczna nasienia jako alternatywnej matrycy biologicznej dedykowanej analizie metabolomicznej. Ze względu na ograniczoną wiedzę na temat ejakulatu jako matrycy biologicznej do analiz metabolomicznych niezbędne było przeprowadzenie badań podstawowych. Pierwsza część naszych badań dotyczyła określenia profilu metabolicznego ejakulatu. Ze względu na fakt, że zastosowanie ejakulatu w badaniach metabolomicznych jest **pionierskim podejściem**, konieczne było przygotowanie protokołu opracowania i przygotowania próbki. Etap przygotowania próbki jest kluczowy i stanowi wyzwanie analityczne. Ten etap powinien obejmować ekstrakcję metabolitów, która obejmuje szerokie spektrum właściwości fizykochemicznych. Z drugiej strony protokół przygotowania powinien wykluczać ingerencje, które doprowadziły do zaburzenia profilu. Ma to jeszcze większe znaczenie w niecelowanym podejściu metabolomicznym, skupiającym się na oznaczeniu złożonego profilu molekularnego analizowanych próbek.

W celu charakterystyki tego materiału biologicznego przeprowadzono badania metabolomu nasienia a wyniki porównano z metabolomem osocza i moczu oznaczonym od tych samych pacjentów. Przeprowadzenie niecelowanej analizy nasienia wymagało jednak opracowania metody przygotowania próbki tej matrycy. Pomimo rozwoju wielu technik ekstrakcji, nadal najszerzej stosowana jest ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE). Poprzez dobór takich parametrów jak rodzaj czy objętość rozpuszczalnika proces może być kontrolowany i selektywny.

Dlatego też w osiągnięcia **H8** opracowano i zoptymalizowano wydajną metodę ekstrakcji związków niskocząsteczkowych z ludzkiego nasienia, odpowiedniej do badań metabolomicznych. Ponadto przeprowadzono niecelowaną analizę metabolomiczną próbek biologicznych uzyskanych od pacjentów ze zdiagnozowanym CaP. W tym celu wykorzystano trzy rodzaje matryc, a mianowicie ejakulat, surowicę i mocz. Charakterystykę unikalnego metabolomu przeprowadzono z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-ESI-TOF/MS) oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-EI-QqQ/MS).

Osiągniecie to wpisuje się w najnowsze trendy analizy metabolomicznej i jest jednym z pierwszych badań na świecie, w którym próbki ejakulatu zostały przeanalizowane przy użyciu podejścia metabolomicznego i porównane z dwiema innymi macierzami.

Dzięki przeprowadzonym analizom możliwa jest weryfikacja hipotezy o zwiększonym poziomie metabolitów w próbkach ejakulatu, który można powiązać z rozwojem CaP.

Pierwszy etap obejmował optymalizację porcedury przygotowania próbki nasienie. W tym celu testowano 12 wariantów ekstrakcyjnych różniących się zarówno typem i objętością rozpuszczalnika ekstrakcyjnego jak również czasem inkubacji. W badaniu wpływu rozpuszczalnika na profil metabolomiczny testowano czysty metanol, czysty aceton oraz mieszaninę metanol:etanol (1:1, *v/v*). Ponadto oceniono wpływ objętości rozpuszczalnika (300 and 600 µL) oraz czasu inkubacji (15 min i 30 min) na skład jakościowy profilu nasienia. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (HPLC-MS, ang. *high pressure liquid chromatography coupled with mass spectrometry*). Uzyskane dane zostały poddane procesowaniu obejmującemu filtrowanie w oparciu o kryteria jakości jak również normalizacji MSTUS (normalizacja względem sumy intensywności sygnałów pochodzącym od metabolitów oznaczonych w danej próbce). Wyselekcjonowano metabolity, które zostały określone w każdym powtórzeniu dla każdej z badanych metod przygotowania próbki oraz związki, których obliczony współczynnik zmienności dla 3 powtórzeń był mniejszy niż 30%. Zastosowanie powyżej opisanego algorytmu umożliwiło porównanie zastosowanych protokołów

przygotowania próbki. Wykazano, że zastosowanie czystego metanolu jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego pozwala na wyizolowanie największej liczby metabolitów. Metody oparte na ekstrakcji metanolem charakteryzowały się też najwyższą powtarzalnością (CV<30%). W efekcie metanol został wybrany do procesu przygotowania próbki

W kolejnym kroku uwzględniono wpływ czasu inkubacji (15 min lub 30 min). Niezaprzeczalnie w każdym zastosowanym wariacie najwyższą wydajność deprotenizacji uzyskano w czasie 15 min inkubacji. Podobnie badanie przeprowadzono w oparciu o objętość rozpuszczalnika. Wykazano, że wyższa powtarzalność i bogatsze profile uzyskano stosując 300 µl rozpuszczalnika. Zastosowanie większej objętości rozpuszczalnika spowodowało redukcją ok 38% metabolitów oznaczonym w danym profilu. Finalnie metoda oparta na zastosowaniu 300 µl metanolu i 15 min inkubacji próbki została uznana za najbardziej kompatybilną metodę do analiz metabolicznych. Opracowana procedura została wykorzystana do niecelowanej analizy metabolomicznej z wykorzystaniem dwóch komplementarnych technik analitycznych. W tym celu próbki moczu, osocza i nasienia zostały przygotowane w oparciu o wcześniej opracowane już protokoły przygotowania próbki [H2,H5]. W przypadku próbek osocza i moczu procedura obejmowała deprotenizację jak również dodatek wzorca wewnętrznego. Analizę metabolomiczną przeprowadzono przy użyciu dwóch komplementarnych technik analitycznych. W przypadku analizy HPLC fazę ruchomą stanowiła mieszanina 0,1% wodnego roztworu kwasu mrówkowego (A) i 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B). Analizy przeprowadzono w trybie elucji gradientowej. Skład początkowy wynosił 2% B i wzrastał do 98% w ciągu 25 min, utrzymując skład fazy ruchomej 2% A i 98% B przez okres10 min. Metabolity uległy rozdzieleniu przy użyciu kolumny Ascentis Express-C18 pracującej w modusie faz odwróconych (RP, *ang. reverse phase*) (4,6 mm x 1500 mm, 2,7 µm; Bellefonte, PA, USA) w ciągu 35 min. Analizy prowadzono w trybie przemiatania, a widma rejestrowano w zakresie mas od 50 do 1100 m/z w trybie dodatnim.

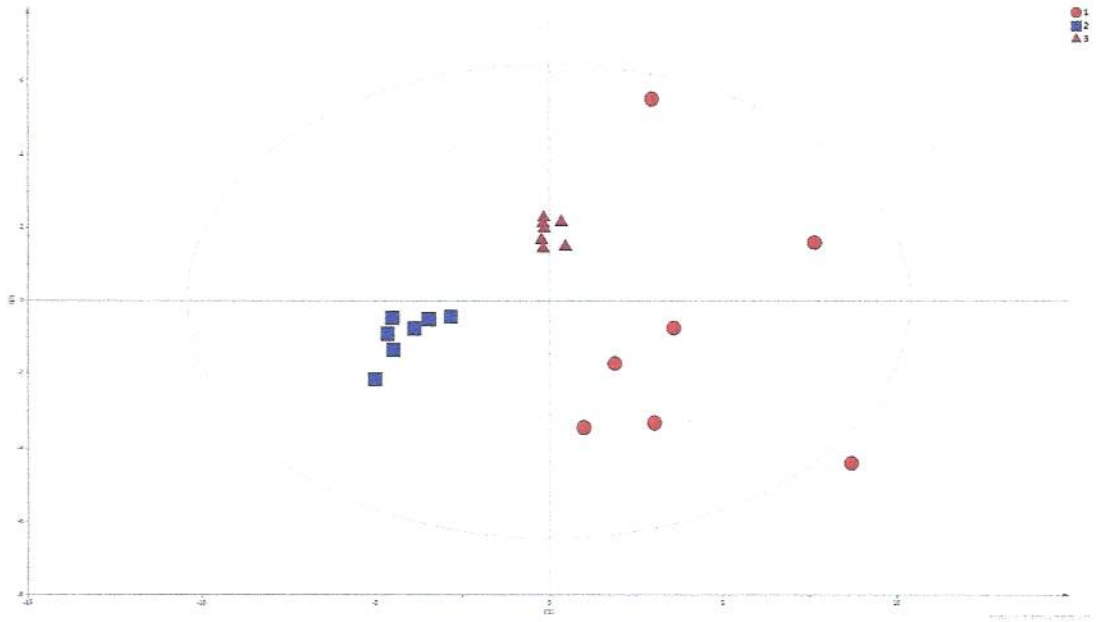
Drugą metodą komplementarną było przeprowadzenie analiz z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Zastosowanie chromatografii gazowej wymagało przeprowadzenie procesu derywatyzacji w oparciu o reakcję sililacji. Uzyskane dla obu technik dane poddano filtrowaniu w oparciu o częstość występowania i normalizacji opartej na algorytmie MSGUS (MS *Group Useful Signal*), gdzie współczynnik normalizacji jest średnią wartością intensywności dla każdego związku obecnego w 100% analizowanych próbek. Otrzymane zbiory danych poddano analizie statystycznej obejmującej analizę ANOVA oraz testy post hoc, dzięki którym możliwe jest wskazanie metabolitów, różnicujących analizowane profile specyficzne dla danych matryc biologicznych. Uzyskane wyniki zostały poddane

walidacji z użyciem algorytmu FDR. Miało to na celu zminimalizowanie ryzyka fałszywie dodatnich wyników. Zmienne istotne statystycznie zidentyfikowano przypuszczalnie na podstawie masy monoizotopowej, rozkładu izotopów, a także danych ujętych w publicznie dostępnych bazach danych. W przypadku analitów oznaczonych za pomocą GC-MS identyfikację przeprowadzono w oparciu o bibliotekę NIST i parametry retencyjne jak czas retencji i indeks retencji.

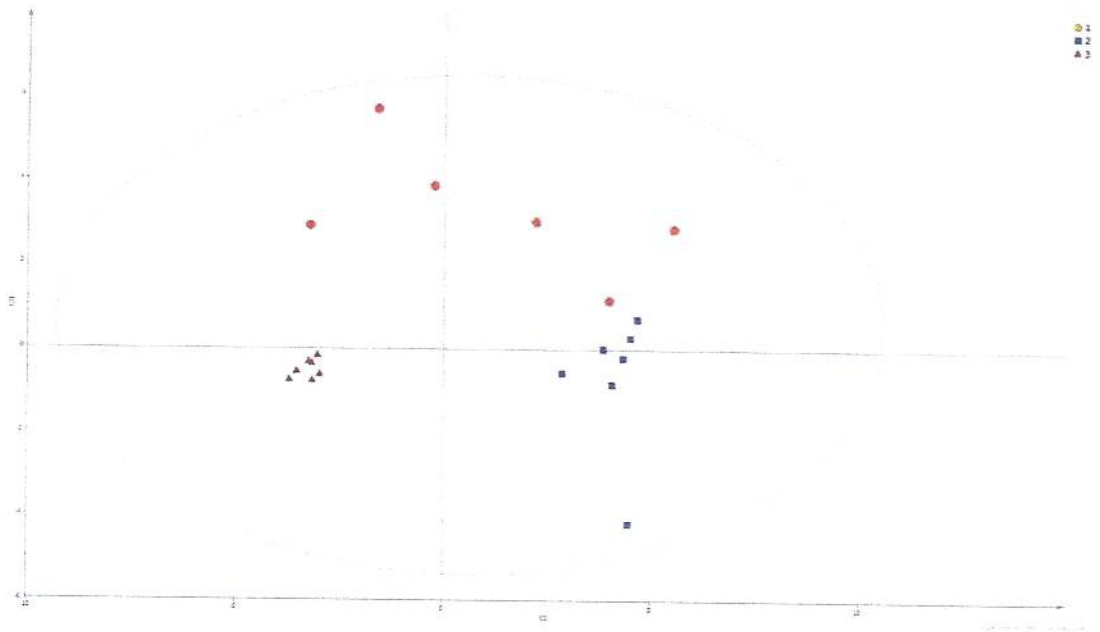
Zastosowanie dwóch komplementarnych technik analitycznych umożliwiło uzyskanie specyficznego profilu metabolomicznego próbek ejakulatu. Wykorzystanie LC-ESI-TOF/MS umożliwiło zidentyfikowano 124 zmienne za pomocą LC-ESI-TOF/MS. Wśród nich odnotowano fosfolipidy (30%), karnityny (12%) aminokwasy (6%), kwasy tłuszczowe (24%), sterole (3%), sfinganiny (4%) i glicerydy (4%). Najliczniejszą grupę związków stanowiły fosfolipidy i kwasy tłuszczowe. Dowodzi to, że ejakulat jest macierzą bogatą w związki tłuszczowe. Podobne wyniki uzyskano stosując drugie podejście analityczne, a mianowicie GC-EI-QQQ/MS. Zastosowanie chromatografii gazowej pozwoliło na oznaczenie 37 związków podzielonych na 4 klasy związków jak: kwasy tłuszczowe, aminokwasy, jeden sterol oraz cukier i jego pochodne.

Wskutek przeprowadzonych badań oznaczono specyficzny profil metaboliczny nasienia. Ponadto, uzyskane profile metaboliczne poddano analizie PCA, a jego graficzny wynik został przedstawiony na Rys. 7 A: dla danych uzyskanych za pomocą techniki HPLC-ToF/MS i 7B dla danych uzyskanych za pomocą GC-Qqq/MS.

A)



B)



Rys. 7 Modele PCA zbudowane na danych uzyskanych za pomocą LC-ESI-TOF/MS w trybie dodatnim oraz techniki GC-EI-QqQ/MS. Obliczone współczynniki R^2 wynosiły $R^2 = 0{,}725$ i $R^2 = 0{,}736$ odpowiednio dla LC-MS w trybie jonizacji dodatniej i GC-MS. Próbki ejakulatu są oznaczone czerwonymi kółkami (1). Niebieskie kwadraty (2) odpowiadają próbkom moczu, natomiast próbki surowicy (3) są zaznaczone czerwonymi trójkątami.

Dzięki zbudowaniu modelu PCa możemy zauważyć, że próbki grupują się w trzy oddzielne klastry, które odpowiadają odpowiednio próbkom osocza (czerwone trójkąty), próbkom moczu (niebieskie kwadraty)i próbkom ejakulatu (czerwone kółka). Oznacza to, że każda z matryc ma swoje charakterystyczne zmiany w profilach molekularnych, co pozwala na oznaczenie określonych grup związków. Analiza próbek surowicy umożliwiła oznaczenie szerokiego spektrum związków o różnych właściwościach fizykochemicznych. Próbki ejakulatu są bogate w związki tłuszczowe, sterole i cukry, natomiast związki polarne są specyficzne dla próbek moczu. Bazując na modelu PCA możemy zauważyć, że klaster odpowiadający próbkom ejakulatu jest rozproszony. Pozwala to przypuszczać, że profile metaboliczne próbek ejakulatu są zróżnicowane pod kątem składu jakościowego. W kolejnym etapie badań dokonano analizy podobieństw i różnic profili uzyskanych dla trzech analizowanych matryc. Zastosowanie analizy *Anova* wraz z testem *post hoc* Fishera umożliwiło oznaczenie 40 zmiennych różnicujących profile analizowanych grup w sposób istotnie statystyczny. Ponadto porównano profil metaboliczny trzech badanych matryc w celu weryfikacji hipotezy o podwyższonym poziomie metabolitów w próbkach ejakulatu,

związanym z rozwojem CaP. W tym celu wyselekcjonowano metabolity obecne we wszystkich trzech analizowanych typach matryc. Porównanie poziomów poszczególnych metabolitów wskazuje na duże podobieństwo między profilami ejakulatu i osocza. W obu przypadkach główny skład oparty jest na kwasach tłuszczowych, aminokwasach, cukrach i ich pochodnych, fosfolipidach, karnitynach i sfingozynach. Zastosowanie dwóch uzupełniających się technik analitycznych pozwoliło na uzyskanie złożonego profilu metabolicznego. Należy jednak zaznaczyć, że poziomy większości grup związków były podwyższone w próbce surowicy, a nie w ejakulacie. Jedynie poziomy fosfolipidów i sfinganin były wyższe w próbkach ejakulatu, a nie w surowicy.

Odcisk palca próbki ejakulatu również jest zbieżny z profilem metabolicznym próbek moczu, zwłaszcza pod względem związków polarnych. Jednak podobnie jak w poprzednich obserwacjach poziomy metabolitów są podwyższone w przypadku próbek moczu. Mocz to macierz charakteryzująca się unikalnym profilem metabolicznym, składającym się głównie z bardziej polarnych metabolitów. Z tego powodu odnotowano najwyższe poziomy kwasów organicznych i karnityny.

W obu przypadkach różnice są znaczące i nie potwierdzają hipotezy o podwyższonych stężeniach poszczególnych grup metabolitów związanych z CaP w ejakulacie. Z drugiej strony należy podkreślić, że ejakulat to głównie związki tłuszczowe, dlatego też wiarygodność hipotezy powinna być sprawdzona właśnie na tej grupie związków Ponadto należy podkreślić, że otrzymane profile są wyłącznie jakościowe, a nie ilościowe, więc porównanie poziomów oznaczanych metabolitów jest tylko przybliżone.

Niewątpliwie można stwierdzić, że ejakulat jest specyficzną matrycą, noszącą znamiona cech obu pozostałych matryc, czyli moczu i osocza.

Charakterystyka profilu lipidowego raka prostaty była przedmiotem moich badań prowadzonych w ramach osiągnięć naukowych **H1-H7**. W rezultacie badań przeprowadzonych w ramach osiągnięcia **H2**, udało się wyselekcjonować panel metabolitów, który w sposób istotny statystycznie różnicował dwie badane grupy. Wśród nich wyróżnić można kwas cytrynowy jeden z głównych związków cyklu Crebsa. Z biologicznego punktu widzenia cytrynian jest kluczowy w produkcji energii metabolicznej oraz w syntezie cholesterolu, kwasów tłuszczowych, izoprenoidów, steroidów i hormonów (np. prolaktyny). Związki te odgrywają zasadniczą rolę w rozwoju i postępie raka. Przyjmuje się jednak, że to właśnie kwas cytrynowy jest potencjalnym deskryptorem raka prostaty. Potwierdzenie tej hipotezy mogłoby w znaczący sposób wpłynąć na poprawę diagnostyki raka prostaty we wczesnym stadium choroby. Dlatego oznaczanie CA i innych produktów pośrednich cyklu kwasów

trikarboksylowych (cykl Krebsa) w tkankach ludzkich jest odpowiednim podejściem w rozpoznaniu raka prostaty. Głównym celem osiągniecia **H8** było określenie stężenia kwasu cytrynowego w trzech różnych matrycach pobranych zarówno od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty jak również od grupy kontrolnej. Pomimo licznych badań skupiających się na roli kwasu cytrynowego na rozwój raka prostaty, po raz pierwszy metabolit ten został oznaczony w trzech różnych matrycach (tkance, moczu i krwi). Próbki pobrano od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty oraz od wybranej grupy kontrolnej (osoby z łagodną przerostem prostaty). W przypadku tkanki materiał został zabezpieczony i przechowywany do dnia analizy w postaci bloczków parafinowych. Po przeprowadzeniu analizy histopatologicznej, skrawki parafinowe o grubości 20 μm zostały poddane procesowi deparafinizacji. W tym celu zmieniono protokół przygotowania próbki stanowiący osiągnięcie H1. Do deparafininizacji zamiast ksylenu zastosowano komercyjnie dostępny odczynnik do deprafinizacji firmy Qiagen (Bedford, MA, USA). Zmiana procedury deparafinizcji skutkowała wyższą wydajnością procesu, a uzyskany materiał biologiczny był znacznie lepiej oczyszczony z resztek parafiny. Tak uzyskaną tkankę poddano procedurze homogenizacji. W przypadku próbek moczu i osocza próbki po pobraniu były przechowywane w temperaturze -80°C aż do dnia analizy. W dniu analizy zostały rozmrożone i odwirowane. Do oznaczania kwasu cytrynowego wykorzystano dostępny komercyjnie zestaw firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Każdy z materiałów biologicznych został przygotowany zgodnie z procedurą opracowaną przez producenta. Pomiar stężenia oznaczono z zastosowaniem szybkiego testu fluorometrycznego. Dzięki zastosowaniu analizy statystycznej uzyskane wyniki analityczne zostały skorelowano zarówno z danymi histopatologicznymi (skala Gleasona, jak i stopniami zaawansowania pTNM) oraz danymi biochemicznymi (określającymi wartość następujących czynników: specyficzny antygen prostaty, LDL, HDL, cholesterolu całkowitego, kreatyniny i prolaktyny.

Wykazałam, że w przypadku tkanek stężenie kwasu cytrynowego jest niższe u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (0,23 ± 0,16 ng/ml) w stosunku do próbek kontrolnych (0,35± 0,14 ng/ml). Odmienne wyniki uzyskano dla dwóch pozostałych matryc. Analizując próbki osocza jak i moczu oznaczone stężenie kwasu cytrynowego było wyższe w próbkach kontrolnych. W przypadku osocza stężenia wynosiły odpowiednio 1,37 ± 0,37 ng/ml dla pacjentów z CaP oraz 1,11 ± 0,48 ng/ml dla grupy kontrolnej. W przypadku moczu stężenie kwasu cytrynowego było wyższe w próbkach grupy kontrolnej (0,027 ± 0,029 ng/ml) niż u pacjentów z CaP (1,37 ± 0,37 ng/ml). Z punktu widzenia badania molekularnego mechanizmu kancerogenezy oznaczanie kwasu cytrynowego w ekstraktach tkankowych - bezpośrednio w

ognisku choroby, odzwierciedla najbardziej znaczące zmiany. Oznaczanie tego metabolitu we krwi i moczu umożliwiło uzyskanie globalnego poglądu na temat zmian zachodzących w organizmie. Jako zaletę można wymienić nieinwazyjne pobieranie próbek oraz stosunkowo nieograniczony dostęp do materiału biologicznego. Ponadto przeprowadzone badania pozwoliły zweryfikować przydatność CA jako wczesnego wskaźnika PCa.

Ponadto, grupa pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty została podzielona na podgrupy w odniesieniu do stopnia zaawansowania choroby opisanej w skali Gleason i pTNM. Skala pTNM odnosi się do anatomicznego zakresu choroby. Opisuje stopień naciekania pod względem guza, węzłów chłonnych i marginesów. Jest to ogólne założenie, które nie odzwierciedla zmian na poziomie morfologicznym komórki, ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania. Bardziej szczegółowy opis jest możliwy dzięki ocenie w skali Gleasona, która jest bardziej związana z charakterystyką molekularną guza ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania komórek.

Wykazano istotną ujemną korelację między stężeniem kwasu cytrynowego a zaawansowaniem nowotworu opisanego zgodnie z kwalifikacją pTNM (*rho* = -0,14) i w odniesieniu do skali Gleasona (*rho* = - 0,18). W praktyce oznacza to, że im wyższy stopień zaawansowania raka tym niższe stężenie kwasu cytrynowego w ekstrakcie tkankowym (**H7**, 48, 49). Karcenogenezę można scharakteryzować zwiększoną proliferacją komórek rakowych. Z jednej strony rosnące komórki rakowe wymagają dużej ilości źródła węgla, który jest kluczowym budulcem struktur komórkowych. Proliferacja komórek i ich różnicowanie podczas rozwoju nowotworu powoduje zmiany morfologiczne w budowie każdej komórki. Wraz z różnicowaniem struktura błony rozluźnia się bądź rozpada, co powoduje utratę zdolność do akumulacji jonów cynku [48, 50]. Deficyt tego pierwiastka prowadzi do aktywacji akonitazy mitochondrialnej. Wskutek aktywacji dochodzi do utlenienia cytrynianu do izocytrynianu [**H7**, 49]. W tym przypadku następuje poważna zmiana metabolizmu energetycznego, a intensywność zmian jest ściśle skorelowana ze stopniem zróżnicowania komórek nowotworowych. Ostatecznie CA jest przekształcany w izocytrynian, co prowadzi do znacznej redukcji CA w komórce [50,51].

Idąc dalej, oceniono zmiany stężenia CA w stosunku do stadium PCa. Wyniki wskazują, że poziomy CA w tkankach ulegają zmianie wraz z klinicznym stadium zaawansowania raka (skala pTNM) i specyficznymi zmianami morfologicznymi opisanymi w skali Gleasona. W przypadku kryteriów zaawansowania klinicznego zaobserwowano dodatnią korelację. Im wyższy stopień w skali pTNM, tym niższe stężenie CA. W przypadku oceny Gleasona stężenie CA rośnie do Gleasona=7, następnie obserwuje się plateau lub nawet niewielki spadek. Wyniki te odzwierciedlają mechanizm zaproponowany przez Costello et al. [50]. Ponadto uzyskane

wyniki wskazują, że tkankę można uznać za najbardziej wiarygodną matrycę do oceny CA w celu uzyskania diagnozy PCa. Wykorzystanie tkanki pozwala na bezpośrednią ocenę środowiska guza i komórek nowotworowych. Dlatego też wykorzystanie tkanek do oznaczania CA w diagnostyce PCa ma potencjał do zastosowania klinicznego. W przypadku próbek moczu i surowicy stwierdzono odwrotną korelację. W obu matrycach stężenie CA w próbkach kontrolnych było niższe niż w próbkach od pacjentów z PCa. Stężenie tego metabolitu jest wynikiem zmian zachodzącymi w całym organizmie, a nie bezpośrednio w ognisku choroby. Niemniej jednak stężenie CA w próbkach moczu było istotnie większe w całej grupie chorych na raka (p = 0,011). Wykazano również korelację ze stopniem zaawansowania nowotworu, zwłaszcza w zakresie zaawansowania klinicznego (p = 0,0014). Istotność statystyczna stwierdzona w przypadku CA w moczu sugeruje, że jest to obiecujące podejście do nieinwazyjnych i szybkich badań przesiewowych w celu wykrycia PCa. Niemniej jednak uzyskane wyniki wskazują na potencjał kwasu cytrynowego jak deskryptora molekularnego raka prostaty o znaczeniu klinicznym.

W przypadku próbek surowicy stężenie CA było ogólnie wyższe dla grupy nowotworowej; jednak zmiany te nie były znaczące. Ponadto oceniono korelację między stężeniem cytrynianu a stopniem zaawansowania klinicznego. Można zaobserwować, że poziomy CA są wyższe dla próbek PCa w porównaniu z grupą kontrolną. Nieco inaczej zależność wygląda w przypadku uwzględnienia stężenia CA w surowicy i skali Gleasona: stężenie cytrynianu jest wyższe w przypadku próbek PCa, niemniej jednak można zaobserwować, że wraz z postępem nowotworu stężenie cytrynianu zmniejsza się. Ta obserwacja jest komplementarna do danych tkankowych i można ją łatwo wytłumaczyć podobną złożonością tych dwóch matryc, tj. tkanki i krwi.

Przeprowadzona analiza korelacji, potwierdziła słabą negatywną zależność między poziomem CA w tkankach i osoczu (*rho*= -0,25) oraz pomiędzy poziomem CA w tkankach i moczu (*rho*= -0,18). Uzyskane wyniki stężeń kwasu cytrynowego zostały również skorelowane z pozostałymi parametrami biochemicznymi jak całkowity poziom cholesterolu, stężenie poszczególnych frakcji oraz stężenie prolaktyny. W ramach badania przeanalizowano korelację CA z innymi wskaźnikami molekularnymi. Ze względu na fakt, że prostata jest gruczołem powiązanym z hormonami, wpływ hormonów na patogenezę PCa może być istotny. Normalny metabolizm prostaty jest koordynowany przez sygnalizację receptora androgenowego i charakteryzuje się fizjologicznym skróceniem cyklu Krebsa, aby umożliwić produkcję i wydzielanie cytrynianu do płynu gruczołu krokowego [52-54]. Doniesiono, że androgeny, które wiążą się z receptorami androgenowymi, wpływają na rozwój raka prostaty. Chociaż patomechanizm pozostaje nieznany, ostatnie badania wskazują na związek między poziomem

androgenów a cholesterolem [54, 55]. Niewątpliwie androgeny stymulują enzymy lipogeniczne, które powodują zwiększoną syntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Z tego powodu poszukiwanie korelacji między cholesterolem a innymi czynnikami molekularnymi może dostarczyć istotnej wiedzy w zakresie rozwoju i progresji PCa. Rolę cholesterolu w tym mechanizmie można rozpatrywać dwojako. Przede wszystkim cholesterol jest początkowym metabolitem szlaków przemian metabolicznych związanych z hormonami. Z drugiej strony cholesterol można uznać za składnik odżywczy, który dostaje się do organizmu wraz z pożywieniem. Jego stężenie może być związane ze sposobem odżywiania. Monitorując zmiany poziomu cholesterolu i jego frakcji, można zweryfikować hipotezę o jego wpływie na kancerogenezę. Uzyskane wyniki wskazują na podwyższony poziomu cholesterolu i frakcji HDL u pacjentów z PCa. Odwrotne zależność zaobserwowano w przypadku grupy kontrolnej, w której onzaczono niższe stężenie frakcji LDL. W przeciwieństwie do tego, metaanaliza wykazała brak istotnej korelacji między frakcją cholesterolu całkowitego a odpowiednią oceną zaawansowania PCa [H7, 56]. Rozważając rolę cholesterolu w rozwoju i progresji PCa, należy również wziąć pod uwagę rolę prolaktyny. Prolaktyna to hormon przedniego płata przysadki, który wpływa na funkcję kilku narządów; dlatego hormon ten może mieć znaczenie w regulacji poziomu cholesterolu gruczołu krokowego, zwłaszcza wolnego cholesterolu, poprzez stymulujące działanie androgenów [57].

Według literatury prolaktyna stymuluje aktywność wzrostu prostaty, prawdopodobnie ze względu na jej związek z proliferacją komórek prostaty i regulacją procesu angiogenezy [58]. Stwierdzono, że w tkance prostaty obecne są receptory prolaktyny. Ponadto stan przedrakowy tkanki prostaty zawiera zwiększoną ilość tego typu receptorów. Z tego powodu uważa się, że prolaktyna bierze udział w procesie nowotworowym. Uzyskane wyniki wskazują na prawidłowy poziom prolaktyny w obu grupach; jednak w przypadku pacjentów z PCa poziom prolaktyny był wyższy (9,53 ng/ml) niż w grupie kontrolnej (8,51 ng/ml).

Dodatkowo zaobserwowano, że poziom prolaktyny nie był związany ze stadium raka [**H7**, 58]. Autorzy poinformowali, że krążąca prolaktyna nie jest skorelowana ze wzrostem ryzyka PCa. Jak widać, wpływ prolaktyny na rozwój PCa jest wciąż nieznany. Z tego powodu istnieje potrzeba prowadzenia badań na dużym zestawie próbek, ze szczególnym uwzględnieniem roli androgenów. Ponieważ receptor androgenowy reguluje prostatę, jego rola w procesie nowotworowym może być znacznie większa niż oczekiwano.

5. Podsumowanie i dalsze kierunki rozwoju

W ramach niniejszego opracowania przedstawiono nowe metodyki oraz procedury badawcze mające na celu poprawę diagnostyki raka prostaty poprzez poszukiwanie nowych, bardziej wiarygodnych deskryptorów tej choroby. W badaniach wykorzystane były różne matryce biologiczne i techniki analityczne, które umożliwiły oznaczenie specyficznego profilu metabolomicznego. Zaproponowane przeze mnie procedury obejmują wykorzystanie innowacyjnych matryc biologicznych takich jak: skrawki parafinowe czy nasienie w analizach metabolomicznych. Zastosowanie ich w połączeniu z rozbudowana analizą chemometryczna jest wysoce innowacyjne i jak dotąd analizowane tylko w nielicznych jednostkach badawczych. Ponadto, zestawienie uzyskanych danych ze szczegółową oceną histologiczną nie było jak dotąd opisywane w literaturze. Zastosowane metodyki umożliwiły oznaczenie zarówno jakościowego jak i ilościowego profilu lipidomicznego charakterystycznego dla raka prostaty. Uzyskane wyniki dostarczyły wiedzy na temat patomechanizmu raka prostaty, umożliwiły selekcję potencjalnych deskryptorów choroby. Wytypowano szereg metabolitów o potencjalnych właściwościach diagnostycznych, które powinny być brane pod uwagę podczas projektowania nowych narzędzi diagnostycznych.

Za największe osiągnięcia rozprawy uznać można:

1. Opracowanie uniwersalnej metody przygotowania skrawek parafinowych oraz ejakulatu jako innowacyjnych matryc do badań metabolomicznych
2. Pionierskie zastosowania skrawek parafinowych oraz ejakulatu do charakterystyki lipidomu raka prostaty
3. Opracowanie nowatorskiej platformy bioanalitycznej do rozpoznania patomechanizmu raka prostaty poprzez:
    a. charakterystykę profilu lipidomicznego za pomocą niecelowanej analizy lipidomicznej
    b. wyselekcjonowanie fosfolipidów jako specyficznych deskryptorów raka prostaty z wykorzystaniem celowanej analizy lipidomicznej w próbkach tkanki oraz moczu
    c. oznaczenie kwasu cytrynowego jako specyficznego wskaźnika raka prostaty
4. Zaproponowanie mechanizmów jonizacji fosfolipidów z zastosowaniem platformy analitycznej MALDI-ToF/MS.

W ramach dalszych prac naukowych planuję kontynuacje badań w zakresie poszukiwania specyficznych deskryptorów raka prostaty. W przyszłości badania dotyczyć będą :

- określenia roli hormonów steroidowych w rozwoju i progresji raka prostaty,
- określenie wpływu poziomu witaminy D3 zarówno, na rozwój CaP jak i wzmożony proces nowotworzenia
- określenie wpływu metabolitów pochodzenia roślinnego (cyklitoli) o potencjalnym działaniu terapeutycznym na zahamowanie progresji rozwoju raka prostaty.

6. Wykaz stosowanych skrótów

ANN – analiza sztucznych sieci neuronowych
AR - receptor androgenowy
BMI – wskaźnik masy ciała
BSTFA z TMCS - N,O-bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid z trimetylochlorosilanem
CaP - rak prostaty
CV - współczynnik zmienności
DHB - kwas 2, 5-dihydroksybenzoesowy
FAS - syntaza kwasów tłuszczowych
FDR - frakcja fałszywych odkryć
FFPE – skrawki parafinowe tkanki
GC - chromatografia gazowa
GC–QqQ/MS – technika chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometria mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol
HCCA - kwas α-cyjano-4-hydroksycynamonowy
HDL - lipoproteinami o wysokiej gęstości
HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa
LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości
LIFT – fragmentacja laserowa
LLE - ekstrakcja ciecz-ciecz
LPC – lisofosfatydylocholiny
MALDI - jonizacja wspomagana matrycą
MALDI-ToF/MS - technika jonizacji wzbogacanej matrycą sprzężonej ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu
MRM - monitorowanie reakcji wielokrotnych fragmentacji

MS – spektrometria mas

PC- fosfatydylocholiny

PCA - analiza głównych składowych

PCA3 - genu PCA3

PE – fosfatydyloetanoloaminy

PE - fosfatydyloetanoloaminy (PE)

PLS-DA - analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną

PSA - specyficzny antygen prostaty

pTNM – klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworu

RF – analiza drzew decyzyjnych

ROC – krzywa ROC

RP – modus faz odwróconych

SCAN - tryb pełnego skanowania

SIM – monitorowanie wybranych jonów

SM - sfingomieliny

SOM - samoorganizujące się mapy

SR – współczynnik selektywności

TCh - całkowity poziom cholesterolu

TGs – trójglicerydy

VIP – zmienne istotne dla projekcji

7. Literatura

1. Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol., 2002, 48: 155-171.
2. Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. Trends Biotechnol. 1998, 16: 373–378.
3. Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica, 1999, 29: 1181–1189.
4. Lu C., Thompson C.B. Metabolic regulation of epigenetics. Cell Metab. 2012, 16: 9-17.
5. Wellen K., Thompson C. A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13: 270–276.

6. Johnson C.H., Ivanisevic J., Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2016, 17: 451-459.
7. Duft R.G., Castro A., Bonfante I.L.P., Brunelli D.T., Chacon-Mikahil M.P.T., Cavaglieri C.R. Metabolomics approach in the investigation of metabolic changes in obese men after 24 weeks of combined training. J. Proteome Res., 2017, 16: 2151-2159.
8. Clish, Clary B. "Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. Cold Spring Harb Mol Case Stud., 2015, 1:a000588.
9. Ellis D.I., Dunn W.B., Griffin, J.L., Allwood J.W., Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. Pharmacogenomics 8, 2007, 1243–1266.
10. Roberts L.D., Souza A.L., Gerszten R.E., Clish C.B. Targeted metabolomics. Curr Protoc Mol Biol. 2012, Chapter 30: Unit 30.2-30.2.24.
11. Clarke C.J., Haselden J.N. Metabolic profiling as a tool for understanding mechanisms of toxicity. Toxicol Pathol., 2008, 36: 140-147.
12. WHO, "Poland, Source: Globocan 2020," 2020, https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/616-poland-fact-sheets.pdf.
13. https://www.cancer.org.
14. Goldstein M.R., Mascitelli L. Androgen receptor-dependent variation in PSA-letter. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 2015, 24 : 317.
15. Catalona W.J., Richie J.P., Ahmann F.R., Hudson M.A., Scardino P.T., Flanigan R.C., DeKernion J.B., Ratliff T.L., Kavoussi L.R., Dalkin B.L., Waters W.B., MacFarlane M.T., Southwick P.C. Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical Trial of 6,630 Men. J Urol., 2017, 197: 200-207.
16. 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 : e0136902.
17. 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. Mol Cell Endocrinol, 2015, 417: 149–157.
18. Ramírez M.L., Nelson E.C., Evans C.P. Beyond prostate-specific antigen: alternate serum markers. Prostate Cancer Prostatic Dis., 2008, 11: 216–229.
19. Bligh, Graham E., Justin Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian journal of biochemistry and physiology, 1959, 37.8: 911-917.

20. Wang X., Kruithof-de Julio M., Economides K.D., Walker D., Yu H., Halili M.V., Hu Y.P., Price S.M., Abate-Shen C., Shen M.M. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. Nature, 2009, 461: 495–500.
21. Swinnen J.V., Brusselmans K., Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: New players, novel targets. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 2006, 9: 358–365.
22. Kuemmerle N.B., Rysman E., Lombardo P.S., Flanagan A.J., Lipe B.C., Wells W.A., Pettus J.R., Froehlich H.M., Memoli V.A., Morganelli P.M., et al. Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. Mol. Cancer Ther., 2011, 10: 427–436.
23. Dang Q., Chen Y.A., Hsieh J.T. The dysfunctional lipids in prostate cancer. Am. J. Clin. Exp. Urol., 2019, 7: 273–280.
24. Schiller J., Suss R., Fuchs B., Muller M., Zschornig O., Arnold K. MALDI-TOF MS in lipidomics. Front. Biosci., 2007, 12: 2568–2579.
25. Walczak-Skierska J., Złoch M., Pauter K., Pomastowski P., Buszewski B. Lipidomic analysis of lactic acid bacteria strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J. Dairy Sci., 2020, 103: 11062–11078.
26. Jolliffe I.T., Cadima J. Principal component analysis: A review and recent developments. Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci., 2016, 374 : 20150202.
27. Park Y.S., Lek S. Artificial Neural Networks: Multilayer Perceptron for Ecological Modeling. In Developments in Environmental Modelling, 1st ed.; Jorgensen, S.E., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016, 123–140.
28. Stanimirova I., Banasik M., Ząbek A., Dawiskiba T., Kościelska-Kasprzak K., Wojtowicz W., Krajewska M., Janczak D., Młynarz P. Serum metabolomics approach to monitor the changes in metabolite profiles following renal transplantation. Sci. Rep., 2020, 10, 17223
29. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, J. Biol. Chem., 1957, 226: 497–509.
30. Pomastowski P, Buszewski B. Complementarity of matrix- and nanostructure-assisted laser desorption/ionization approaches. Nanomaterials (Basel). 2019, 14, 9 : 260.
31. Hillenkamp F., Karas M., Beavis R.C., Chait B.T. Matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry of biopolymers, Anal. Chem., 1991, 63: 1193A–1203A.
32. Schiller J., et al. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research, Prog. Lipid Res., 2004, 43: 449–488.

33. Harvey D.J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of phospholipids. J. Mass Spectrom, 1995, 30: 1333.
34. Asbury G.R., Al-Saad K., Siems W.F., Hannan R.M., Hill J. Analysis of triacylglycerols and whole oils by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom, 1999, 10: 983–991.
35. Schiller J., et al. The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose? Eur. Biophys. J., 2007, 36: 517–527.
36. Leopold J., Popkova Y., Engel K.M., Schiller J. Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of lipids. Biomolecules 8, 2018, 173.
37. Liu Y., Zuckier L.S., Ghesani N.V. Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach. Anticancer Res., 2010, 30: 369–374.
38. Park K.S., Lee H.Y., Lee S.Y., Kim M.K., Kim S.D., Kim J.M., Yun J., Im D.S., Bae Y.S. Lysophosphatidylethanolamine stimulates chemotactic migration and cellular invasion in SK-OV3 human ovarian cancer cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptor, FEBS Lett., 2007, 581.
39. Park S.J., Lee K.P., Kang S., Chung H.Y., Bae Y.S., Okajima F., Im D.S. Lysophosphatidylethanolamine utilizes LPA(1) and CD97 in MDA-MB-231 breast cancer cells, Cell. Signal, 2013, 25: 2147–2154.
40. Van Gils M. P. M. Q., et al. The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. Clin. Cancer Res., 2007, 13: 939–943.
41. Cerrato A., Bedia C., Capriotti A., Cavaliere C., Gentile V., et al. Untargeted metabolomics of prostate cancer zwitterionic and positively charged compounds in urine. Anal Chim Acta., 2021, 8: 1158.
42. Salciccia S., Capriotti A., Laganà A., Fais S., Logozzi M., et al. Biomarkers in Prostate Cancer Diagnosis: From Current Knowledge to the Role of Metabolomics and Exosomes. Int J Mol Sci, 2021, 22: 4367.
43. Ganong W. Fizjologia. Warszawa: PZWL, 1997.
44. Selth L.A., et al. Human seminal fluid as a source of prostate cancer-specific microRNA biomarkers. Endocr. Relat. Cancer 21, 2014, L17–L21.
45. Roberts M.J., Richards R.S., Gardiner R.A., Selth L.A. Seminal fluid: A useful source

of prostate cancer biomarkers? Biomark. Med. 9, 77–80 (2015).

46. Neuhaus J., et al. Seminal Plasma as a Source of Prostate Cancer Peptide Biomarker Candidates for Detection of Indolent and Advanced Disease. PLoS One 8, 2013, 1–13.
47. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. J. Clin. Invest, 1985, 76: 1899–1903.
48. Costello L.C., Franklin R.B. The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. Oncology, 2000, 4: 269-282.
49. Franz M.C., Anderle P., Bürzle M., Suzuki Y., Freeman M.R., Hediger M.A., Kovacs G. Zinc transporters in prostate cancer. Molecular Aspects of Medicine, 2013, 34(2–3), 735–741.
50. Costello L.C., Feng P., Milon B., Tan M., Franklin R.B. Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: Critical issues to resolve. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2004, 7: 111–117.
51. Eidelman E., Twum-Ampofo J., Ansari J., Siddiqui M.M. The Metabolic Phenotype of Prostate Cancer. Front Oncol., 2017, 7:131.
52. Bader D.A., McGuire S.E. Tumour metabolism and its unique properties in prostate adenocarcinoma. Nature Reviews Urology, 2020, 17: 214–231.
53. Di Lorenzo G., Zappavigna S., Crocetto F., Giuliano M., Ribera D., Morra R., Scafuri L., Verde A., Bruzzese D., Iaccarino S., Costabile F., Onofrio L., Viggiani M., Palmieri A., De Placido P., Marretta A.L., Pietroluongo E., Luce A., Abate M., Navaeiseddighi Z., Caputo V.F., Celentano G., Longo N., Ferro M., Morelli F., Facchini G., Caraglia M., De Placido S., Buonerba C. Assessment of Total, $PTEN^-$, and $AR\text{-}V7^+$ Circulating Tumor Cell Count by Flow Cytometry in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Receiving Enzalutamide. Clin Genitourin Cancer, 2021, 19: e286-e298.
54. Sciarra A., Maggi M., Salciccia S., Nicolai A., Tortorella E., Giantulli S., Magliocca F.M., Silvestri I., Taglieri L., Cattarino S., Scarpa S. Tissue Expression of Androgen Receptor Splice Variant 7 at Radical Prostatectomy Predicts Risk of Progression in Untreated Nonmetastatic Prostate Cancer. Oncology, 2021, 99: 251-255.
55. Hou Z., Huang S., Li Z. Androgens in prostate cancer: A tale that never ends. Cancer Lett., 2021, 516:1-12.
56. YuPeng L., YuXue Z., PengFei L., Cheng C., YaShuang Z., DaPeng L., Chen D. C. Cholesterol Levels in Blood and the Risk of Prostate Cancer: A Meta-analysis of 14 Prospective Studies. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of

the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology., 2015, 24: 1086–1093.

57. Arunakaran J., Aruldhas M.M., Govindarajulu P. Effects of prolactin and androgens on the prostatic lipids of castrated mature bonnet monkeys. Prostate, 1990, 17: 247-260.
58. Stattin P., Rinaldi S., Stenman U.H., Riboli E., Hallmans G., Bergh A., Kaaks R. Plasma prolactin and prostate cancer risk: A prospective study. Int J Cancer, 2001, 292:463-465.

8. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Od początku działalności naukowej prace badawcze realizuje w oparciu o współpracę z krajowymi i zagranicznymi jednostkami naukowymi. Współprace te umożliwiają wymianę doświadczeń z innymi naukowcami i stały się podstawą i inspiracją do realizacji zadań badawczych.

Pracę naukową rozpoczęłam w trakcie studiów magisterskich, kiedy brałam udział w określającym wpływ metod obróbki technologicznej na profil związków antyoksydacyjnych w sokach z aronii i jagody kamczackiej. Odbyłam też dwa staże naukowe w wiodących jednostkach naukowych w Klinice i Poliklinice Anestezjologii i Intensywnej Terapii w Rostocku (2009) oraz Austriackiej Akademii Nauki w Innsbrucku (2010). Tematyka staży koncentrowała się na zastosowaniu technik analitycznych w analizach biomedycznych. Podczas stażu w Rostocku wykorzystywałam technikę SPME do analiz lotnych metabolitów w wydychanym powietrzu. Staż w Innsbrucku dotyczył zastosowania techniki IMS do oznaczania lotnych metabolitów, które mogą być wykorzystywana do poszukiwania ludzi np. po kataklizmach jak trzęsienie ziemi. Wyjazdy te umożliwiły mi zapoznanie się z szeroko pojętym podejściem bioanalityki i zastosowaniem technik analitycznych w metabolomice, a co za tym idzie w diagnostyce chorób. Tematyka ta była kontynuowana w trakcie półrocznego stażu, który odbyłam w firmie Cerko (2011-2012) rok. Prowadziłam badania nad stabilnością witaminy C z zastosowaniem technik potencjometrycznych oraz spektrometrycznych. Efektem przedstawionych staży i współpracy były publikacje naukowe opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych.

Badania realizowane w trakcie studiów doktoranckich były niejako kontynuacją zainteresowań naukowych w obszarze bioanalityki. Temat pracy doktorskiej dotyczył charakterystyki metabolomicznej wydzieliny z odwłoka konika polnego w poszukiwaniu związków niskocząsteczkowych o potencjalnych właściwościach terapeutycznych tzw.: *lead compounds*. Badania realizowane były we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi jak z Trójmiejską Akademicką Zwierzętarnią Doświadczalną w zakresie oceny wpływu wydzieliny na proces gojenia się ran z wykorzystaniem modelu zwierzęcego (myszy). Dopełnieniem projektu doktorskiego była współpraca z Katedrą i Zakładem Patomorfologii, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierownictwem prof. Wojciecha Biernata. W ramach współpracy dokonano oceny patomorfologicznej preparatów tkankowych, umożliwiającej opis wpływu testowanej wydzieliny na wszystkie struktury skóry.
Zastosowanie podejścia metabolomicznego w poszukiwaniu specyficznych deskryptorów molekularnych różnych chorób kontynuowałam podczas dalszych badań naukowych prowadzonych we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi:

- **w zakresie zespołu policystycznych jajników**: Zakład Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

- **w zakresie patomechanizmu sepsy**: Kliniczny Oddział Ratunkowy Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

- **w zakresie patomechanizmu raka prostaty**: Katedra i Klinika Urologii, Gdańskiego Uniwersytety Medycznego, Oddział Urologii Ogólnej i Onkologicznej, Specjalistyczny Szpital Miejski w Toruniu , Zakład Patologii i Neuropatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz Universitatea Babeș-Bolyai w Cluj-Napoca, Rumunia.

Efektem podjęcia współpracy są badania naukowe realizowane w ramach przyznanych projektów badawczych (Preludium, Sonata czy Opus, których byłam kierownikiem lub głównym wykonawcą) oraz wyniki badań przedstawione w formie publikacji i doniesień konferencyjnych.

Ponadto, aktualnie realizuję staż podoktorski, gdzie w ramach projektu „Zaawansowane biokompozyty dla gospodarki jutra BIOG-NET", finansowanego w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego – Program Operacyjny Inteligentny Rozwój na lata 2014-

2020 finansowany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej. Zadania badawcze realizować będę w Katedrze Genetyki, Fizjologii i Biotechnologii Roślin UWM i dotyczyć będą izolacji metabolitów pochodzenia roślinnego (cyklitoli) o potencjalnym działaniu terapeutycznym. Nawiązana współpraca była impulsem do rozszerzenia zakresu badań w obszarze metabolomiki. Najnowsze doniesienia mówią o działaniu przeciwnowotworowym tych metabolitów roślinnych. Wykazane jest też działanie lecznicze w zakresie zahamowania progresji rozwoju raka prostaty, dlatego też planuję rozpoczęcie prac obejmujących właśnie tę tematykę.

9. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

9.1 Osiągnięcia dydaktyczne

Moje osiągnięcia dydaktyczne obejmują głównie trzy formy działalności. Pierwsza z nich dotyczy prowadzenia zajęć dydaktycznych dla studentów (Tabela 5), druga - roli promotora pomocniczego lub sprawowaniu opieki naukowej nad pracami doktorskimi (Tabela 6) oraz opieka naukowa nad pracami dyplomowymi na stopień magistra (Tabela7).

Tabela 5 Zajęcia dydaktyczne prowadzone dla studentów Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Funkcja	**Typ zajęć**	**Nazwa przedmiotu**	**Kierunek, rok studiów**	**Okres**
Prowadzący	Wykład	Terapia naturalna	Weterynaria, III	2020/2021
Prowadzący	Seminaria	Terapia naturalna	Weterynaria, III	2020/2021
Prowadzący	Wykład	Wiem, co jem	Ogólnouniwersytecki	2021/2022
Kierownik przedmiotu	Wykład	Terapia naturalna	Weterynaria, III	2021/2022
Kierownik przedmiotu	Seminaria	Terapia naturalna	Weterynaria, III	2021/2022

Prowadzący	Seminaria	I know what I eat	Ogólnouniwersytecki	2021/2022
Prowadzący	Wykład	Toksykologia	Weterynaria, IV	2021/2022
Prowadzący	Laboratorium	Toksykologia	Weterynaria, IV	2021/2022

Tabela 6 Rola promotora pomocniczego lub opiekuna naukowego nad pracami doktorskimi

Dane doktoranta	**Status studiów/przewodu**	**Okres**
mgr Anna Stefaniak	Uczestnik IV roku Szkoły Doktorskiej, Gdański Uniwersytet Medyczny- planowany termin obrony w 2022 roku	2018- obecnie
Mgr Tetiana Dyrda,	Uczestnik I roku Szkoły Doktorskiej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu	2021- obecnie

Tabela 7 Rola opiekuna naukowego nad pracami dyplomowymi na stopień magistra

Dane studenta	**Temat pracy**	**Kierunek studiów**	**Rok akademicki**
Katarzyna Walkowiak	Opracowanie metody GC-MS/MS do analizy wydzieliny odwłoka konika polnego *Chorthippus spp.*	farmacja	2012/2013
Dorota Staśkowiak	Badanie wpływu wydzieliny z odwłoka konika polnego *Chorhippus spp.* na proces gojenia się ran u myszy	farmacja	2013/2014
Agata Stępniak	Badanie wpływu mieszaniny syntetycznych składników obecnych w wydzielinie odwłoka konika polnego na gojenie się ran u myszy	farmacja	2015/2016
Anna Stefaniak	Zastosowanie metabolomiki w poszukiwaniu mechanizmu powstawania zespołu policystycznych jajników	farmacja	2016/2017

Paulina Dzięcioł	Skrawki parafinowe jako nowa matryca stosowana w metabolomice do poszukiwania mechanizmu rozwoju raka prostaty	farmacja	2017/2018

9.2. Osiągnięcia dydaktyczne i popularyzujące naukę

Byłam członkiem komitetu organizacyjnego międzynarodowych konferencji: 12th International Symposium on Chromatography organizowanej przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toriniu w 2012 roku. Uczestniczyłam też w konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym organizowanych przez Gdańsko Uniwersytet Medyczny. Wśród nich wyróżnić można Metabolomic Circle odbywające się w 2015 roku oraz 24th International Symposium on Electro and Liquid Phase Separation Techniques" i „XI Polskiej Konferencji Chromatograficznej", które odbyły się w Sopocie w 2017 r.
W latach 2013-2015 pełniłam też funkcję członka Komisji ds. Konkursów KNOW na wydziale Farmaceutycznym z OML, Gdańskiego Uniwersytety Medycznego.
Od 2021 roku pełnię funkcję członka komisji okręgowej olimpiady biologicznej. Byłam też członkiem zespołu ds. ewaluacji w dyscyplinie weterynaria Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.
Od 2021 roku jestem też członkiem Komisji ds. utworzenia nowego kierunku studiów na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu.
Od 2017 roku jestem prezesem odpryskowej akademickiej spółki Bioserv (spółka *spin off*). W ramach działalności spółki realizujemy 3 projekty badawcze dla przedsiębiorstw w dziedziny mleczarstwa. Badania realizowane są w ramach podwykonastwa.

Osiągnięcia popularyzujące naukę:

- ✓ Prowadzenie zajęć w języku polskim w ramach kursu specjalistycznego „*Analityka w Ochronie Środowiska i Zdrowiu Człowieka. Chromatografia i techniki pokrewne w różnych wariantach oznaczeń śladowych*"

- ✓ Prowadzenie pokazów chemicznych dla dzieci w wieku przedszkolnym. Przedszkole Smerfuś w Starym Toruniu (2021)

- ✓ Wykład pt.: „*Zastosowanie lipidomiki w diagnostyce chorób*" prowadzone na zaproszenie dla Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych oraz Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, 2021

- ✓ Wykład pt.: „*Zastosowanie LCMS/MS w diagnostyce chorób*" prowadzony w ramach V Akademii Chemii Analitycznej w Jachrance, 2021

- ✓ Wykład pt.: „*A new concept for diagnostics of cancer and civilization illness*" w ramach seminarium naukowego pt.: „Przyszłość lecznictwa. Jak nowe technologie rewolucjonizują opiekę medyczną", Expo 2022, Dubaj

10. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

10.1 Wykaz międzynarodowych i krajowych nagród i wyróżnień naukowych

2021, 2020, 2017, 2015 Nagroda JM Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za osiągnięcia naukowe- nagroda zespołowa

2018, 2020, 2021 Lider Innowacji Pomorza i Kujaw- nagroda małych przedsiębiorstw. Bioserv spółka typu Spin-off, prezes spółki: Magdalena Buszewska-Forajta
2017 Stypendium dla Młodych Naukowców finansowane przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

2015 Nagroda Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za najlepszą rozprawę doktorską

2015 Nagroda Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za osiągnięcia dydaktyczne- nagroda zespołowa

2015 Nagroda za najlepszą rozprawę doktorską w roku 2015 z dziedziny chemii analitycznej przyznana przez Komitet Chemii Analitycznej PAN

2015 Stypendium dla Młodych Naukowców na realizację zadań badawczych finansowane przez Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

2015 Nagroda Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia naukowe- nagroda zespołowa

2014 Stypendium dla Młodych Naukowców za osiągnięcia naukowe przyznane prze Polskie Towarzystwo Chemiczne

2013 "InnoDoktorant – Stypendia dla Doktorantów, VI edycja". Projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej

2012/2013, 2013/2014 Specjalne stypendium naukowe Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, realizującego program KNOW, za wybitne osiągnięcia naukowe

2012/2013, 2014/2015, 2015/2016 stypendium dla najlepszych doktorantów Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Nagroda za najlepsze wystąpienia ustne na konferencjach:

- ✓ 24th International Symposium on Separation Sciences and 21st International Conference Analytical Methods and Human Health, Jasna, Slovakia (2018)
- ✓ 18th International Symposium on Advances in Exctraction Technologies & 22nd International Symposium on Separation Sciences, Toruń, Poland (2016)
- ✓ XXIV Scientific Conference of the Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland (2016)
- ✓ 21st International Student Scientific Conference for Students and Young Doctors, Gdańsk, Poland (2013)

Nagroda za najlepsze prezentacje posterowe :

- ✓ 8th International Conference on Breath Research & Cancer Diagnosis Breath Analysis, Toruń, Poland (2014)
- ✓ Xth Chromatographic Conference, Lublin, Poland (2014)
- ✓ VI Chromatographic Conference , Łódź, Poland (2013)
- ✓ XVII euroANALYSIS, Warsaw, Poland (2013)
- ✓ the International Scientific Conference, Applied Natural Sciences w Novy Smokovec (2013)
- ✓ 29th International Symposium on Chromatography, Toruń, Poland (2012)

10.2 Wykaz szkoleń i wizyt naukowych

20.04-26.05.2011 Szkolenie z Zarządzania projektami STS Sauter Training and Simulation SA licence, Project Managment, ukończone certyfikatem 20/2011/9655, Gdynia, Poland,

26- 27. 09. 2012 Szkolenie z zakresu zastosowania technik GC/MS and LC/MS w metabolomice, Warszawa, Poland,

16-19.07.2012 Podstawy teoretyczne stosowania oprogramowania Agilent MassHunter and Mass Profiler Professional, Gdańsk, Poland,

15-18.07.2014 Zastosowanie oprogramowania Agilent MassHunter and Mass Profiler Professional softwares w analizach metabolomicznych, Gdańsk, Poland,

12-15.01.2014 Statystyka w badaniach biomedycznych, Statsoft, Kraków, Poland

13.10.2015 szkolenie zastosowanie tandemowej spektrometrii mas w metabolomice, Gdynia, Poland

10.3 Inne projekty badawcze

1. 2016 Grant dla Młodych Naukowców „Badanie właściwości farmakologicznych wydzieliny owadów Chorthippus spp. z wykorzystaniem modelu zwierzęcego", Finansowanie w ramach dotacji JM Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego 01-0083/08/529.
2. 2017 Grant dla Młodych Naukowców „Analiza metabolomiczna GC-MS i LC-TOF/MS profilu lipidomicznego w nasieniu chorych na raka prostaty, przerost gruczołu krokowego i zapalenie gruczołu krokowego". Finansowanie w ramach dotacji JM Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego MN-01-304/08/529
3. 2022 Dofinansowanie projektu pt.;" Wpływ bionanokompozytów na proces gojenia ran" z wykorzystaniem modelu zwierzęcego. Subwencja Toruńskich Centrów Doskonałości "W kierunku medycyny spersonalizowanej" Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

.....

(podpis wnioskodawcy)

PODPIS ZAUFANY
MAGDALENA
BUSZEWSKA-FORAJTA
17.05.2022 09:52:28 (GMT+2)
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny Nauki Medyczne

I. WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

1. **Monografia naukowa, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2a ustawy**

   NIE DOTYCZY

2. **Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy**

   Cykl o tytule:

„Metabolomika - nowe narzędzie analityczne w poszukiwaniu deskryptorów molekularnych raka prostaty".

Na cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, stanowiących osiągnięcie naukowe, składa się **8 prac** [H1-H8] opublikowanych w latach 2019 – 2022 w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR), w których jestem współautorem. We **wszystkich** pracach byłam pierwszym autorem, zaś w **5** pełniłam funkcję autora korespondencyjnego.

Oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład pracy każdego z nich w publikacjach [H1-H8] stanowią część **Załącznika 5** do wniosku.

Spis publikacji:

*- autor korespondencyjny; **IF**- współczynnik Impact Factor wg roku publikacji lub w przypadku jego braku, z 2020; **MEiN** – liczba punktów z listy czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki,

Opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora

[H1] **Buszewska-Forajta M,** Rafińska K, Buszewski B. *Tissue sample preparations for preclinical research determined by molecular imaging mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionization.* J Sep Sci. 2022, 202100578.

IF= 3,645 **Punktacja MEiN:** 70.000

Mój wkład polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji pracy. Jestem autorem części manuskryptu dotyczącej przygotowania krioskrawek do obrazowania oraz podsumowania.

Ponadto, opracowałam tabele i rysunek zamieszczony w manuskrypcie, dotyczący zastosowania krioskrawek w obrazowaniu. Uczestniczyłam w przygotowaniu zarówno finalnej wersji manuskryptu, jak również w korekcie manuskryptu na etapie recenzji.

[H2] **Buszewska-Forajta M**, Patejko M, Macioszek Sz, Sigorski D, Iżycka-Świeszewska E, Markuszewski MJ. *Paraffin-embedded tissue as a novel matrix in metabolomics study: optimization of metabolite extraction method.* Chromatographia. 2019, 82, 10 : 1501-1513.

IF= 1,596 **Punktacja MEiN:** 40.000

Mój wkład polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji badawczej, zaplanowaniu eksperymentów, przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń. Uzyskane dane poddałam analizie statystycznej. Jestem współautorem pierwszej wersji manuskryptu i uczestniczyłam w edycji kolejnych wersji. Jestem też autorem tabel i rysunków zamieszczonych w publikacji. Uczestniczyłam w korekcie manuskryptu na etapie recenzji. Zapewniłam fundusze na realizację wszystkich doświadczeń zawartych w manuskrypcie.

[H3] **Buszewska-Forajta M***, Raczak-Gutknecht J, Artymowicz M, Wesołowski W, Buczkowski K, Iżycka-Świeszewska E, Markuszewski MJ. *The potential role of fatty acids in prostate cancer determined by GC-MS analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples.* J Pharm Biomed Anal. 2021, 20, 196 : 113907.

IF= 3,209 **Punktacja MEiN:** 100.000

W niniejszej pracy mój wkład polegał na współautorstwie koncepcji badawczej, zaplanowaniu eksperymentów, przeprowadzeniu doświadczeń z zakresu metabolomiki. Uzyskane dane poddałam analizie statystycznej i pełniłam wiodącą rolę w interpretacji danych. Jestem autorem pierwszej wersji manuskryptu (bez sekcji dotyczącej oceny histopatologicznej) i uczestniczyłam w edycji kolejnych wersji. Jestem też autorem tabel i rysunków zamieszczonych w publikacji. Prowadziłam korespondencję z edytorem oraz recenzentami, koordynowałam korekty poszczególnych wersji manuskryptu. Zapewniłam fundusze na realizację wszystkich doświadczeń zawartych w manuskrypcie.

[H4] **Buszewska-Forajta M**, Pomastowski P., Maślak E., Fijałkowski P., Buszewski B., *Zastosowanie technik laserowej desorpcji/jonizacji w identyfikacji lipidów jako biomarkerów raka prostaty.* Wiadomości Chemiczne. 2021, 75, 7-8 : 893-909.

IF= - **Punktacja MEiN:** 20.000

Mój wkład polegał na współpracy w zakresie przygotowania pierwszej wersji manuskryptu jak również redagowania jego finalnej wersji. Prowadziłam korespondencję z edytorem, recenzentami, wykonałam niezbędne korekty od momentu przesłania manuksryptu do redakcji aż do czasu zaakceptowania jej finalnej wersji.

[H5] **Buszewska-Forajta M***, Pomastowski P, Monedeiro F, Walczak-Skierska J, Markuszewski M, Matuszewski M, Markuszewski MJ, Buszewski B. Lipidomics as a Diagnostic Tool for Prostate Cancer. Cancers (Basel). 2021, 21, 13 : 2000.

IF= 6, 126 **Punktacja MEiN:** 140.000

W niniejszej pracy mój udział polegał na wspólnym opracowaniu koncepcji badawczej. W pracy tej zaplanowałam eksperymenty, przeprowadziłam analizy metabolomiczne. Dokonałam interpretacji uzyskanych wyników. Jestem wiodącym autorem manuskryptu (bez sekcji dotyczącej analizy statystycznej) i uczestniczyłam w edycji kolejnych wersji. Jestem też autorem tabel i rysunków zamieszczonych w publikacji. Prowadziłam korespondencję z edytorem oraz recenzentami, koordynowałam korekty poszczególnych wersji manuskryptu. Zapewniłam fundusze na realizację wszystkich doświadczeń zawartych w manuskrypcie.

[H6] **Buszewska-Forajta M***, Pomastowski P, Monedeiro F, Król-Górniak A, Adamczyk P, Markuszewski MJ, Buszewski B. New approach in determination of urinary diagnostic markers for prostate cancer by MALDI-TOF/MS. Talanta. 20221, 236 : 122843.

IF= 6, 057 **Punktacja MEiN:** 100.000

W niniejszej pracy wraz z innymi autorami opracowałam koncepcję badawczą. Brałam udział w zaplanowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu część eksperymentalnej obejmującą analizę za pomocą MALDI-ToF/MS. Pełniłam wiodącą rolę w interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Jestem autorem pierwszej wersji manuskryptu, tabel i rycin zawartych w publikacji. Prowadziłam korespondencję z edytorem oraz recenzentami, koordynowałam korekty poszczególnych wersji manuskryptu. Zapewniłam fundusze na realizację wszystkich doświadczeń zawartych w manuskrypcie.

[H7] **Buszewska-Forajta M*,** Raczak-Gutknecht J, Struck-Lewicka W, Nizioł M, Artymowicz M, Markuszewski M, Kordalewska M, Matuszewski M, Markuszewski MJ. Untargeted Metabolomics Study of Three Matrices: Seminal Fluid, Urine, and Serum to Search the Potential Indicators of Prostate Cancer. Front Mol Biosci. 2022 4, 9 : 849966.

IF= 5, 246 **Punktacja MEiN:** 140.000

Mój wkład pracy polegał na autorstwie koncepcji badawczej (razem z jednym autorem), zaplanowaniu wszystkich doświadczeń i przeprowadzeniu części eksperymentalnej pracy. Pełniłam wiodącą rolę w interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Jestem wiodącym autorem pierwszej wersji manuskryptu, tabel i rycin zawartych w publikacji. Prowadziłam korespondencję z edytorem oraz recenzentami, koordynowałam korekty poszczególnych wersji manuskryptu. Zapewniłam fundusze na realizację wszystkich doświadczeń zawartych w manuskrypcie.

[H8] **Buszewska-Forajta M***, Monedeiro F, Gołębiowski A, Adamczyk P, Buszewski B. Citric Acid as a Potential Prostate Cancer Biomarker Determined in Various Biological Samples. Metabolites. 2022, 21, 12 : 268.

IF= 4,932 **Punktacja MEiN:** 140.000

Mój wkład pracy polegał na autorstwie koncepcji badawczej (razem z jednym autorem), zaplanowaniu wszystkich doświadczeń i oznaczeniu kwasu cytrynowego. Pełniłam wiodącą rolę w interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Jestem współautorem pierwszej wersji manuskryptu, tabel i rycin zawartych w publikacji. Prowadziłam korespondencję z edytorem oraz recenzentami, koordynowałam korektami poszczególnych wersji manuskryptu. Zapewniłam fundusze na realizację wszystkich doświadczeń zawartych w manuskrypcie.

3. **Wykaz zrealizowanych oryginalnych osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych lub artystycznych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2c ustawy.**

NIE DOTYCZY

II. WYKAZ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych

BRAK

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

- **<u>Przed uzyskaniem stopnia doktora:</u>**

[M1] **Buszewska-Forajta M**, Siluk D, Kaliszan R. *Grasshopper in wound healing according to ethnopharmacological premises : study of the effect of grasshopper's abdominal secretion on wound healing*. W: Advances In Medicine And Biology Nova Science Publishers, Inc., 2015, 127-142.

- **<u>Po uzyskaniu stopnia doktora:</u>**

[M2] **Buszewska-Forajta M**, Raczak-Gutknecht J, Rajska (Stefaniak) A, Kaliszan R, Markuszewski M J.. *Analizy metabolomiczne naturalnych surowców leczniczych*. W: Bioanalityka w nauce i życiu. T. 1. Nowe wyzwania w bioanalizie klinicznej i ocenie naturalnych surowców leczniczych red. nauk. Irena Baranowska, Bogusław Buszewski, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2020, 319-331.

[M3] **Buszewska-Forajta M,** Raczak-Gutknecht J, Rajska (Stefaniak) A, Kaliszan R, Markuszewski M J.. *Metabolomic Analyses of Natural Medicinal Products* W: Handbook of Bioanalytics, Springer Nature Switzerland AG 2022, https://doi.org/10.1007/978-3-030-63957-0_21-1.

[M4] **Buszewska-Forajta M**, Dawidowska J, Markuszewski M J.. *Matryce biologiczne w medycynie sądowej* W: Analityka Sądowa, Wydawnictwo Naukowe PWN S, 2022 - przyjęte do druku

[M5] **Buszewska-Forajta M**, Stachewicz G, Markuszewski M J.. *Metody analityczne stosowane w medycynie sądowej* W: Analityka Sądowa, Wydawnictwo Naukowe PWN , 2022 -przyjęte do druku

Przekład rozdziałów w monografii naukowej

Po uzyskaniu stopnia doktora:

[P1] Peter Atkins (Autor), Loretta Jones (Autor), Leroy Laverman (Autor), Wójcik Wójcik (Tłumacz), Anna Król-Górniak (Tłumacz), Małgorzata Szultka-Młyńska (Tłumacz), Jan Milecki (Tłumacz), Justyna Walczak-Skierska (Tłumacz), Paweł Skowronek (Tłumacz), Agnieszka Rogowska (Tłumacz), Aneta Krakowska-Sieprawska (Tłumacz), Joanna Rudnicka (Tłumacz), Paweł Pomastowski (Tłumacz), Katarzyna Rafińska (Tłumacz), **Magdalena Buszewska-Forajta** (Tłumacz), *Chemia ogólna,* Wydawnictwo Naukowe PWN, 2020

3. Wykaz członkostwa w redakcjach naukowych monografii.
   BRAK

4. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Mochalski P, **Buszewska M,** Agapiou A, Statheropoulos M, Buszewski B, Amann A, Preliminary investigation of permeation profiles of selected head-space urine volatiles (2-Heptanone, n-Octanal) using IMS, Chromatographia (2012), 75:41-46.

2. **Buszewska-Forajta M**, Siluk D, Struck-Lewicka W, Raczak-Gutknecht J, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Identification of lipid fraction constituents from grasshopper (Chorthippus spp.) abdominal secretion with potential activity in wound healing with the use of GC-MS/MS technique. J Pharm Biomed Anal. 2014; 89 : 56-66.

3. Raczak-Gutknecht J, Frąckowiak T, Nasal A, Rietz J, Paszek M, **Buszewska-Forajta M**, Kaliszan R. Effect of the reference imidazoline drugs, clonidine and rilmenidine, on rat eye pupil size confirms the decisive role of α2-adrenoceptors on mydriasis. Int. J. Pharmacol. 2014; 10: 470-478.

4. Szultka M, **Buszewska-Forajta M**, Kaliszan R, Buszewski B. Determination of ascorbic acid and its degradation products by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. Electrophoresis. 2014; 35 : 585-592.

5. **Buszewska-Forajta M**, Struck-Lewicka W, Bujak R, Siluk D, Kaliszan R. Determination of Water-Soluble Components of Abdominal Secretion of Grasshopper (*Chorthippus* spp.) by GC/MS/MS in Search for Potential Wound Healing Agents. Chromatographia. 2014; 77 : 1091-1102.

6. **Buszewska-Forajta M**, Bujak R, Yumba-Mpanga A, Siluk D, Kaliszan R. GC/MS technique and AMDIS software application in identification of hydrophobic compounds of grasshoppers' abdominal secretion (Chorthippus spp.). J Pharm Biomed Anal. 2015; 102 : 331-339.

7. **Buszewska-Forajta M**, Siluk D, Daghir-Wojtkowiak E, Sejda A, Staśkowiak D, Biernat W, Kaliszan R. Studies of the effect of grasshopper abdominal secretion on wound healing with the use of murine model. J Ethnopharmacol. 2015; 24 ; 176 : 413 - 423. Złożony do rozprawy doktorskiej, opublikowany po nadaniu tytułu doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Bartosińska E, **Buszewska-Forajta M**, Siluk D. GC-MS and LC-MS approaches for determination of tocopherols and tocotrienols in biological and food matrices. J Pharm Biomed Anal. 2016; 127 : 156 – 169

2. Szczypior M, Połom W, Markuszewski M, Ciura K, **Buszewska-Forajta M**, Jacyna J, Markuszewski M, Matuszewski M. Overactive bladder treatment: application of methylene blue to improve the injection technique of onabotulinum toxin A. Scand J Urol. 2017; 51 : 474-478.

3. Ciura K, Pawelec A, **Buszewska-Forajta M**, Markuszewski MJ, Nowakowska J, Prahl A, Wielgomas B, Dziomba S. Evaluation of sample injection precision in respect to sensitivity in capillary electrophoresis using various injection modes. J Sep Sci. 2017; 40 : 1167-1175.

4. Rogowska A, Rafińska K, Pomastowski P, Walczak J, Railean-Plugaru V, **Buszewska-Forajta M**, Buszewski B. Silver nanoparticles functionalized with ampicillin. Electrophoresis. 2017; 38 : 2757-2764.

5. **Buszewska-Forajta M**, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Free silanols and ionic liquids as their suppressors in liquid chromatography. J Chromatogr A. 2018; 1559 : 17-43.

6. Grochocki W, **Buszewska-Forajta M**, Macioszek S, Markuszewski MJ. Determination of Urinary Pterins by Capillary Electrophoresis Coupled with LED-Induced Fluorescence Detector. Molecules. 2019; 24 : 1166.

7. **Buszewska-Forajta M**, Rachoń D, Stefaniak A, Wawrzyniak R, Konieczna A, Kowalewska A, Markuszewski MJ. Identification of the metabolic fingerprints in women with polycystic ovary syndrome using the multiplatform metabolomics technique. J Steroid Biochem Mol Biol. 2019; 186 : 176-184.

8. Pierzchała M, Pierzchała D, Ogłuszka M, Poławska E, Blicharski T, Roszczyk A, Nawrocka A, Urbański P, Stepanow K, Ciepłoch A, Korwin-Kossakowska A, Pas MFWT, Slaska B, **Buszewska-Forajta M**, Jaśkowski JM, Sachajko M, Herudzińska M, Jaśkowski BM, Niżański W, Fraser L, Czarnik U, Kadarmideen HN, Pareek CS. Identification of Differentially Expressed Gene Transcripts in Porcine Endometrium during Early Stages of Pregnancy. Life (Basel). 2020; 10 : 68.

9. Rajska A, **Buszewska-Forajta M**, Rachoń D, Markuszewski MJ. Metabolomic Insight into Polycystic Ovary Syndrome-An Overview. Int J Mol Sci. 2020; 21 : 4853.

10. **Buszewska-Forajta M**. Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on animals. Toxicon. 2020; 182:34-53.

11. Dudzik D, Macioszek S, Struck-Lewicka W, Kordalewska M, **Buszewska-Forajta M**, Waszczuk-Jankowska M, Wawrzyniak R, Artymowicz M, Raczak-Gutknecht J, Siluk D, Markuszewski M.J, Perspectives and challenges in extracellular vesicles untargeted metabolomics analysis, TrAC Trends in Analytical Chemistry,Volume 2021; 143: 116382.

12. Dyrda-Terniuk T, Sugajski M, Pryshchepa O, Śliwiak J, **Buszewska-Forajta M**, Pomastowski P, Buszewski B. The Study of Protein-Cyclitol Interactions. Int J Mol Sci. 2022, 23 : 2940.

13. Markuszewski M, **Buszewska-Forajta M**, Artymowicz M, Połom Wm Roslan M, Markuszewski M. J. Binding indocyanine green to human serum albumin potentially enhances the detection of sentinel lymph nodes. An initial step for facilitating the detection of first-station nodes in penile and other urological cancers Arch. Med. Sci. 2022, 18 : 1-7.

Czasopisma nie uwzględnione na liście filadelfijskiej

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. **Buszewska-Forajta M**, Staśkowiak D, Siluk D. Etnofarmakologia, jako źródło inspiracji w poszukiwaniu nowych leków . Dokonania Młodych Naukowców. 2014, 5 : 312-315.

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. **Buszewska-Forajta M**, Patejko M, Bujak R, Macioszek Sz, Sigorski D, Iżycka-Świeszewska E, Markuszewski M. J. Paraffin embedded tissue : new matrix for metabolomics approach. Med. Res. J. 2017 2, 2, 70.

2. Markuszewski M. J. , Ciura K, **Buszewska-Forajta M**, Jacyna J, Kordalewska M, Szczypior M, Połom W, Nowakowska J, Markuszewski M, Matuszewski M, Kaliszan R. Fast method for quantitative determination of methylene blue by micellar electrokinetic chromatography. Biomed. J. Sci. Tech. Res. 2018 : 3, 3, 1-3.

3. **Buszewska-Forajta M**, Patejko M, Raczak-Gutknecht J, Markuszewski M, Matuszewski M, Kaliszan R, Markuszewski M J. Utilization of metabolomics in searching for mechanism of prostate cancer development. Med. Res. J. 2017 : 2, 2, 76.

4. Sachajko M, Herudzińska M, Jaśkowski J M., Szczepanek J, **Buszewska-Forajta M**, Feng Y, Kumar D, Pareek Ch S. Data set for transcriptome analysis of liver in cattle breeds. Translational Research in Veterinary Science 2019: 2, 2, 51-56.

5. Pierzchała M, Ogłuszka M, Goluch D, Popławska E, Blicharski T, Roszczyk A, Nawrocka A, Urbański P, Stepanow K, Ciepłoch A, Sachajko M, Skowroński M T., Szczepanek J, Juszczuk-Kubiak E, Szczepański A, **Buszewska-Forajta M**, Miao X, Sharma V, Sharma S, Pareek Ch S. RNA-seq based SNP discovery in liver transcriptome of Polish Landrace pigs. Translational Research in Veterinary Science 2019 : 2, 1, 67-80.

6. Pierzchała M, Ogłuszka M, Goluch D, Popławska E, Blicharski T, Roszczyk A, Nawrocka A, Urbański P, Stepanow K, Ciepłoch A, Sachajko M, Juszczuk-Kubiak E, Szczepański A, **Buszewska-Forajta M**, Szczepanek J, Pareek Ch S. RNA-seq based SNP discovery in *gluteus medius* muscle of Polish Landrace pigs. Translational Research in Veterinary Science 2019 2019 : 2, 1, 51-65.

7. Pareek Ch S, Sachajko M, Szczepański A, **Buszewska-Forajta M**, Żarczyńska K, Sobiech P, Juszczuk-Kubiak E, Shahzad Q, Lu Y Q, Ogłuszka M, Polawska E, Pierzchała M. Quality control assessment of the RNA-Seq data generated from liver and pituitary transcriptome of Hereford bulls using StrandNGS software. Translational Research in Veterinary Science 2019 : 2, 1, 9 – 22.

8. Herudzińska M, Sachajko M, Jaśkowski J M, Szczepanek J, **Buszewska-Forajta M**, Feng Y, Kumar D, Pareek Ch S. Data set for transcriptome analysis of pituitary galnd in cattle breeds. Translational Research in Veterinary Science 2019 : 2, 2, 57-61.

5. **Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych**

   BRAK

6. **Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych**

   BRAK

7. **Wykaz wystąpień na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.**

   Od początku swojej kariery naukowej byłam współautorem **75** wystąpień na konferencjach o zasięgu międzynarodowym i krajowym, z czego w **38** z nich byłam autorem prezentującym. Jak do tej pory, wygłaszałam **15** prezentacji ustnych, w tym **12** komunikatów odbyło się na konferencjach o zasięgu międzynarodowym.

   Ponadto byłam współautorem wykładów plenarnych i wykładów na zaproszenie:

   - B. Buszewski, **M. Buszewska-Forajta**, *„A new concept for diagnostics of cancer and civilization illness"* w ramach seminarium „Przyszłość lecznictwa. Jak

nowe technologie rewolucjonizują opiekę medyczną", Expo 2022, Dubaj (wykład plenarny)

- **M. Buszewska-Forajta,** *„Zastosowanie LCMS/MS w diagnostyce chorób"*, V Akademia Chemii Analitycznej w diagnostyce chorób, Jachranka 19 – 22. 09. 2021 (wykład na zaproszenie)
- **M. Buszewska-Forajta**, P. Pomastowski, A. Rodzik, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski. *„Application of murine model in search for lead compounds"* XLV Międzynarodowe Seminarium Naukowo- Technologiczne „Chemistry for Agliculture", Karpacz, 21-24. 11.2021 (wykład plenarny)

- **Buszewska-Forajta M.**, *Formalin-fixed, paraffin- embedded (FFPE) or fresh tissue? : which matrix is more suitable for metabolomics?* Seminarium naukowe podczas wizyty studyjnej, Cluj Napoca, Rumunia, 19-25.07. 2018 (wykład na zaproszenie)
- **Buszewska-Forajta M.**, Patejko M., Bujak R., Macioszek Sz., Iżycka - Świeszewska E., Markuszewski M. J. "*An optimized method of metabolite extraction from parffin embedded tumor tissue and its application to metabolomics*" 19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Santiago de Compostella, Hiszpania, 27 – 30. 06. 2017 (wykład na zaproszenie)
- **Buszewska- Forajta M.,** Kaliszan R.. *„Identification of compounds derived from the abdomen of insects of Acridicae family based on ethnopharmacological premises*" ExTech 2016, ISSS 2016. 18th International Symposium on Advances in Extraction Technologies and 22nd International Symposium on Separation Sciences, Toruń, Polska 3 – 6. 07. 2016 (wykład na zaproszenie)

Lp.	Autorzy	Tytuł wystąpienia	Konferencja	Miejsce	Rok
Prezentacje ustne na konferencjach międzynarodowych- po uzyskaniu stopnia doktora					
1.	Buszewski B., Buszewska -Forajta M.	„A new concept for diagnostics of cancer and civilization illness"	Przyszłość lecznictwa. Jak nowe technologie rewolucjonizują opiekę medyczną. Expo 2020	Dubaj,	2022
2.	Buszewska -Forajta M.	„Application of murine model in search for lead compounds"	XLV Międzynarodowe Seminarium Naukowo-Technologiczne „Chemistry for Agliculture"	Karpacz, Polska	2021

3.	Buszewska -Forajta M.	„Zastosowanie LCMS/MS w diagnostyce chorób"	V Akademia Chemii Analitycznej	Jachranka, Polska	2021
4.	Buszewska-Forajta M., Pomastowski P., Walczak-Skierska J., Markuszewski M., Matuszewski M., Markuszewski M. J., Buszewski B.	The Role of Phospholipids in Prostate Cancer Development	15th International multidisciplinary conference The Vital Nature Signature	Kowno, Litwa	2021
5.	Buszewska-Forajta M., Grochocki W., Macioszek Sz., Markuszewski M. J.	Electromigratio n techniques in metabolomics studies	CECE 2019 : 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis	Gdańsk, Polska	2019
6.	Buszewska-Forajta M., Patejko M., Macioszek Sz., Sigorski D., Iżycka -Świeszewska E., Markuszewski M. J.	Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) or fresh tissue? : which matrix is more suitable for metabolomics?	24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018) : 21st International Conference Analytical Methods and Human Health (AMHH 2018)	Jasna, Słowacja	2018
7.	Buszewska-Forajta M., Stefaniak A., Szybiak A., Kowalewska A., Rachoń D., Markuszewski M. J.,	Badanie zmian w metabolomie surowicy u kobiet z zespołem policystycznych jajników	Polska Konferencja Chemii Analitycznej "Od chemii wszystko się zaczyna",	Lublin, Polska	2018
8.	Buszewska-Forajta M., Stefaniak A., Wawrzyniak R., Szybiak A., Kowalewska- Włas A., Rachoń D., Markuszewski M. J.,	Study the mechanism of polycystic ovary syndrome with the use of metabolomics approach	ITP 2017 : 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques ; PKChrom 2017 : XI Polska Konferencja	Sopot, Polska	2017
9.	Buszewska-Forajta M., Patejko M., Bujak R., Macioszek Sz., Sigorski D., Iżycka -Świeszewska E., Markuszewski M. J.	Paraffin embedded tissue : new matrix for metabolomics approach	Metabolomics Circle 2017: Bioanalytical and Omics Science	Wrocław, Polska	2017
10.	Buszewska-Forajta M., Patejko M., Bujak R., Macioszek Sz., Iżycka -Świeszewska E., Markuszewski M. J.	An optimized method of metabolite extraction from parffin embedded tumor tissue and its application to metabolomics	19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies	Santiago de Compostella, Hiszpania	2017
11.	Buszewska-Forajta M., Kaliszan R.	Identification of compounds derived from the	ExTech 2016, ISSS 2016. 18th International Symposium on Advances in Extraction	Toruń, Polska	2016

		abdomen of insects of *Acridicae* family based on ethnopharmacological premises	Technologies and 22nd International Symposium on Separation Sciences		
12.	Buszewska-Forajta M., Patejko M., Raczak-Gutknecht J., Markuszewski M., Matuszewski M., Kaliszan R., Markuszewski M. J.	Opracowanie metody oznaczania profili lipidomicznych w próbkach biologicznych za pomocą GC-MS	XXIV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk	Gdańsk, Polska	2016
Prezentacje ustne na konferencjach międzynarodowych- przed uzyskaniem stopnia doktora					
13.	Buszewska-Forajta M. Siluk D., Staśkowiak D., Stępniak A., Kaliszan R.	Search for potential wound healing agents in grasshopper abdominal secretion (Chorthippus spp) by GC-MS	Analytical methods to study oxidative damage, antioxidants and drugs.	Białystok, Poland	2015
14.	Buszewska-Forajta M. Bujak R., Yumba-Mpanga A., Raczak-Gutknecht J., Struck-Lewicka W., Siluk D., Kaliszan R.	Determination of lipidomic components of abdominal secretion of grasshopper (*Chorthippus spp.*) by GC/MS/MS in search for potential wound healing agents	9th International Symposium on Chromatography of Natural Products "The Application of Analytical Methods for the Development of Natural Products"	Lublin, Polska	2014
15.	Buszewska-Forajta M. Bujak R., Staśkowiak D., Siluk D., Kaliszn R.	Analiza profili metabolicznych wydzieliny z odwłoka konika polnego w poszukiwaniu substancji biologicznie czynnych	Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki	Gdańsk, Polska	2014
Prezentacje posterowe na konferencjach międzynarodowych- po uzyskaniu stopnia doktora					
16.	Buszewska-Forajta M., Pomastowski P., Monedeiro F., Król-Górniak A., Adamczyk P., Buszewski B., Markuszewski M. J.	Rola fosfolipidów w patogenezie raka prostaty	XXVI Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego	Gdańsk, Polska	2021

17.	Buszewska-Forajta M., Pomastowski P., Monedeiro F., Markuszewski M., Matuszewski M., Buszewski B., Markuszewski M. J.	The potential role of lipids in prostate cancer based on FFPE tissue samples with the use of MALDI-TOF	7th Scientific Conference of Polish Metabolomics Society : Metabolomics Circle	Białystok, Polska	2020
18.	Buszewska-Forajta M., Raczak -Gutknecht J., Patejko M., Sigorski D., Iżycka-Świeszewska E., Markuszewski M. J.	Are fatty acids correlated with CaP developement?	6TH Scientific Conference Metabolomics Circle 2019	Olsztyn. Polska	2019
19.	Buszewska-Forajta M., Stefaniak A., Wawrzyniak R., Konieczna A., Kowalewska-Włas A., Rachoń D., Markuszewski M. J.	Metabolomic signature of polycystic ovary syndrome	24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018) : 21st International Conference Analytical Methods and Human Health (AMHH 2018)	Jasna, Słowacja	2018
20.	Buszewska-Forajta M., Patejko M., Dzięcioł P., Macioszek Sz., Sigorski D., Iżycka-Świeszewska E., Markuszewski M. J.,	Application of formalin-fixed paraffin-embedded tissues in untargeted metabolomics study	5th Scientific Conference Metabolomics Circle 2018	Przysiek, Polska	2018
21.	Buszewska- Forajta M., Patejko M., Struck- Lewicka W., Raczak -Gutknecht J., Stefaniak A, Misiura M., Markusxewski M., Matuszewski M., Markuszewski M. J.	Metabolomic insight into the pathomechaniz m of prostate cancer through the "fingerprinting" analysis of seminal fluid	3rd Congress of Polish Bioscences BIO2018 "Through interdisciplinary approach into new solutions"	Gdańsk, Polska	2018
22.	Buszewska-Forajta M., Patejko M., Raczak-Gutknecht J., Dzięcioł P., Sigorski D., Iżycka-Świeszewska E., Markuszewski M. J.,	Czy skrawki parafinowe i analiza lipidomiczna to duet doskonały?	Polska Konferencja Chemii Analitycznej "Od chemii wszystko się zaczyna"	Lublin, Polska	2018
23.	Buszewska-Forajta M., Macioszek Sz., Grochocki W., Jacyna J., Markuszewski M., Matuszewski M., Markuszewski M. J.	CE-LIF method development and validation for determination of selected pterins in urine samples	45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC 2017	Praga, Czechy	2017
24.	Buszewska-Forajta M., Patejko M.,		9th Polish-German Symposium on	Kraków, Poland	2017

	Raczak-Gutknecht J., Markuszewski M., Matuszewski M., Kaliszan R., Markuszewski M. J.		Pharmaceutical Sciences "Towards novel concepts in pharmaceutical sciences"		
25.	Buszewska-Forajta M., Patejko M., Wawrzyniak R., Macioszek Sz., Sigorski D., Iżycka-Świeszewska E., Markuszewski M. J.,	Paraffin embedded tissue as a novel matrix in metabolomics study : optimization of metabolite extraction method	ITP 2017 : 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques ; PKChrom 2017 : XI Polska Konferencja	Sopot, Polska	2017
26.	Buszewska-Forajta M., Kubik Ł., Kaliszan R.	Quantitative structure-retention relationships study in lipidomic analysis of grasshopper abdominal secretion (Chorthippus spp.)	12th Annual Conference of the Metabolomics Society	Dublin, Irlandia	2016
27.	Buszewska-Forajta M., Kubik Ł., Kaliszan R.	Quantitative structure-(chromatographic) retention relationship study for compounds determined in grasshopper abdominal secretion (*Chorthippus* spp.) by GC/MS	2nd Central European Biomedical Congress "From emerging biochemical strategies to personalized medicine"	Kraków, Polska	2016
Prezentacje plakatowe przed złożeniem rozprawy doktorskiej					
28.	Buszewska-Forajta M. Siluk D., Staśkowiak D., Stępniak A., Kaliszan R.	GC/MS grasshopper abdominal secretion metabolic fingerprinting in search for novel drugs	2nd International Symposium on Profiling	Caparica, Portugalia	2015
29.	Buszewska-Forajta M. Szultka M., Kaliszan R., Buszewski B.	Determination of ascorbic acid and its degradation products by	9th International Symposium on Chromatography of Natural Products "The Application of Analytical Methods for the Development of Natural Products"	Lublin, Polska	2014

		HPLC-ESI/MS			
30.	Buszewska-Forajta M., Bujak R., Staśkowiak D., Siluk D., Kaliszan R.	Application of automated mass spectral deconvolution and identification system (AMDIS) in the study of metabolomic profile of volatile compounds of abdominal secretion of grasshopper (*Chorthippus* spp.)	Breath Analysis`2014. 8th International Conference on Breath Research & Cancer Diagnosis,	Toruń, Polska	2014
31.	Buszewska-Forajta M., Staśkowiak D., Siluk D., Kaliszan R.	Analysis of composition of grasshopper abdominal secretion using GC-MS	Drug Analysis 2014	Liege, Belgia	2014
32.	Buszewska-Forajta M., Staśkowiak D., Bujak R., Siluk D., Kaliszan R.	Technika GC/MS jako główne narzędzie w analizie profili metabolicznych wydzieliny z odwłoka konika polnego w poszukiwaniu substancji biologicznie czynnych	X Konferencja Chromatograficzna "Chromatografia - niezbędne narzędzie w nauce i technice"	Lubin, Polska	2014
33.	Buszewska- Forajta M., Raczak- Gutknecht J., Walkowiak K., Patejko M., Siluk D., Kaliszan R.	The study of differences in metabolomic profiles of grasshopper's *Chorthippus spp.* abdominal secretion obtained from three species of insects	19th International Symposium on Separation Sciences "New Achievements in Chromatography"	Poreč, Chorwacja	2013
34.	Buszewska-Forajta M., Walkowiak K., Patejko M..	The study of metabolic profiles of grasshopper's abdominal secretion and its	21st International Student Scientific Conference for Students and Young Doctors	Gdańsk, Polska	2013

		influence on wound healing process			
35.	Buszewska- Forajta M., Raczak- Gutknecht J., Siluk D., Markuszewski M. J., Kaliszan R.	Analysis of lipidomic fraction composition of grasshopper abdomen content using GC-MS	7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences "Interdisciplinary research for pharmacy"	Gdańsk, Polska	2013
36.	Buszewska- Forajta M., Raczak- Gutknecht J., Struck-Lewicka W., Siluk D., Kaliszan R.	Determination of lipidomic profiles of grasshopper's abdominal secretion by GC-MS/MS	The 4th International Scientific Conference Applied Natural Sciences 2013	Nový Smokovec, Słowacja	2013
37.	Buszewska- Forajta M., Raczak- Gutknecht J., Struck-Lewicka W., Walkowiak K., Patejko M., Siluk D., Kaliszan R.	GC-MS/MS study of lipidomic profiles of grasshopper`s abdominal secretion.	XVII euroANALYSIS Analytical chemistry for human well-being and sustainable development	Warszawa, Polska	2013
38.	Siluk D., Struck W., Buszewska M., Kaliszan R.	An LC-MS/MS method development for the simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in human serum	9th International Symposium on Chromatography	Toruń, Polska	2012

8. Wykaz udziału w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.

- ✓ 12th International Symposium on Chromatography, Toruń, 9 - 13. 09. 2012 – członek komitetu organizacyjnego
- ✓ Metabolomic Circle , Gdańsk, 27 - 28. 11. 2015 - członek komitetu organizacyjnego
- ✓ 24th International Symposium on Electro and Liquid Phase Separation Techniques" i „XI Polskiej Konferencji Chromatograficznej", Sopot, 10 -13. 09. 2017 - członek komitetu organizacyjnego

9. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

1. „ Analiza metabolomiczna wydzieliny ochronnej jaj konika polnego w poszukiwaniu substancji biologicznie czynnych o przypisywanych etnofarmakologicznie właściwościach przyspieszających proces gojenia się ran". Preludium 4, NCN, 2012/07/N/NZ7/04395 – kierownik projektu, projekt zrealizowany

2. „ Wpływ hormonów, wskaźników biochemicznych i epidemiologicznych oraz zmian w profilach lipidomicznych na proces powstawania nowotworu prostaty". Sonata 11, NCN, 2016/21/D/ST4/03730 – kierownik projektu, projekt zakończony, raport w trakcie oceny

3. " Zastosowanie łączonych technik separacyjnych do frakcjonowania nanocząstek i metabolitów o charakterze antybiotycznym wytwarzanych przez promieniowce ze środowisk ekstremalnych". Symfonia 8, NCN, 2013/08/W/NZ8/00701- wykonawca projektu, kierownik projektu: prof. dr hab. B. Buszewski, projekt zrealizowany

4. „Badania profili metabolicznych w moczu w raku pęcherza moczowego", Opus 3, NCN, 2012/05/B/NZ7/03293 – wykonawca projektu, kierownik projektu: prof. dr hab. M. J Markuszewski, projekt zrealizowany

5. "Charakterystyka metabolomiczna i genetyczna szczepów *E. coli* wywołujących urosepsę", Opus 15, NCN, 2018/29/B/NZ7/02489 – wykonawca projektu, prof. dr hab. M. J Markuszewski, projekt w realizacji

6. „Zespół policystycznych jajników w ujęciu metabolomicznym. Czy to odpowiednia strategia poszukiwania patomechanizmu?", Preludium 16, NCN, 2018/31/N/NZ7/03781– wykonawca projektu, prof. dr hab. A. Stefaniak, projekt w realizacji

7. „Zagrożenia związane z zanieczyszczeniem pasz antybiotykami", Opus 21, NCN, 2021/41/B/NZ9/04114 – wykonawca projektu, dr hab. M. Olejnik, projekt w realizacji

10. Wykaz członkostwa w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

1. Zespół Analityki Sądowej i Toksykologicznej KChA PAN- członek komisji
2. Polskie Towarzystwo Spektrometrii Mas – członek towarzystwa

11. Wykaz staży w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

01.07-01.08.2009 Miesięczny staż w Klinice I Poliklinice Anastezjologii i Intensywnej Terapii- Zastosowanie ekstrakcji z udziałem techniki SPME do analizy oddechu za pomocą GC-MS, Opiekunowie: prof. Johan Schubert and prof. Wolfram Miekisch.

17.07-17.08.2010 Miesięczny staż w Institute of Breath Research, Austrian Academy of Science, Inssbruck, Austria- Wykorzystanie technikami IMS do oznaczania lotnych związków. Opiekun: prof. Anton Amann.

01. 08. 2011- 22.02. 2012 Półroczny staż w firmie Cerko, Gdynia, Poland - Badanie stabilności witaminy C z użyciem metod potencjometrycznych, konduktometrycznych i spektrofotometrycznych. Opiekun: dr Bogusław Pilarski.

12 – 14. 10. 2016 szkolenie w Birmingham Metabolomics Training Centre, Wielka Brytania – jednego z najlepszych centrów metabolomiki na świecie. Udział w specjalistycznym kursie „Zastosowanie metabolomiki, od próbki biologicznej do interpretacji biologicznej"

19 – 25. 07. 2018 wizyta naukowa Cluj-Napoca, Rumunia (Center for Applied Biotechnology BIODIATECH, Department of Urology, luliu Halieganu University of Medicine and Pharmacy oraz Raluca Ripan Institute for Research in Chemistry, Babe-Bolyai University (UBB-ICCRR), Cluj Napoca, Rumunia

01.09.2021-31.12.2021 Staż podoktorski w akredytowanym laboratorium badawczym, Laboratorium Chemiczne Analiz Wielopierwiastkowym LCAW nr AB 696, Wrocław, Polska – przeprowadzenie analiz wielopierwiastkowych w próbkach biologicznych z

zastosowaniem techniki spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie
Opiekun: prof. dr hab. Katarzyna Chojnacka

12. Wykaz członkostwa w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).

BRAK

13. **Wykaz recenzowanych prac naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.**

Od około 6 lat pełnię funkcję recenzenta w wielu czasopismach z listy JCR m in.

Molecules

Cancers

International Journal of Molecular Sciences

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

International Journal of Analytical Chemistry.

14. Wykaz uczestnictwa w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.

1. BIO-GNET pt.:"Zaawansowane biokompozyty dla Gospodarki jutra BIO-GNET"; Projekt finansowany przez FNP ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 (PO IR), Oś IV: Zwiększenie potencjału naukowo-badawczego, Działanie 4.4: Zwiększenie potencjału kadrowego sektora B+R, konkurs TEAM-NET- zatrudnienie na stanowisku Młody Doktor

15. Wykaz udziału w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone

Realizacja projektu w ramach działalności BioServ sp. z o.o., spółka spin-off Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, której jestem prezesem od 2018 roku.

Realizacja zadań badawczych w ramach podwykonawstwa.

1. „Opracowanie masła o podwyższonych wartościach odżywczych i przedłużonym terminie przydatności do spożycia oraz autorskiej technologii jego produkcji z wykorzystaniem frakcjonowania tłuszczu mlecznego"
   Nr rejestracyjny: POIR.01.01.01.-00-0089/2020-00; Źródło(a) finansowania: NCBiR Kwota: 68 265 599 PLN; Podmiot realizujący: Polmlek Data rozpoczęcia realizacji: 2020-07-01 Data zakończenia realizacji: 2023-06-30 W trakcie realizacji

2. „Rozszerzenie oferty Starej Mleczarni S.A. poprzez opracowanie (formulację) napojów probiotycznych" Nr rejestracyjny: POIR.02.03.02-14-0357/20-00; Źródło(a) finansowania: PARP Kwota: 492 000 PLN; Podmiot realizujący: Stara Mleczarnia S.A. Data rozpoczęcia realizacji: 2021-11-01 Data zakończenia realizacji: 2022-12-06 W trakcie realizacji

3. „Opracowanie autorskiej technologii wytwarzania sera mozzarella o ulepszonych wartościach odżywczych, obniżonym poziomie laktozy i alergenów oraz przedłużonym terminie przydatności do spożycia" Nr rejestracyjny: POIR.01.01.01-00-2286/20 Źródło finansowania: NCBiR Kwota: 83 694 224 PLN Podmiot realizujący: Polmlek Data rozpoczęcia realizacji: 2021-07-01 Data zakończenia realizacji: 2024-11-30 W trakcie realizacji

16. **Wykaz uczestnictwa w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny.**

1. członek Komisji ds. Konkursów KNOW na wydziale Farmaceutycznym z OML, Gdańskiego Uniwersytety Medycznego.

2. członek komisji okręgowej olimpiady biologicznej.

3. członek zespołu ds. ewaluacji w dyscyplinie weterynaria Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Od 2021 roku jestem też członkiem Komisji ds. utworzenia nowego kierunku studiów na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu.

III. WSPÓŁPRA Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego.
   BRAK
2. Współpraca z sektorem gospodarczym.
   BRAK
3. Wykaz uzyskanych praw własności przemysłowej, w tym uzyskanych patentów krajowych lub międzynarodowych.
   BRAK
4. Wykaz wdrożonych technologii.
   BRAK
5. wykaz wykonanych ekspertyz lub innych opracowań wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.
   BRAK
6. Wykaz udziału w zespołach eksperckich lub konkursowych.
   BRAK
7. Wykaz projektów artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi.
   BRAK

IV. DANE NAUKOMETRYCZNE

1. **Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny).**

   Sumaryczny IF= 111,436

   Przed obroną doktoratu
   IF= 20,604

   Po obronie doktoratu
   IF= 90,832

2. **Liczba cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań.**
   Liczba cytowań według bazy *Scopus : 250*
   Liczba cytowań według bazy *Web of Science Core Collection: 211*

3. **Liczba punktów MNiSW.**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW=2 615

Przed obroną doktoratu

Liczba punktów MNiSW= 530

Po obronie doktoratu

Liczba punktów MNiSW=2085

Informacje zawarte w pkt. IV powinny wskazywać również na bazę danych, na podstawie której zostały podane.

Przy wyborze tej bazy należy zwracać uwagę na specyfikę dziedziny i dyscypliny naukowej, w której kandydat ubiega się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Rada Doskonałości Naukowej informuje, że podawanie danych naukometrycznych – w opinii Rady Doskonałości Naukowej – jest wskazane i zalecane, wynika to także ze stosowanej powszechnie praktyki przez samych kandydatów ubiegających się o awans naukowy. Należy jednak podkreślić, że podane we wnioskach o wszczęcie postępowania awansowego dane naukometryczne nie mogą stanowić kryterium oceny dorobku naukowego Kandydata dla podmiotów doktoryzujących, habilitujących oraz samej Rady Doskonałości Naukowej, organów prowadzących postępowania w sprawie nadania stopnia lub tytułu. Zadaniem tych organów jest przede wszystkim ocena ekspercka dorobku naukowego Kandydata ubiegającego się o awans naukowy, zaś decyzja o nadaniu stopnia lub tytułu nie powinna być uzależniona od podania tych danych.

.....

(podpis wnioskodawcy)