



**Autoreferat**

**„Ocena profili metabolomicznych w zaburzeniach układu sercowo-naczyniowego,  
schorzeniach onkologicznych i wrodzonych wadach anatomicznych”**

dr n. farm. Renata B. Wawrzyniak

Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki  
Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki  
Wydział Farmaceutyczny  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2023

**1. Imię i nazwisko:** Renata B. Wawrzyniak  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0763-4589>

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

<b>Rok</b>	<b>Stopień naukowy</b>
<b>2015</b>	Doktor nauk farmaceutycznych Gdański Uniwersytet Medyczny Wydział Farmaceutyczny z OML Tytuł pracy doktorskiej: "Plasma metabolic fingerprinting in pulmonary arterial hypertension by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometry" Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Michał J. Markuszewski Kopromotor: Prof. Coral Barbás
<b>2009</b>	Magister analityki medycznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Wydział Farmaceutyczny Tytuł pracy magisterskiej: „Niedoczynność kory nadnerczy” Promotor: dr Danuta Zalewska-Rydzkowska

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

<b>Rok</b>	<b>Miejsce zatrudnienia</b>
Luty 2017- obecnie	adiunkt (pracownik badawczo-dydaktyczny) Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny
Listopad 2013 - Styczeń 2017	asystent naukowy Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki Wydział Farmaceutyczny Gdański Uniwersytet Medyczny
Maj 2012 - Maj 2013	roczny staż naukowy Centre of Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO) Uniwersytet San Pablo CEU w Madrycie
Październik 2011 - Sierpień 2013	asystent Katedra i Zakład Toksykologii Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wrzesień 2010 - Listopad 2010	staż naukowy Katedra Chemii Analitycznej Wydział Chemii Inżynierskiej i Technologii Uniwersytetu w Zagrzebiu
Luty 2010 - Sierpień 2013	uczestnik dziennych studiów doktoranckich Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**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:**

**„Ocena profili metabolomicznych w zaburzeniach układu sercowo-naczyniowego, schorzeniach onkologicznych i wrodzonych wadach anatomicznych”**

Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 219, ust. 1, pkt. 2b ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) stanowi cykl 6 publikacji naukowych (5 prac oryginalnych oraz 1 pracy przeglądowej), opublikowanych w latach 2015-2021. W 4 publikacjach jestem pierwszym autorem, natomiast w pozostałych 2 – równorzędnym pierwszym autorem. Przedstawione prace składają się na monotematyczny cykl i dotyczą zastosowania niecelowanych analiz metabolomicznych w poszukiwaniu nowych wskaźników diagnostycznych oraz celów terapeutycznych, na przykładzie zaburzeń układu sercowo-naczyniowego, schorzeń onkologicznych oraz wrodzonych wad anatomicznych.

Łączna wartość bibliometryczna cyklu wymienionych powyżej publikacji wynosi:

**IF = 26.209; punktacja MEiN = 495.**

Oświadczenia określające mój udział w powstaniu wymienionych prac znajdują się w załączniku nr 4 - Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny.

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w załącznikach nr 6.1-6.6.

#### **4.2. Wykaz opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:**

**H1. Bujak Renata**, Struck-Lewicka Wiktoria, Markuszewski Michał Jan, Kaliszan Roman. *Metabolomics for laboratory diagnostics*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 113: 108-120. [Wskaźnik IF=3.169; MEiN: 35]‡

**H2. Wawrzyniak Renata**, Woźniak Agnieszka, Gebreyohannes Yemarshet, Dykcik Bartosz, Schöffski Patrick, Markuszewski Michał Jan. *Volatile organic compounds in gastrointestinal stromal tumour tissue originating from patient-derived xenografts*. *J Breath Res.* 2017, 11: (3):037101. [Wskaźnik IF=3.489; MEiN: 40]

**H3. Wawrzyniak Renata**, Kosnowska Anna, Macioszek Szymon, Bartoszewski Rafał, Markuszewski Michał Jan. *New plasma preparation approach to enrich metabolome coverage in untargeted metabolomics: plasma protein bound hydrophobic metabolite release with proteinase K*. *Sci. Rep.*, 2018, 8, 1-10. [Wskaźnik IF: 4.011; MEiN: 40]

**H4. Wawrzyniak Renata**, Yumba Mpanga Arlette., Struck-Lewicka Wiktoria, Kordalewska Marta, Polonis Katarzyna, Patejko Małgorzata, Mironiuk Monika, Szyndler Anna, Chrostowska Marzena, Hoffmann Michał, Smoleński Ryszard Tomasz, Kaliszan Roman, Narkiewicz Krzysztof, Markuszewski Michał Jan. *Untargeted Metabolomics Provides Insight into the Mechanisms Underlying Resistant Hypertension*. *Curr Med Chem.* 2019, 26:232-243. [Wskaźnik IF=4.184 punktacja MEiN: 100]

**H5. Polonis Katarzyna\***, **Wawrzyniak Renata\***, Dagher-Wojtkowiak Emilia\*, Szyndler Anna, Chrostowska Marzena, Melander Olle, Hoffmann Michał, Kordalewska Marta, Raczak-Gutknecht Joanna, Bartosińska Ewa, Kaliszan Roman, Narkiewicz Krzysztof, Markuszewski Michał Jan. *Metabolomic signature of early vascular aging (EVA) in hypertension*. *Front. Mol. Biosci.*, 2020, 7, 1-11. [Wskaźnik IF: 5.246; MEiN: 140]

**H6. Macioszek Szymon\***, **Wawrzyniak Renata\***, Kranz Anna, Kordalewska Marta, Struck-Lewicka Wiktoria, Dudzik Danuta, Biesemans Margot, Maternik Michał, Żurowska Aleksandra, Markuszewski Michał Jan. *Comprehensive metabolic signature of renal dysplasia in children. A multiplatform metabolomics concept*. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, 8, 1-14. [Wskaźnik IF: 6.113; MEiN: 140]

\* - równy wkład autorów

‡ - praca przeglądowa

### **4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **WPROWADZENIE**

Dynamiczna homeostaza jest wspólną cechą każdego żywego systemu biologicznego. Oznacza to, że dany organizm zmienia się w konsekwencji ekspozycji na różne czynniki, zarówno endogenne, jak i egzogenne, m.in.: zastosowaną farmakoterapię, dietę czy bodźce środowiskowe [1]. Inicjacja, progresja oraz regresja stanu patofizjologicznego także może prowadzić do zaburzeń równowagi wewnętrznej w układzie biologicznym lub jego poszczególnych składowych, tj.: komórce, tkance czy narządzie. W przeprowadzonych do tej pory badaniach diagnostycznych czy biomedycznych, zwykle wykorzystywano podejście jednoczynnikowe; skupiające się na ocenie zmian na poziomie pojedynczego genu, białka czy enzymu, w celu poznania patomechanizmów oraz zaproponowania leczenia różnych stanów patofizjologicznych. W ostatniej dekadzie nastąpił intensywny rozwój dziedzin biologii systemów (systemowej), który dostarczył nowego, wieloczynnikowego podejścia do oceny patomechanizmów danej jednostki chorobowej [2].

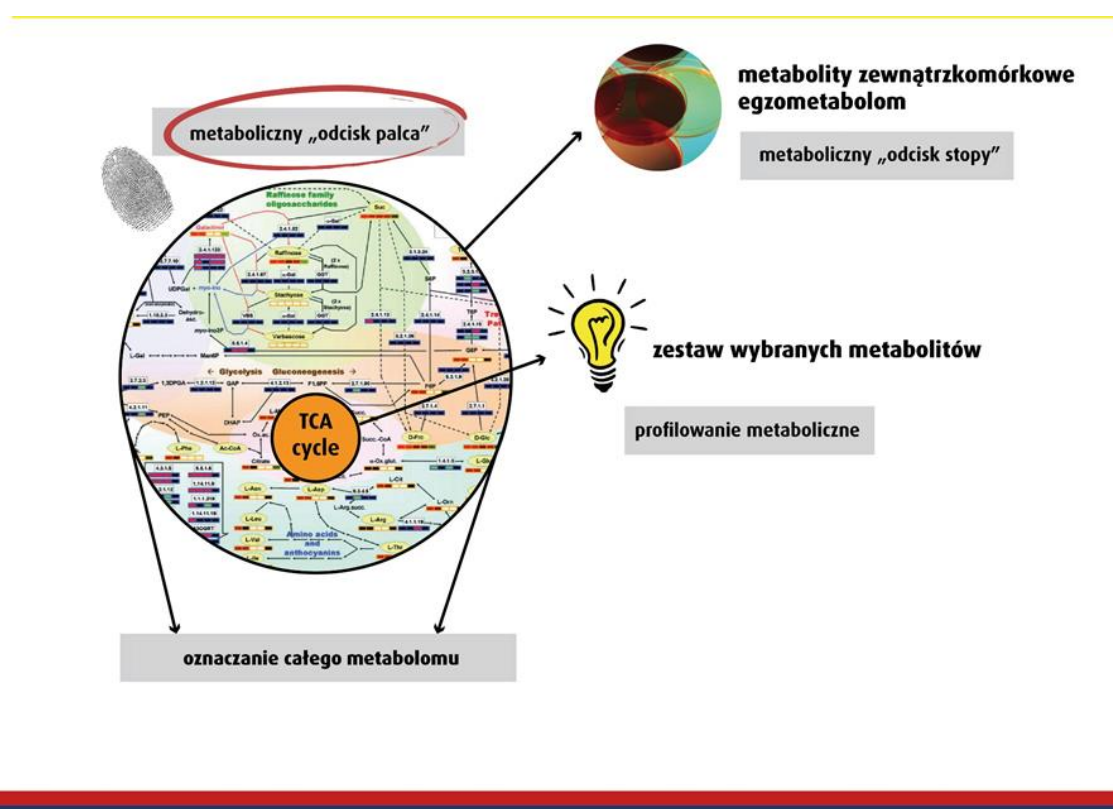
Nieustanny rozwój wielkoskalowych i czułych technik analitycznych oraz zaawansowanych metod statystycznych, pozwala na ciągle poszerzanie wiedzy dotyczącej oceny składu oraz zmian ilościowych ludzkiego metabolomu. Metabolom definiowany jest jako zbiór wszystkich małowcząsteczkowych metabolitów (masa cząsteczkowa  $<1,5\text{kDa}$ ) obecnych w badanym systemie biologicznym. Zmiany na poziomie genomu lub proteomu określają predyspozycje do wystąpienia reakcji na różne czynniki biologiczne czy środowiskowe. Z kolei zmiany na poziomie metabolomu odzwierciedlają aktualny stan danego układu biologicznego, zarówno fizjologiczny, jak i patofizjologiczny. Ponadto, zmiany obserwowane w metabolomie są konsekwencją dynamicznych procesów zachodzących na poziomie genomu, transkryptomu i proteomu. Dlatego też, analizy metabolomu stanowią chemiczne odzwierciedlenie aktualnego fenotypu określonego systemu biologicznego oraz mają potencjał aby wyjaśnić wciąż nie do końca poznane zależności pomiędzy jego genotypem i fenotypem. Ponadto, z diagnostycznego punktu widzenia, zmiany metaboliczne mogą pojawić się szybciej niż charakterystyczne dla danego stanu patofizjologicznego objawy kliniczne. Z tych właśnie powodów, metabolomika staje się coraz częściej stosowaną dziedziną biologii systemowej. Jest to szczególnie widocznie zwłaszcza w badaniach biomedycznych, dotyczących poszukiwania czułych i specyficznych wskaźników diagnostycznych oraz nowych celów terapeutycznych.

Za początki badań metabolomicznych można uznać czasy starożytnej Grecji, kiedy na podstawie koloru, smaku lub zapachu moczu, rozpoznawano schorzenia o podłożu metabolicznym, m.in. cukrzycę [3]. Jednak dopiero systematyczne badania przeprowadzane w latach 70-tych XX wieku przez Horninga [4,5] oraz Paulinga i wsp. [6] zapoczątkowały nowe podejście do badań metabolomicznych. Koncentrowało się ono jednak raczej na analizie zestawu metabolitów w płynach biologicznych niż na oznaczaniu pojedynczego metabolitu. Nowoczesne podejście do metabonomiki i metabolomiki zostało zaproponowane ok. 20 lat temu. Nicholson i wsp. [7] zdefiniowali metabonomikę jako: „ilościowy pomiar dynamicznej wieloczynnikowej odpowiedzi metabolicznej organizmów żywych na bodźce patofizjologiczne lub modyfikacje genetyczne”. Z kolei Fiehn [8], uznawany za jednego z pionierów badań metabolomicznych na świecie, określił metabolomikę jako „kompleksową i ilościową analizę wszystkich metabolitów w systemie biologicznym”. Warto także zaznaczyć, że różnica między metabonomiką i metabolomiką jest subtelna i raczej lingwistyczna niż techniczna. Dlatego też, w praktyce terminy te są powszechnie stosowane, często używane zamiennie i wykorzystują te same narzędzia analityczne oraz metody obliczeniowe [3]. W 2008 roku zostały zapoczątkowane badania wykorzystujące podejście farmakometabolomiczne. Farmakometabolomika, nazywana również farmakometabonomiką, odnosi się do bezpośredniego pomiaru metabolitów w różnych materiałach biologicznych pobranych od danego pacjenta w celu przewidywania lub oceny metabolizmu substancji farmaceutycznej oraz lepszego zrozumienia jej profilu farmakokinetycznego. Farmakometabolomika stosowana jest także w oznaczaniu poziomów metabolitów po podaniu konkretnego leku, w celu monitorowania jego wpływu na określone szlaki metaboliczne. Podejście to zapewnia kompleksową ocenę mechanizmu działania leku, poprzez jego wpływ na szlaki biochemiczne, co potencjalnie może również wyjaśnić zjawisko zmienności odpowiedzi na leczenie [9-12]. Dodatkowo, wyjściowy profil metaboliczny pacjenta (metabotyp) dostarcza informacji o tym, jak poszczególne jednostki reagują na leczenie i podkreśla zróżnicowanie w obrębie stanu patofizjologicznego [13].

W 2009 roku, Ceglarek i wsp. [14] wprowadzili definicję metabolomiki klinicznej, której celem jest ocena oraz przewidywanie ryzyka wystąpienia choroby u danej osoby poprzez badanie zmian metabolicznych w płynach ustrojowych lub tkankach, wywołanych przez czynniki genetyczne, epigenetyczne, behawioralne, ekspozycję środowiskową lub dietę.

W aktualnie prowadzonych badaniach metabolomicznych wykorzystuje się dwa główne podejścia badawcze [15]. Pierwsze z nich stanowią celowane analizy metabolomiczne (tzw.

profilowanie metaboliczne), które skupiają się na ilościowym oznaczeniu określonego zestawu metabolitów pochodzących z jednego szlaku biochemicznego (np. glikoliza, cykl Krebsa, fosforylacja oksydacyjna) lub o zbliżonych właściwościach fizykochemicznych (np. aminokwasy, kwasy organiczne, fosfolipidy, długołańcuchowe karnityny). W tej strategii hipoteza badawcza jest od początku określona i głównym jej celem jest opracowanie oraz walidacja metody analitycznej pozwalającej na czułe, dokładne i precyzyjne oznaczenia ilościowe wybranej grupy metabolitów. Z kolei niecelowane analizy metabolomiczne polegają na półilościowym oznaczeniu możliwie jak największej liczby małowymiarowych metabolitów obecnych w próbkach biologicznych. W badaniach mikrobiologicznych lub biotechnologicznych najczęściej stosuje się podejście tzw. „metabolicznego odcisku stopy”, które skupia się na ocenie egzometabolomu, czyli metabolitów zewnątrzkomórkowych, wydzielanych przez dany organizm do pożywki, na której obserwowany jest jego wzrost. Podejścia badawcze w aktualnie prowadzonych badaniach metabolomicznych przedstawiono na Rycinie 1.



Rycina 1. Najczęściej stosowane podejścia badawcze w analizach metabolomicznych.



Ze względu na zróżnicowane właściwości fizykochemiczne oraz zakresy stężeń oznaczanych analitów, w niecelowanych analizach metabolomicznych często konieczne jest zastosowanie komplementarnych platform analitycznych oraz zaawansowanych metod statystycznych, aby zwiększyć zakres oznaczanych analitów, a także zapewnić prawidłową analizę wielowymiarowych danych pomiarowych. Obecnie najczęściej stosowanymi platformami analitycznymi w analizach metabolomicznych są spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*, MS) oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) [16,17].

NMR to pionierska, uniwersalna pod kątem identyfikacji strukturalnej, nieniszcząca próbki oraz powtarzalna technika analityczna. Jednak sporą wadą jest jej niska czułość, co stanowi duże ograniczenie w oznaczeniach analitycznych metabolitów występujących na niskich poziomach stężeń, zwłaszcza w próbkach biologicznych o złożonym składzie matrycy.

MS charakteryzuje się dużą czułością, często wysoką rozdzielczością, szerokim zakresem pomiarowym metabolitów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych oraz dużą szybkością zbierania danych. Ponadto MS jest często łączona z technikami separacyjnymi oraz elektromigracyjnymi, tj.: wysokosprawną czy ultrawysokosprawną chromatografią cieczową (ang. *high-performance liquid chromatography*, *ultra-high-performance liquid chromatography*, HPLC, UHPLC), chromatografią gazową (ang. *gas chromatography*, GC) i elektroforeza kapilarna (ang. *capillary electrophoresis*, CE). Z tych powodów techniki łączone oparte na MS są obecnie najczęściej stosowane w niecelowanych analizach metabolomicznych. GC-MS jest techniką z wyboru dla analitów lotnych lub takich które można łatwo przekształcić w lotne pochodne za pomocą konwersji chemicznej (upochadniania), głównie kwasów organicznych, aminokwasów, kwasów tłuszczowych czy cukrów. HPLC-MS oraz UHPLC-MS, wykorzystujące różnorodne fazy stacjonarne (tj. RP: odwrócony układ faz czy HILIC: chromatografia oddziaływań hydrofilowych) to techniki łączone, dedykowane do oznaczeń analitycznych nietlotnych, termicznie niestabilnych analitów o szerokim zakresie zarówno masy cząsteczkowej, jak i polarności [18]. Z kolei za pomocą techniki CE-MS można przeprowadzić pomiary analityczne związków o różnej masie cząsteczkowej, obdarzonych ładunkiem lub charakteryzujących się dużą polarnością. Jednak ze względu na konieczność zastosowania cieczy osłonowej, dużym problemem technicznym jest prawidłowe połączenie aparatu do elektroforezy kapilarnej ze spektrometrem mas. Dlatego też w ostatnich latach, dla CE-MS

zaproponowano różne rozwiązania technologiczne pozwalające na stosowanie tej techniki bez użycia cieczy osłonowej [19, 20]. Pomimo to, ta platforma analityczna jest najrzadziej stosowana w niecelowanych analizach metabolomicznych.

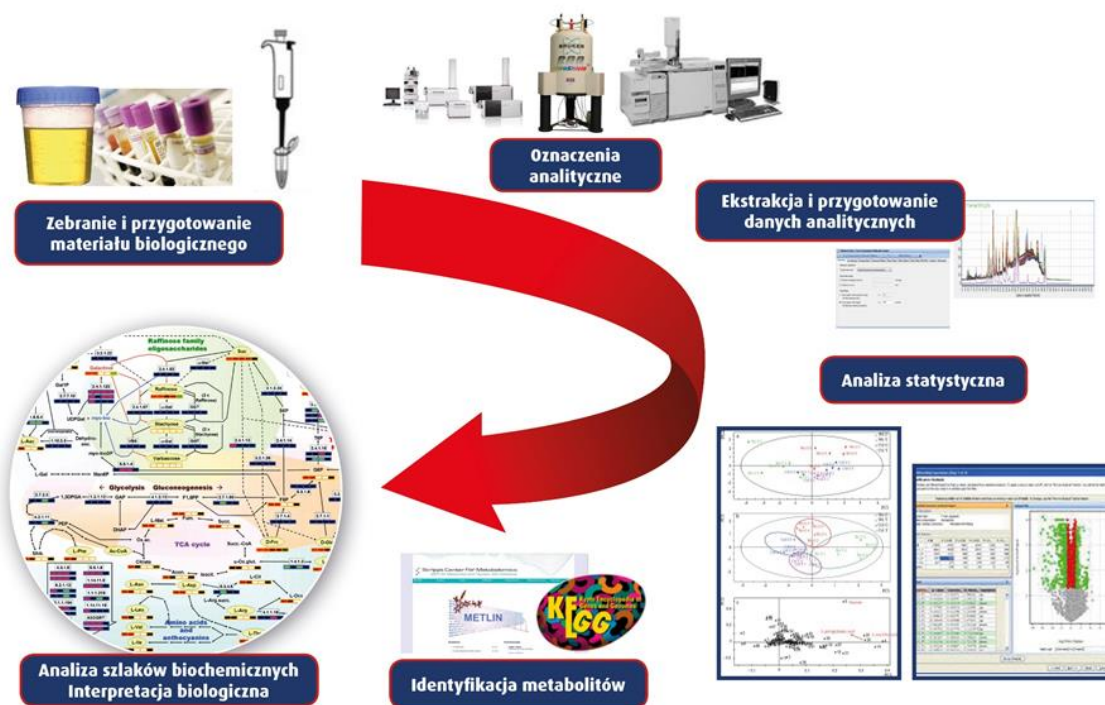
Najważniejsze wady i zalety NMR, GC-MS oraz LC-MS, pod kątem ich zastosowań w metabolomice przedstawiono na Rycinie 2.



Rycina 2. Zalety i wady najczęściej stosowanych platform analitycznych w metabolomice.

W niecelowanych analizach metabolomicznych próbek biologicznych należy od samego początku prawidłowo opracować schemat badawczy. Najczęściej obejmuje on: zaplanowanie eksperymentu, odpowiednie pobranie oraz przechowanie próbek materiału biologicznego, ekstrakcję metabolitów z matrycy o często złożonym składzie, przeprowadzenie oznaczeń analitycznych, przygotowanie i przetwarzanie danych pomiarowych, analizy statystyczne, identyfikację metabolitów oraz interpretację biochemiczną. Na etapie planowania eksperymentu, istotne jest ustalenie kryteriów włączenia/wyłączenia pacjentów, rodzaju oraz sposobu pobrania i zabezpieczenia materiału biologicznego, a także dobranie grup badanych pod względem, wieku, płci czy wskaźnika masy ciała (ang. *body mass index*, BMI), aby zminimalizować wpływ zmienności międzyosobniczej na oznaczane profile metabolomiczne.

Następnie opracowywana jest procedura przygotowania próbek biologicznych, która ma zapewnić ekstrakcję możliwie jak największej liczby metabolitów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych. Dlatego też etap ten zależy w największym stopniu od rodzaju techniki pomiarowej zastosowanej do oznaczeń analitycznych w kolejnym kroku schematu badawczego. W niecelowanych analizach metabolomicznych, właśnie ze względu na szeroki zakres zarówno właściwości fizykochemicznych, jak i stężeń oznaczanych analitów, często stosuje się wzajemnie komplementarne platformy analityczne. Uzyskane macierze danych pomiarowych w niecelowanych analizach metabolomicznych są wielowymiarowe, a liczba zmierzonych sygnałów analitycznych często przekracza liczbę analizowanych próbek. Dlatego w kolejnym etapie dane pomiarowe poddaje się odpowiedniemu przetwarzaniu, które zazwyczaj obejmuje: dekonwolucję, wyrównanie sygnałów analitycznych (ze względu na możliwe odchylenia w pomiarze masy, czasu retencji/migracji), normalizację, skalowanie oraz filtrowanie [21]. Odpowiednio przetworzone zestawy danych poddaje się analizom statystycznym, w których wykorzystuje się zarówno testy jedno- jak i wielowymiarowe [22]. W testach jednowymiarowych konieczne jest zastosowanie testowania wielokrotnego, aby wyznaczyć wartość poziomu istotności (ang. *p-value*) z uwzględnieniem ilości ocenianych analitów (często ok. 1000) i w ten sposób zminimalizować ryzyko wystąpienia wyników fałszywie dodatnich (ang. *false discovery rate*, FDR). Do najczęściej stosowanych testów wielowymiarowych w niecelowanych analizach metabolomicznych należą: analiza składowych głównych (ang. *principal component analysis*, PCA), analiza dyskryminacyjna cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. *partial least square discriminant analysis*, PLS-DA), metoda lasów losowych (ang. *random forest*, RF), regresja liniowa i logistyczna, czy modelowanie bayesowskie oraz hierarchiczne [23]. W kolejnym etapie istotne statystycznie sygnały analityczne są wstępnie identyfikowane na podstawie dostępnych baz danych tj.: Human Metabolome Database (HMDB), LIPIDMAPS, METLIN, CEU Mass Mediator czy KEGG. Następnie, zaproponowane struktury chemiczne są potwierdzane za pomocą substancji wzorcowych, a w przypadku braku ich dostępności, najczęściej na podstawie fragmentacyjnych widm fragmentacyjnych mas. Zidentyfikowane metabolity endogenne oceniane są w kontekście szlaków biochemicznych, z których pochodzą, a potencjalnie związanych z danym stanem patofizjologicznym, jego stopniem zaawansowania lub zastosowaną farmakoterapią. Typowy schemat badawczy w niecelowanych analizach metabolomicznych został przedstawiony na Rycinie 3.



Rycina 3. Typowy schemat badawczy przedstawiający etapy niecelowanych analiz metabolomicznych.

Pomimo ciągłego doskonalenia rozwiązań analityczno-chemometrycznych w niecelowanych analizach metabolomicznych, ich zastosowanie w praktyce klinicznej wciąż jest ograniczone. Wynika to przede wszystkim z braku możliwości oceny profili metabolomicznych dużej liczby próbek biologicznych w jednej serii pomiarów, ze względu na dużą zmienność analityczną. Ponadto, wciąż brakuje standardowych procedur operacyjnych (SOP), które pozwoliłyby na walidację międzylaboratoryjną w badaniach wielośrodkowych, a wymaganych do zaproponowania związków o potencjale biomarkerowym. Brakuje również certyfikowanych laboratoriów, specjalizujących się niecelowanych analizach metabolomicznych [24,25]. Dlatego do oceny specyficznych i czułych wskaźników diagnostycznych chorób cywilizacyjnych, zdecydowanie lepszym podejściem badawczym są celowane analizy metabolomiczne. Niecelowane analizy metabolomiczne mają z kolei zdecydowanie większy potencjał poznawczy w przypadku poszukiwania nowych wskaźników diagnostycznych, prognostycznych czy celów terapeutycznych w rzadkich schorzeniach patofizjologicznych, których patomechanizmy nie zostały do tej pory wyjaśnione, i/lub które często rozwijają się przez długi czas bezobjawowo lub nie odpowiadają na zastosowaną farmakoterapię.

## CELE NAUKOWE I OMÓWIENIE WYNIKÓW

W badaniach przeprowadzonych w ramach osiągnięcia habilitacyjnego zastosowano wielkoskalowe techniki łączone wykorzystujące spektrometrię mas oraz różne metody separacyjne tj. wysokosprawną chromatografię cieczową czy chromatografię gazową.

Do analizy otrzymanych danych pomiarowych zastosowano zaawansowane metody statystyczne, co pozwoliło na kompleksową ocenę zmian metabolicznych, potencjalnie związanych z patogenezą rzadkich schorzeń patofizjologicznych, tj.: nowotwory podścieliska przewodu pokarmowego, odporne nadciśnienie tętnicze, wczesne starzenie naczyń oraz dysplazja nerek. Główny cel badań został osiągnięty poprzez realizację celów cząstkowych tj.:

- A) Ocena potencjału badań metabolomicznych, ze szczególnym uwzględnieniem podejścia niecelowanego, pod kątem zastosowań w diagnostyce laboratoryjnej (**Publikacja H1**);
- B) Oznaczenie oraz porównanie profili metabolomicznych guzów podścieliskowych żołądka w modelach myszy ksenograficznych o różnym podłożu genetycznym za pomocą techniki GC-MS (**Publikacja H2**);
- C) Opracowanie nowej metody przygotowania próbek osocza z wykorzystaniem proteiny K do niecelowanych analiz metabolomicznych (**Publikacja H3**);
- D) Przeprowadzenie niecelowanych analiz metabolomicznych próbek osocza u pacjentów z opornym nadciśnieniem tętniczym z wykorzystaniem techniki LC-TOF/MS (**Publikacja H4**);
- E) Ocena profili metabolomicznych próbek osocza u pacjentów, u których potwierdzono wczesne starzenie tętnic za pomocą techniki LC-TOF/MS (**Publikacja H5**);
- F) Kompleksowa ocena zmian metabolicznych próbek moczu w populacji pediatrycznej z wrodzoną dysplazją nerek z wykorzystaniem komplementarnych technik analitycznych (**Publikacja H6**).

W pracy przeglądowej (**Publikacja H1**), na podstawie dostępnej literatury, opisano podejścia badawcze, rozwiązania analityczne oraz chemometryczne stosowane do oceny profili metabolicznych różnych matryc biologicznych (np.: osocze lub surowica krwi żyłnej, mocz, ekstrakty tkankowe, ślina czy wydychane powietrze), pod kątem potencjalnych zastosowań w diagnostyce laboratoryjnej. Analizy metabolomiczne, które opierają się na zastosowaniu czułych technik analitycznych i zaawansowanych narzędzi chemometrycznych, mogą zapewnić nowe i użyteczne podejście w prawidłowym rozpoznaniu czy monitorowaniu stanów patofizjologicznych. Ciekawym kierunkiem zastosowania badań metabolomicznych, jest łączenie ich z wynikami uzyskanymi z różnych dziedzin biologii systemów, tj. genomika, transkryptomika czy proteomika w celu zapewnienia holistycznej oceny patomechanizmów specyficznych dla fenotypu danej jednostki chorobowej. Metabolomika, od ponad dwóch dekad, jest często stosowana w poszukiwaniu nowych, bardziej specyficznych i mniej inwazyjnych biomarkerów różnych stanów patofizjologicznych. Jednak jej zastosowanie w badaniach biomedycznych, wciąż jest ograniczone, co wynika z braku wiarygodnej walidacji przeprowadzonej w badaniach populacyjnych. Aby potwierdzić wartość diagnostyczną czy prognostyczną potencjalnych biomarkerów metabolicznych, konieczne jest przeprowadzenie ich oceny ilościowej u zdecydowanie liczniejszej grupy badanej, którą można uzyskać prowadząc badanie wielośrodkowe. W tym celu konieczne jest opracowanie standardowych procedur operacyjnych (SOP), które pozwolą na walidację międzylaboratoryjną zaproponowanych wskaźników o znaczeniu biomarkerowym. Dlatego też, kolejne publikacje naukowe stanowiące osiągnięcie habilitacyjne (**Publikacje H2, H4-H6**) dotyczą zastosowania niecelowanych analiz metabolomicznych różnych próbek biologicznych z wykorzystaniem technik łączonych oraz zaawansowanych metod statystycznych do oceny rzadkich stanów patofizjologicznych, tj: nowotwory podścieliska przewodu pokarmowego, odporne na farmakoterapię nadciśnienie tętnicze, wczesne starzenie naczyń oraz wrodzona dysplazja nerek.

Według badania EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) prowadzonego w czternastu krajach, nowotwory mezenchymalne podścieliska przewodu pokarmowego (*ang. gastrointestinal stromal tumors, GIST*) stanowią 4-5 przypadków/milion/rok i na tej podstawie można się spodziewać 150-190 nowych przypadków w Polsce rocznie [26]. Proces nowotworowy, w przypadku GIST, inicjują mutacje w genach kodujących błonowe receptory o aktywności kinazy tyrozynowej, tj: KIT

(ang. *kinase receptor- CD117*) lub PDGFRA (ang. *platelet derived growth factor receptor alpha*) [26]. Nadekspresja tych receptorów jest charakterystyczna dla nowotworów GIST i może występować na całej długości przewodu pokarmowego. Na podstawie mutacji jakie wystąpiły w poszczególnych genach można przedstawić molekularną klasyfikację GIST (Tabela 1.)

Tabela 1. Molekularna klasyfikacja nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego [26].

<b>Mutacje genu KIT</b>	Ekson 9
	Ekson 11
	Ekson 13
	Ekson 17
<b>Mutacje genu PPDGFRA</b>	Ekson 12
	Ekson 14
	Ekson 18
<b>Brak mutacji</b>	„Wilde type”

Kliniczne objawy GIST często są dość niespecyficzne. Należą do nich: ból brzucha, czasami objawy „ostrego brzucha”, zaparcia, zaburzenia połykania, uczucie sytości czy anemia. Niewielkie zmiany niestety długo pozostają bezobjawowe, a wykrywane są przypadkowo np. podczas badania endoskopowego, badania radiologicznego, czy w czasie zabiegu operacyjnego wykonanego z innego powodu. Dotychczasowa diagnostyka nowotworów GIST opiera się głównie na badaniach obrazowych, tj.: tomografia komputerowa, czy rezonans magnetyczny, oraz badaniach mikroskopowych pobranych wycinków guza. Radykalne leczenie chirurgiczne na chwilę obecną jest najbardziej skuteczną metodą leczenia GIST. W leczeniu farmakologicznym stosuje się drobnocząsteczkowe inhibitory kinazy tyrozynowej. Lekiem pierwszego rzutu zwykle jest imatynib [26], jednak coraz częściej występuje oporność guza na zastosowaną farmakoterapię i dochodzi wówczas do progresji nowotworu. Dlatego też, głównym celem badań opisanych w **publikacji H2** było oznaczenie oraz porównanie profili metabolomicznych ekstraktów guza pochodzących z trzech mysich modeli ksenograficznych GIST charakteryzujących się różnymi mutacjami genu KIT. Niecelowane analizy metabolomiczne przeprowadzono z wykorzystaniem techniki GC–MS oraz jedno-

i wielowymiarowych analiz statystycznych. Zaobserwowane różnice w profilach metabolomicznych dla porównywanych modeli GIST przedstawiono w poniższych Tabelach (Tabela 2-4).

Tabela 2. Istotne statystycznie różnice w profilach metabolomicznych guzów GIST: model M1 (mutacja p.K588, ekson 11) vs model M2 (mutacja p.557, ekson 11).

<b>METABOLIT</b>	<b>CZAS RETENCJI</b>	<b>SKORYGOWANY POZIOM ISTOTNOŚCI (pBH FDR)</b>	<b>VIP</b>	<b>KIERUNEK ZMIANY W PORÓWNYWANYCH MODELACH (M1 vs M2)</b>
Kwas fenyllooctowy	21.6	0.017	1.8	Wzrost
3-Metylo-2-fenylindol	10.8	0.001	1.7	Wzrost
Aldehyd benzoesowy	7.4	0.010	1.6	Wzrost
Kwas-3-fenylomlekowy	12.4	0.017	1.6	Wzrost
Butyrylokarnityna	11.2	0.013	1.5	Wzrost
Kwas oleopalmitynowy	10.7	0.019	1.5	Wzrost
Kwas asparaginowy	15.1	0.011	1.5	Wzrost
Laktoza	15.5	0.016	1.5	Wzrost
Kwas – 2-hydroksykapronowy	11.9	0.011	1.5	Wzrost
Kwas mlekowy	7.0	0.011	1.5	Wzrost



Tabela 3. Istotne statystycznie różnice w profilach metabolomicznych guzów GIST: model M1 (mutacja p.K588, ekson 11) vs model M3 (mutacja p.K642E, ekson 13).

<b>METABOLIT</b>	<b>CZAS RETENCJI</b>	<b>SKORYGOWANY POZIOM ISTOTNOŚCI (pBH FDR)</b>	<b>VIP</b>	<b>KIERUNEK ZMIANY W PORÓWNYWANYCH MODELACH (M1 vs M3)</b>
Kwas-3-ureidopropanowy	13.9	0.00006	1.7	Spadek
Arabitol	16.4	0.0007	1.6	Wzrost
Kwas $\alpha$ -ketoglutarynowy	14.9	0.0007	1.6	Wzrost
Kwas malonowy	9.5	0.0004	1.5	Wzrost
Kwas asparaginowy	15.1	0.001	1.5	Wzrost
Kwas-2-hydroksykapronowy	11.9	0.0009	1.5	Wzrost
Butyrylokarnityna	11.25	0.0004	1.5	Wzrost
Kwas-3-fenylomlekowy	12.4	0.001	1.5	Wzrost

Tabela 4. Istotne statystycznie różnice w profilach metabolomicznych guzów GIST: model M2 (mutacja p.K557, ekson 11) vs model M3 (mutacja p.K642E, ekson 13).

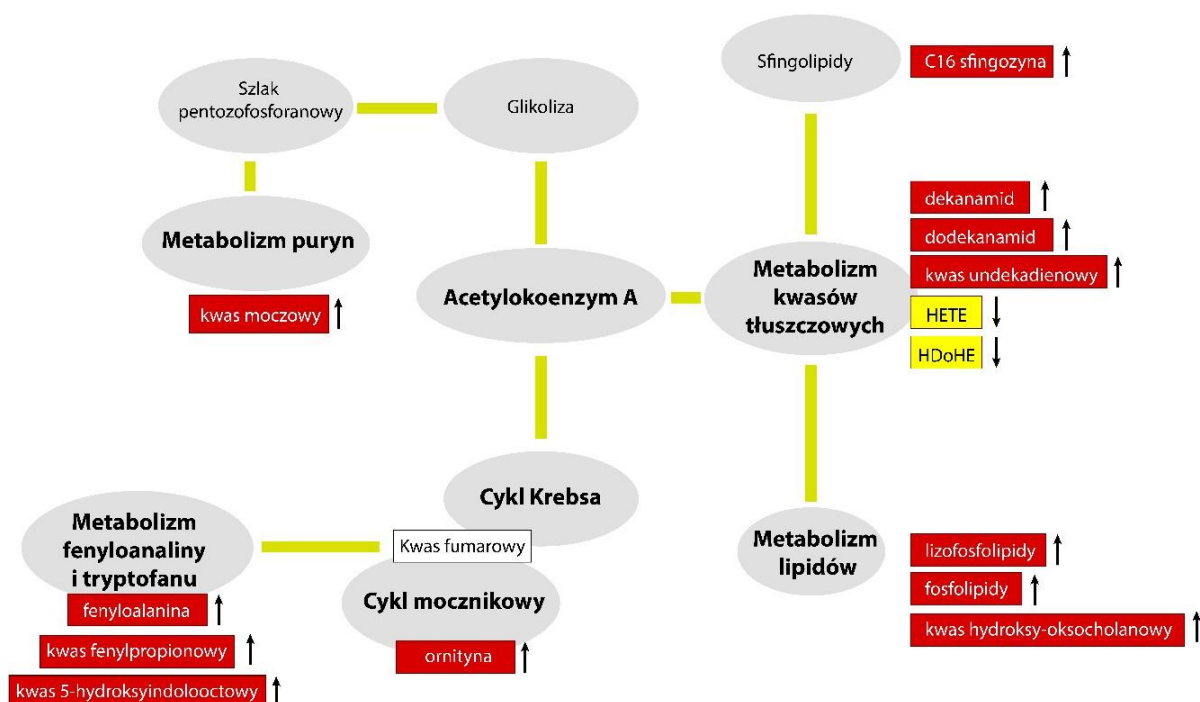
<b>METABOLIT</b>	<b>CZAS RETENCJI</b>	<b>SKORYGOWANY POZIOM ISTOTNOŚCI (pBH FDR)</b>	<b>VIP</b>	<b>KIERUNEK ZMIANY W PORÓWNYWANYCH MODELACH (M2 vs M3)</b>
Kwas stearynowy	13.9	0.031	2.2	Spadek
Kwas malonowy	17.5	0.008	2.0	Spadek
Kwas fenylomlekowy	8.1	0.008	2.0	Spadek
Arabilol	16.4	0.008	2.0	Wzrost
Kwas- 1-metylomoczowy	15.4	0.025	1.9	Wzrost
Cysteina	13.2	0.025	1.8	Wzrost

Otrzymane wyniki wskazują, że różne typy mutacji w badanych modelach mysich GIST, mają odzwierciedlenie w profilach metabolomicznych guza. Interpretacja biochemiczna zaobserwowanych różnic metabolicznych pozwoliła na ocenę szlaków metabolicznych, które zmieniają się w odpowiedzi na mutacje genu KIT (**Rycina 5 Publikacja H2**).

W badanych ksenografach modeli mysich zaobserwowano zwiększoną aktywność procesu glikolizy, glutaminolizy oraz zmieniony metabolizm lipidów, jako charakterystyczne cechy metabolizmu tkanki GIST. Te zmiany metaboliczne prawdopodobnie odpowiadają za przeżycie komórek nowotworowych, ich wzrost oraz proliferację. Ponadto, aktywacja lub inhibicja enzymów regulujących zmienione szlaki biochemiczne może być przydatna w zaproponowaniu nowych strategii terapeutycznych GIST. Przeprowadzone badanie jest pierwszym dostępnym w literaturze naukowej, które opisuje zmiany metaboliczne charakterystyczne dla tkanki guza z różnymi mutacjami genu KIT. Zaproponowane podejście metabolomiczne jest punktem wyjścia do dalszych badań, mających na celu ocenę zmian metabolicznych guzów leczonych. Niecelowane analizy metabolomiczne stanowią użyteczne narzędzie do wyjaśnienia patofizjologii GIST, oceny odpowiedzi metabolicznej na zastosowaną farmakoterapię oraz poszukiwania nowych celów terapeutycznych.

Nadciśnienie tętnicze (NT) dotyczy około 30% osób dorosłych na całym świecie [27]. U co najmniej 10% leczonych pacjentów obserwuje się występowanie opornego na farmakoterapię nadciśnienia tętniczego (ONT) [28]. Ciśnienie krwi u tych pacjentów pozostaje wysokie pomimo zastosowanego leczenia (co najmniej trzy leki hipotensyjne w najlepiej tolerowanych dawkach, z których jeden jest zwykle lekiem moczopędnym) [29,30]. Niekontrolowane nadciśnienie jest głównym czynnikiem ryzyka schorzeń układu sercowo-naczyniowego, tj.: choroba niedokrwienna serca, choroba naczyń mózgowych, czy niewydolność serca. Ryzyko sercowo-naczyniowe jest nawet o 50% wyższe u pacjentów z ONT niż u pacjentów z dobrze kontrolowanym NT [31]. Świadczy to o tym, że ONT stanowi poważny problem zdrowia publicznego i podkreśla potrzebę prowadzenia dalszych badań mających na celu wyjaśnienie jego patogenezy oraz zaproponowanie nowych celów terapeutycznych. W związku z tym, celem badań opisanych w **publikacji H4**, była ocena profili metabolomicznych próbek osocza pacjentów z ONT (n=69) w porównaniu do pacjentów z kontrolowanym NT (n=81) za pomocą techniki HPLC-TOF/MS, w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Porównywane grupy pacjentów dobrano

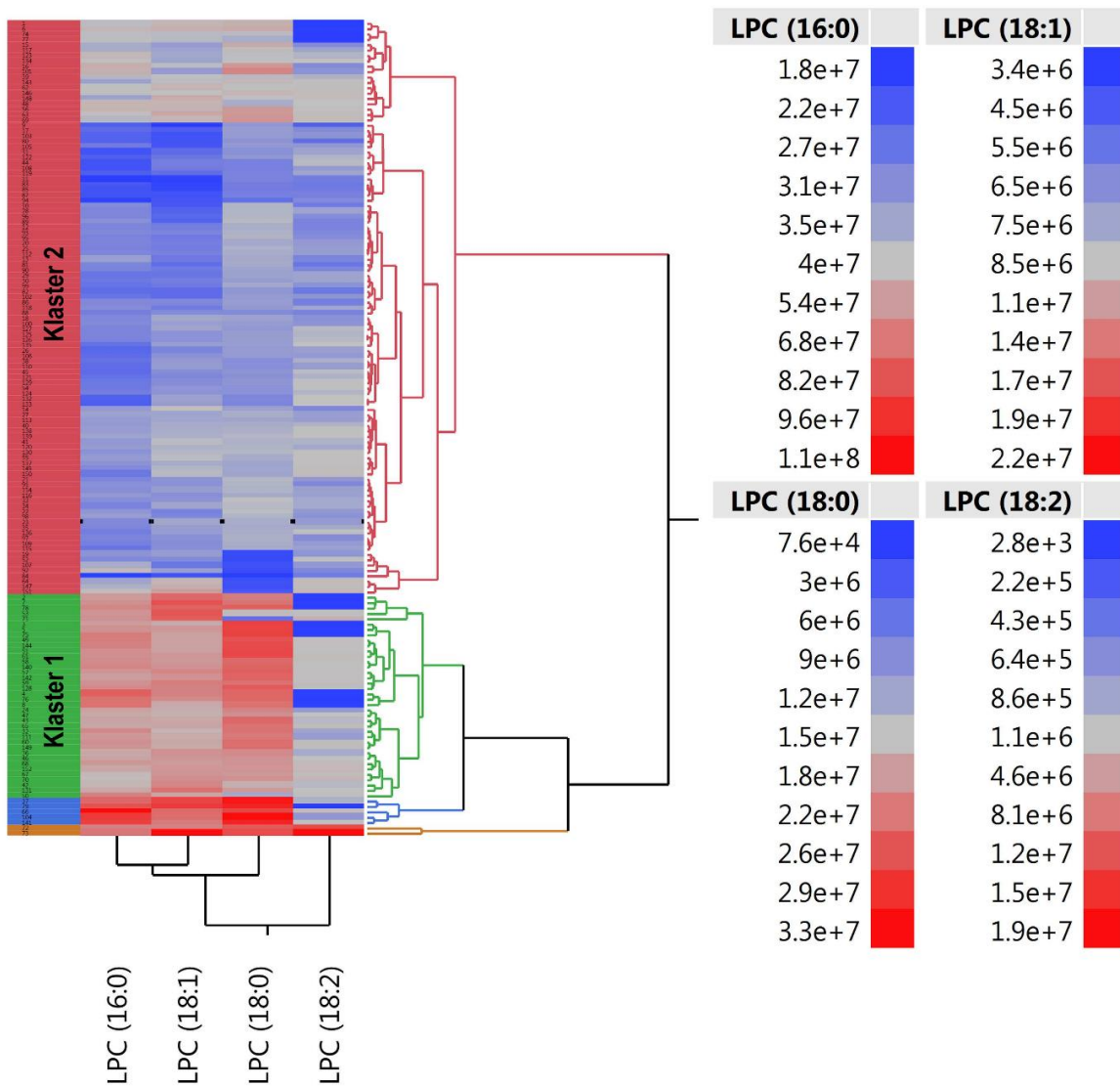
pod względem wieku ( $57,7 \pm 12,7$  u ONT i  $58,2 \pm 11,3$  lat u NT) i wskaźnika masy ciała ( $30,4 \pm 4,7$  i  $31,3 \pm 5,1$  kg/m<sup>2</sup>, odpowiednio u ONT i NT). ONT zdefiniowano jako ciśnienie krwi powyżej SBP  $\geq 140$  i/lub DBP  $\geq 90$  mmHg pomimo stosowania co najmniej 3 leków hipotensyjnych różnych klas, w tym moczopędnego [30]. Ciśnienie krwi mierzono za pomocą 24-godzinnego ambulatoryjnego aparatu monitorującego (ang. *24-hours ambulatory blood pressure monitoring*, ABPM). Dodatkowo, aby potwierdzić przestrzeganie przez pacjentów zaleceń dotyczących przyjmowania leków hipotensyjnych, poziomy wybranych leków i ich metabolitów oceniono w próbkach osocza za pomocą techniki HPLC-TOF/MS. Uzyskane wyniki nie wykazały statystycznie istotnych różnic w stosowaniu leków hipotensyjnych w porównywanych grupach (**Tabela 3 Publikacja H4**). Oznacza to, że w obu porównywanych grupach pacjenci w podobny sposób przestrzegali zaleceń terapeutycznych, co wyklucza fakt, że występujące zmiany metaboliczne są związane z brakiem przyjmowania leków przez pacjentów z ONT. Zaobserwowane różnice w profilach metabolomicznych osocza pacjentów z ONT w porównaniu do pacjentów z kontrolowanym NT dotyczą głównie metabolizmu lipidów, aminokwasów oraz puryn. Interpretacja biochemiczna zmienionych szlaków metabolicznych została przedstawiona na Rycinie 4. Zaobserwowane zmiany metaboliczne związane są z procesami takimi jak: dysfunkcja śródbłonna, zwężenie naczyń, proliferacja komórek, stres oksydacyjny oraz stany zapalne. Przeprowadzone badanie jest jednym z pierwszych w zakresie zastosowania niecelowanych analiz metabolomicznych, a uzyskane wyniki pozwoliły na poszerzenie wiedzy na temat patogenezы, wcześniejszego rozpoznania oraz leczenia ONT.



Rycina 4. Interpretacja szlaków biochemicznych i zmian metabolicznych zaobserwowanych u pacjentów z ONT.

Kolejne, przeprowadzone w ramach osiągnięcia habilitacyjnego, badania również dotyczyły rzadkiego schorzenia kardiologicznego, jakim jest wczesne starzenie naczyń (*ang. early vascular aging, EVA*). EVA definiuje się jako stan przyspieszonego starzenia się naczyń, którego nie można wyjaśnić wyłącznie według wieku metrykalnego [32]. Szybkość fali tętna tętnicy szyjnej i udowej (*ang. carotid-femoral pulse wave velocity, cfPWV*) jest powszechnie akceptowanym złotym standardem do oceny sztywności tętnic w praktyce klinicznej [33]. Zwiększona szybkość fali tętna (PWV) jest niezależnym i silnym predyktorem chorób sercowo-naczyniowych, zarówno w populacji ogólnej, jak i u osób z nadciśnieniem tętniczym [34,35]. Według Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (*ang. European Society of Hypertension, ESH*) wartości cfPWV >10 m/s wskazują na subkliniczne uszkodzenia narządowe [36]. Jednak w praktyce klinicznej, EVA jest często diagnozowane u osób młodszych, u których wartości cfPWV są niższe niż 10 m/s. Koncepcja EVA zyskuje ostatnio coraz większe uznanie kliniczne, jako narzędzie do skutecznej identyfikacji osób z nadciśnieniem tętniczym, u których występuje zwiększone ryzyko wystąpienia niepożądanych powikłań sercowo-naczyniowych [37-39].

Niewykluczone, że wykrycie wskaźników diagnostycznych EVA, jeszcze przed wystąpieniem pełnej manifestacji klinicznej, może potencjalnie pozwolić na identyfikację pacjentów zagrożonych uszkodzeniem tętnic i na natychmiastowe podjęcie interwencji klinicznej w celu ograniczenia ryzyka sercowo-naczyniowego. Procesy patofizjologiczne leżące u podstaw rozwoju EVA u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, nadal jednak pozostają niewyjaśnione i mogą obejmować złożone interakcje pomiędzy ciśnieniem krwi a innymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego. Dlatego też, celem przeprowadzonych badań (**publikacja H5**) była ocena profili metabolomicznych osocza. Została ona przeprowadzona w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz z EVA (n=79) lub bez EVA (n=73). Do oznaczeń analitycznych wykorzystano technikę HPLC-TOF/MS w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Grupy badane zostały dobrane pod względem wieku ( $44,0 \pm 14,8$  vs  $43,0 \pm 13,5$ ,  $p = 0,652$ ), wskaźnika masy ciała ( $28,9 \pm 4,0$  vs  $28,6 \pm 4,7$ ,  $p = 0,662$ ) oraz płci (73 vs 76% mężczyzn,  $p = 0,637$ ). W porównywanych grupach nie zaobserwowano również znaczącej różnicy w częstotliwości aktywnego palenia tytoniu, cukrzycy typu 2, chorób układu krążenia (ang. *cardiovascular disease*, CVD), czy zastosowanej farmakoterapii (antagoniści kanałów wapniowych, leki beta-adrenolityczne, diuretyki). Zaawansowana metoda statystyczna, oparta na założeniu regularyzacji: regresja LASSO (ang. *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) została zastosowana do selekcji metabolitów o największym potencjale klasyfikacyjnym pacjentów z EVA i bez EVA. Powtarzalność wyników oceniono za pomocą procedury *bootstrap* polegającej na ponownym próbkowaniu [40]. Na tej podstawie wyselekcjonowano 4 lizofosfatydylocholiny: LPC (16:0), LPC (18:0), LPC (18:1) oraz LPC (18:2), których poziomy były istotnie obniżone u pacjentów z EVA. Dla wybranych metabolitów przeprowadzono również analizę korelacji z parametrami klinicznymi oraz nienadzorowaną hierarchiczną analizę klasterową (Rycina 5). Chociaż wcześniej wykazano, że lizofosfatydylocholiny są dodatnio skorelowane ze stanem zapalnym i miażdżycą, w przeprowadzonym badaniu (**publikacja H5**) pacjenci z nadciśnieniem tętniczym, u których zaobserwowano obniżone poziomy czterech ww. lizofosfatydylocholin, mieli 3,8 razy większe ryzyko rozwoju EVA (OR = 3,8, 95% CI 1,7–8,5,  $p < 0,001$ ). Uzyskane wyniki sugerują, że lizofosfatydylocholiny są potencjalnymi kandydatami do dalszej oceny oraz walidacji jako predyktory EVA u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Ponadto, podejście metabolomiczne może przyczynić się do identyfikacji nowych celów terapeutycznych prowadzących do spowolnienia procesu EVA oraz personalizacji leczenia.

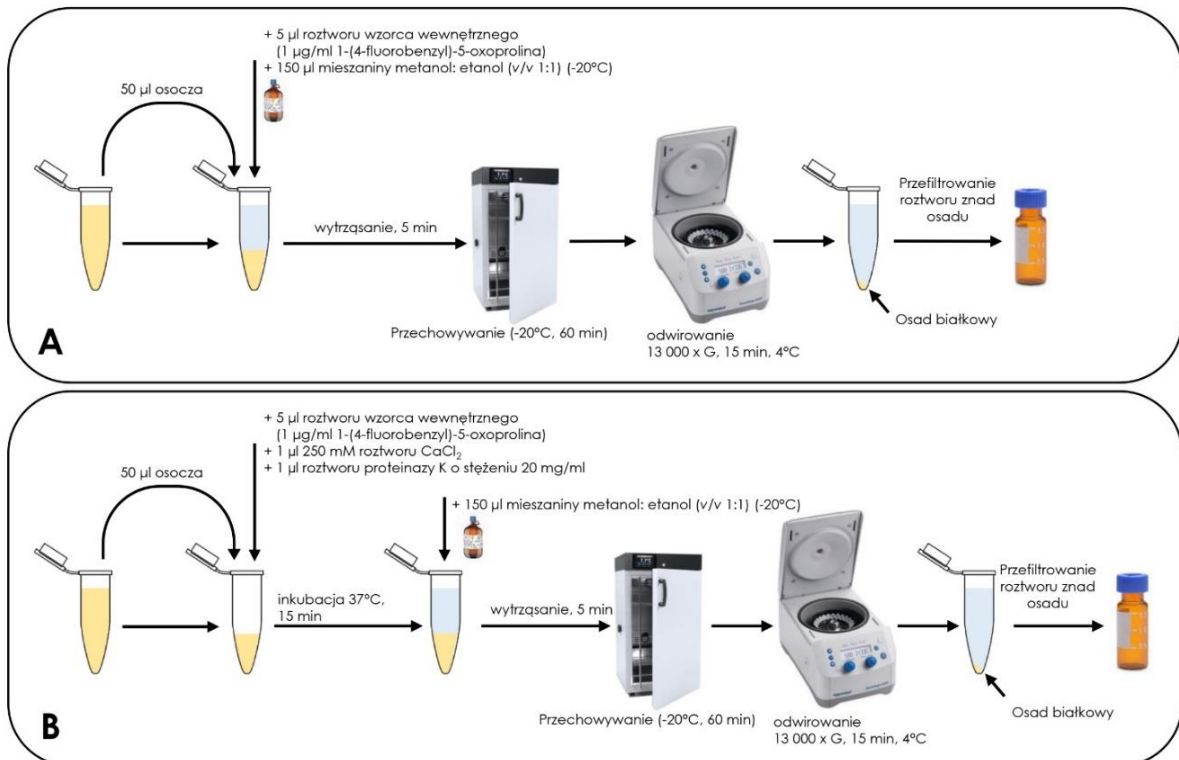


Rycina 5. Wyniki analizy korelacji oraz klastrowej analizy hierarchicznej u pacjentów z EVA.

W oparciu o wyniki badań opisanych w **publikacjach H4 i H5**, które dotyczyły niecelowanych analiz metabolomicznych próbek osocza, opracowano nową procedurę ich przygotowania. Białka osocza krwi zapewniają środowisko do transportu głównie metabolitów hydrofobowych. Sprawny transport i dystrybucję związków hydrofobowych w osoczu *in vivo* uzyskuje się poprzez ich interakcję z białkami, które wiążą je jako substraty, produkty, kofaktory i ligandy dzięki stosunkowo silnym oddziaływaniom białkowo-hydrofobowym [41]. Albumina, główne białko osocza, oprócz utrzymywania ciśnienia osmotycznego, pełni również rolę nośnika hormonów hydrofobowych, kwasów

tłuszczowych i lipidów oraz wiąże substancje toksyczne i leki [42]. Ponadto, lipoproteiny regulują specyficzny transport cholesterolu i fosfolipidów. Obecnie najczęściej stosowana procedura przygotowania próbek osocza w niecelowanych analizach metabolomicznych polega na natychmiastowym wytrącaniu białek za pomocą jednego lub mieszaniny kilku rozpuszczalników organicznych, a tym samym prowadzi do współstrącania metabolitów endogennych oraz egzogennych związanych z białkami osocza. W badaniach przeprowadzonych w ramach osiągnięcia habilitacyjnego (**publikacja H3**) opracowano i zaproponowano nową, nieskomplikowaną procedurę przygotowania próbek osocza, która minimalizuje ryzyko współstrącania oraz poprawia zakres oznaczanych metabolitów (większe procentowe pokrycie metabolomu). Wprowadzenie dodatkowego, krótkiego, etapu poprzedzającego strącanie białek osocza, czyli ograniczonego trawienia proteinazą K (ang. *proteinase K*, PK), umożliwi uwolnienie związanych z natywnymi białkami metabolitów, poprzez relaksację ich trzeciorzędowej struktury. PK jest dobrze znanym enzymem proteolitycznym, należącym do klasy proteaz serynowych wytwarzanym przez *Tritirachium album* [43]. Enzym ten posiada szeroką specyficzność przerywania wiązania peptydowego przy grupie karboksylowej, alifatycznej i aromatycznej aminokwasów, co stanowi użyteczną cechę do trawienia białek w próbkach biologicznych [44]. PK jest aktywna w szerokim zakresie pH (4,3–12,0), a jej kofaktorem są jony wapnia [44]. Maksymalną aktywność enzymu obserwuje się w temperaturze 37°C. Szczegółowa procedura przygotowania próbek osocza z użyciem PK oraz jej porównanie z klasyczną metodą odbiałczania zostały przedstawione na Rycinie 6. Opisano także charakterystykę chemiczną metabolitów, których zmierzone poziomy w próbkach osocza były znacząco wyższe po zastosowaniu PK lub były oznaczane tylko w przypadku zastosowania nowo zaproponowanej procedury (**Rycina 6, Publikacja H3**). Jak wykazano w niniejszej pracy, prosta modyfikacja klasycznej procedury przygotowania próbek pozwala na uwalnianie metabolitów związanych z białkami osocza, co skutkuje znacznym zwiększeniem liczby oznaczanych metabolitów (głównie lipidów, hormonów, kwasów tłuszczowych i żółciowych czy aminokwasów aromatycznych) oraz granicy ich wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD). Wymienione metabolity biorą udział głównie w anabolicznych i katabolicznych procesach komórkowych, co może pozwolić na poszerzenie wiedzy o patogenezie wielu stanów patofizjologicznych, takich jak choroby nowotworowe czy sercowo-naczyniowe. Zaproponowana koncepcja przygotowania próbek osocza oraz jej pionierskie zastosowanie w niecelowanych analizach metabolomicznych, cieszy się dużym

zainteresowaniem w środowisku naukowym na całym świecie, o czym świadczy wysoka liczba cytowań monografii.



Rycina 6. Porównywane procedury przygotowania próbek osocza do niecelowanych analiz metabolomicznych. A- klasyczna, B- z proteinazą K.

W ramach osiągnięcia habilitacyjnego przeprowadzono również niecelowane analizy metaboliczne próbek moczu w populacji pediatrycznej z wrodzoną dysplazją nerek (**Publikacja H6**). Dysplazja nerek jest ciężką wrodzoną wadą mięszu nerki, która często prowadzi do schyłkowej niewydolności nerek nie tylko w wieku dziecięcym, ale często też we wczesnym życiu dorosłym [45]. Rozpoznanie dysplazji nerek opiera się na prenatalnych lub postnatalnych badaniach ultrasonograficznych u dzieci. Schorzenie to nie wykazuje żadnych specyficznych objawów klinicznych przed rozwinięciem się przewlekłej choroby nerek. Wczesna diagnoza jest bardzo istotna z punktu widzenia jak najszybszego wdrożenia terapii nefroprotekcijnej oraz może zapewnić lepsze długoterminowe rokowanie dla pacjentów. Dlatego też, w przeprowadzonych badaniach zastosowano niecelowane



podejście metabolomiczne, aby kompleksowo ocenić zmiany w szlakach biochemicznych oraz zaproponować wczesne wskaźniki ułatwiające diagnozę dysplazji nerek. Do badania włączono 72 dzieci, w tym 39 z nerkami dysplastycznymi i 33 dzieci zdrowych. Profile metabolomiczne moczu zostały oznaczone za pomocą komplementarnych technik analitycznych tj.: GC-MS oraz HPLC-TOF/MS w trybie jonów dodatnich i ujemnych. W przypadku techniki HPLC-TOF/MS oznaczenia analityczne zostały dodatkowo przeprowadzone z zastosowaniem dwóch kolumn chromatograficznych: RP oraz HILIC. Zastosowane jedno- oraz wielowymiarowe testy statystyczne pozwoliły wyselekcjonować 19 metabolitów, które różnicowały porównywane grupy niezależnie od wartości współczynnika przesączania kłębuszkowego. Zaobserwowano obniżone poziomy siedmiu acylokarnityn, ksantyny oraz glutaminy w moczu pacjentów z dysplazją nerek w porównaniu z grupą kontrolną. Z kolei poziomy dimetyloguanozyny, kwasu treonowego oraz kwasu glicerynowego były podwyższone w przypadku dzieci z dysplazją nerek. Wymienione wyżej metabolity pochodzą ze szlaków biochemicznych związanych z utlenianiem kwasów tłuszczowych, metabolizmem aminokwasów oraz puryn (**Ryciny 4 i 5, Publikacja H6**). Według dostępnej literatury naukowej, jest to pierwsze badanie wykorzystujące niecelowane podejście metabolomiczne, które pozwoliło na kompleksową charakterystykę metaboliczną moczu w populacji pediatrycznej z wrodzoną dysplazją nerek, niezależnie od funkcji czynnościowej nerek.

## WNIOSKI KOŃCOWE I POTENCJALNE WYKORZYSTANIE WYNIKÓW

Najważniejsze wyniki i wnioski wynikające z badań przeprowadzonych w ramach osiągnięcia habilitacyjnego to:

1. Niecelowane analizy metabolomiczne próbek biologicznych stanowią użyteczne narzędzie badawcze do oceny rzadkich stanów patofizjologicznych pod kątem nowych wskaźników diagnostycznych oraz celów terapeutycznych.
2. Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego wywołane różnymi mutacjami genu KIT charakteryzują się odmiennymi profilami metabolomicznymi tkanki guza. W badanych ksenografach modeli mysich zaobserwowano zwiększoną aktywność w obrębie procesu glikolizy, glutaminolizy oraz zmieniony metabolizm lipidów, które potencjalnie są zaangażowane w przeżycie komórek nowotworowych, ich wzrost oraz proliferację.
3. Profile metabolomiczne próbek osocza pacjentów z opornym na farmakoterapię nadciśnieniem tętniczym charakteryzują się zmienionym metabolizmem lipidów, aminokwasów oraz puryn, które związane są z procesami takimi jak: dysfunkcja śródbłonna, zwężenie naczyń, proliferacja komórek, stres oksydacyjny oraz stan zapalny.
4. U pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, u których zaobserwowano obniżone poziomy czterech lizofosfatydylocholin [(LPC (16:0), LPC (18:0), LPC (18:1), LPC (18:2))] stwierdzono 3,8 razy większe ryzyko rozwoju wczesnego starzenia naczyń.
5. Nowa procedura przygotowania próbek osocza do niecelowanych analiz metabolomicznych, z wykorzystaniem proteiny K, pozwala na uwalnianie metabolitów związanych z białkami osocza, co skutkuje znacznym zwiększeniem liczby oznaczanych analitów, głównie lipidów, hormonów, kwasów tłuszczowych i żółciowych oraz aminokwasów aromatycznych, a także granicy wykrywalności.

6. W profilach metabolomicznych próbek moczu pochodzących od dzieci z wrodzoną dysplazją nerek zaobserwowano zmieniony poziom 19 metabolitów w porównaniu z grupą kontrolną. Metabolity te pochodzą ze szlaków biochemicznych związanych z utlenianiem kwasów tłuszczowych, metabolizmem aminokwasów oraz związków purynowych.

Wyniki uzyskane w przeprowadzonych w ramach osiągnięcia habilitacyjnego badaniach naukowych mogą być wykorzystane i wpisują się w następujące kierunki badawcze:

- a) Ocena wczesnych, specyficznych i czułych wskaźników diagnostycznych rzadkich schorzeń patofizjologicznych o niewyjaśnionym patomechanizmie, a często rozwijających się bezobjawowo;
- b) Badanie odpowiedzi metabolicznej na zastosowaną farmakoterapię;
- c) Ocena metabolomiczna przyczyn oporności na leczenie i zaproponowanie nowych strategii terapeutycznych;
- d) Oznaczenia analityczne aktywnej farmakologicznie frakcji wolnej substancji czynnych.

## LITERATURA

- [1] Goh K.I., Cusick M.E., Valle D., Childs B., Vidal M., Barabási A-L. The human disease network, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, 104: 8685–8690.
- [2] Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science.* 2002, 295: 1662–4.
- [3] Nicholson, J., Lindon, J. Metabonomics. *Nature.* 2008, 455: 1054–1056.
- [4] Horning E.C., Horning M.G.: Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem.* 1971, 17: 802-809. [5] Horning E.C., Horning M.G.: Human metabolic profiles obtained by GC and GC/MS, *JChromatogr Sci.* 1971, 9: 129–140.
- [6] Pauling L., Robinson A.B., Teranishi R., Cary P.: Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatograph. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971, 68: 2374–2376.
- [7] 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.
- [8] Fiehn O.: Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modeling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genom.* 2001, 2: 155–168.
- [9] Kaddurah-Daouk R, Weinshilboum RM. Pharmacometabolomics: Implications for Clinical Pharmacology and Systems Pharmacology. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 2014, 95: 154–167.
- [10] Kaddurah-Daouk R., Yuan P., Boyle SH., Matson W., Wan, Z., Zeng Z., Zhu H., Dougherty GG., Yao JK. Chen G., Guitart X., Carlson PJ., Neumeister A., Zarate C., Krishna RR., Manji HK., Drevets W. Cerebrospinal Fluid Metabolome in Mood Disorders. *Scientific Reports.* 2012, 2: 667.
- [11] Kaddurah-Daouk R., Baillie RA., Zhu H., Zeng ZB., Wiest MM., Nguyen UT., Watkins SM., Krauss RM. Lipidomics analysis of variation in response to simvastatin in the cholesterol and pharmacogenetics study. *Metabolomics.* 2010, 6: 191–201.
- [12] Beger RD., Schmidt MA., Kaddurah-Daouk R. Current Concepts in Pharmacometabolomics, Biomarker Discovery, and Precision Medicine. *Metabolites.* 2020, 10: 129.
- [13] Kaddurah-Daouk R., Boyle SH., Matson W., Sharma S., Matson S., Zhu H., Bogdanov MB., Churchill E., Krishnan RR., Rush AJ., Pickering E., Delnomdedieu M. Pretreatment Metabotype as a Predictor of Response to Sertraline or Placebo in Depressed Outpatients: A Proof of Concept. *Translational Psychiatry.* 2011, 1: e26.
- [14] Le Gouellec A., Plazy C., Toussaint B. What clinical metabolomics will bring to the medicine of tomorrow. *Front. Anal. Sci.* 2023, 3:1142606.
- [15] Nalbantoglu S. Metabolomics: Basic Principles and Strategies. *Molecular Medicine.* IntechOpen. 2019. DOI: 10.5772/intechopen.88563.
- [16] Gonzalez-Dominguez A., Duran-Guerrero E., Fernandez-Recamales A., Lechuga-Sancho A.M., Sayago A., Schwarz M., Segundo C., Gonzalez-Dominguez R. An overview on the importance of combining complementary analytical platforms in metabolomic research. *Curr. Top. Med. Chem.* 2017, 17: 3289–3295.
- [17] A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han, X. Wang, Modern analytical techniques in metabolomics analysis, *Analyst.* 2012, 137: 293–300.
- [18] Lei Z., Huhman D. V., Sumner, L. W. Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *Journal of Biological Chemistry.* 2010, 286: 25435–25442.

- [19] Hirayama A., Abe H., Yamaguchi N., Tabata S., Tomita M., Soga T. Development of a sheathless CE-ESI-MS interface. *Electrophoresis*. 2018, 11 :1382–1389.
- [20] Gstöttner C., Vergoossen D.L.E., Wuhler M., Huijbers M.G.M., Domínguez-Vega, E. Sheathless CE-MS as a tool for monitoring exchange efficiency and stability of bispecific antibodies. *Electrophoresis*. 2021, 42: 171–176.
- [21] Van den Berg R.A., Hoefsloot H.C.J., Westerhuis J.A., Smilde A.K., van der Werf M.J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*. 2006, 7: doi: 10.1186/1471-2164-7-142.
- [22] Broadhurst D.I., Kell D.B. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics*. 2006, 2: 171-196.
- [23] Jacyna J., Kordalewska M., Wiczling P., Markuszewski M.J. Evaluation of robustness in untargeted metabolomics: Application of multivariate analysis, linear regression and hierarchical modeling. *Journal of Chromatography Open*. 2022, 2: 100035.
- [24] Ulmer C.Z., Maus A., Hines J., Singh R. Challenges in Translating Clinical Metabolomics Data Sets from the Bench to the Bedside. *Clin Chem*. 2021, 67: 1581–1583.
- [25] Di Minno A., Gelzo M., Caterino M., Costanzo M., Ruoppolo M., Castaldo G. Challenges in Metabolomics-Based Tests, Biomarkers Revealed by Metabolomic Analysis, and the Promise of the Application of Metabolomics in Precision Medicine. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23: 5213.
- [26] Rutkowski et al. Zasady postępowania diagnostyczno-terapeutycznego u chorych na nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (GIST). *Nowotwory Journal of Oncology*. 2011, 60: 70–80.
- [27] Kearney P.M., Whelton M., Reynolds K., Muntner P., Whelton P.K., He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005, 365: 217–223.
- [28] Achelrod D., Wenzel U., Frey S. Systematic review and meta-analysis of the prevalence of resistant hypertension in treated hypertensive populations. *Am J Hypertens*. 2015, 28: 355–61.
- [29] Calhoun D.A., Jones D., Textor S., Goff D.C., Murphy T.P., Toto R.D., White A., Cushman W.C., White W., Sica D., Ferdinand K., Giles T.D., Falkner B., Carey R.M. American Heart Association Professional Education Committee. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*. 2008, 117: 510–526.
- [30] Sarafidis P.A., Georgianos P., Bakris G.L. Resistant hypertension its identification and epidemiology. *Nat Rev Nephrol*. 2013, 9: 51-58.
- [31] Daugherty S.L., Powers J.D., Magid D.J., Tavel H.M., Masoudi F.A., Margolis K.L., O'Connor P.J., Selby J.V., Ho P.M. Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients. *Circulation*. 2012, 125: 1635–1642.
- [32] Nilsson P. M. The early life origins of vascular ageing and cardiovascular risk: the EVA syndrome. *J. Hypertens*. 2008a. 26: 1049–1057.
- [33] Van Bortel L. M., Laurent S., Boutouyrie P., Chowienczyk P., Cruickshank J. K., De Backer T. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J. Hypertens*. 2012, 30: 445–448.
- [34] Willum-Hansen T., Staessen J. A., Torp-Pedersen C., Rasmussen S., Thijs L., Ibsen H. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation*. 2006, 113: 664–670.
- [35] Vlachopoulos C., Aznaouridis K., Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2010, 55: 1318–1327.

- [36] Williams B., Mancia G., Spiering W., Agabiti Rosei E., Azizi M., Burnier, M. 2018 practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology: ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *J. Hypertens.* 2018, 36: 2284–2309.
- [37] Nilsson P. M., Boutouyrie P., Cunha P., Kotsis V., Narkiewicz K., Parati, G. Early vascular ageing in translation: from laboratory investigations to clinical applications in cardiovascular prevention. *J. Hypertens.* 2013, 31: 1517–1526.
- [38] Antza C., Doundoulakis I., Akrivos E., Stabouli S., Trakatelli C., Doumas M. Early vascular aging risk assessment from ambulatory blood pressure monitoring: the early vascular aging ambulatory score. *Am. J. Hypertens.* 2018, 31: 1197–1204.
- [39] Laurent S., Boutouyrie P., Cunha P. G., Lacolley P., Nilsson P. M. Concept of extremes in vascular aging. *Hypertension.* 2019, 74: 218–228.
- [40] Pineda S., Milne R. L., Calle M. L., Rothman N., López de Maturana E., Herranz, J. Genetic variation in the TP53 pathway and bladder cancer risk. A comprehensive analysis. *PLoS ONE* 2014, 9:e89952.
- [41] Li X., Gianoulis T. A., Yip K. Y., Gerstein M. & Snyder, M. Extensive In vivo Metabolite-Protein Interactions Revealed by Large- Scale Systematic Analyses. *Cell.* 2010, 143: 639–650.
- [42] Schaller J., Gerber S., Kämpfer U., Lejon S., Trachsel, C. *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function.* (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
- [43] Ebeling W. et al. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur J Biochem.* 1974, 47: 91–97.
- [44] Burrell, M. M. *Enzymes of Molecular Biology.* 307 (Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993).
- [45] Phua Y.L., Jacqueline H. Renal dysplasia in the neonate. *Current Opinion in Pediatrics.* 2016, 28: 209–215.

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

**a) Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

Pracę naukową rozpoczęłam podczas dziennych studiów doktoranckich na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Podczas studiów doktoranckich zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Toksykologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Byłam również wykonawcą w projekcie naukowym finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (2013-2016) pt.: „Profile metaboliczne środków uzależniających w wodach ściekowych na przykładzie kokainy, jako metoda szacowania spożycia narkotyków w Polsce” (NN 405622 638). Efektami realizacji projektu naukowego są 2 publikacje naukowe:

1) **Bujak R.**, Gadzała-Kopciuch R., Nowaczyk A., Raczak-Gutknecht J., Kordalewska M., Struck-Lewicka W., Markuszewski M.J., Buszewski B. Selective determination of cocaine and its metabolite benzoylecgonine in environmental samples by newly developed sorbent materials. *Talanta*, 2016, 146:401.

2) **Bujak R.**, Gadzała-Kopciuch R., Nowaczyk A., Raczak-Gutknecht J., Kordalewska M., Struck-Lewicka W., Waszczuk-Jankowska M., Tomczak E., Kaliszan M., Buszewski B., Markuszewski M.J. New sorbent materials for selective extraction of cocaine and benzoylecgonine from human urine samples. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 120:397.

Podczas studiów doktoranckich odbyłam 2 staże naukowe: dwumiesięczny w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Inżynierskiej oraz Technologii na Uniwersytecie w Zagrzebiu, pod kierunkiem prof. Alki Horvat oraz roczny w Centre of Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO) Uniwersytetu San Pablo CEU w Madrycie, pod kierunkiem prof. Coral Barbas. Odbyte staże pozwoliły na zdobycie wiedzy oraz umiejętności praktycznych z zakresu technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas (LC-MS oraz GC-MS) ze szczególnym uwzględnieniem ich zastosowań w niecelowanych analizach metabolomicznych próbek biologicznych. Efektami współpracy w ramach odbytych staży naukowych są 2 publikacje naukowe:

1) **Bujak R.**, Garcia-Alvarez A., Ruperez F.J., Nuno-Ayala M., Garcia A., Ruiz-Cabello J., Fuster V., Ibanez B., Barbas C. Metabolomics reveals metabolite changes in acute pulmonary embolism. *J of Proteome Res.*, 2014, 13 (2): 805-816.

- 2) Navarrete A., Armitage E.G., Musteanu M., Gracia A., Mastrangelo A., **Bujak R.**, López-Casas P.P., Hidalgo M., Barbas C. Metabolomic evaluation of Mitomycin C and rapamycin in a personalized treatment of pancreatic cancer. *Pharmacol. Res. Perspect.*, 2014, 2 (6), art. e00067:1-12.

Po rocznym stażu naukowym w Centre of Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO) Uniwersytetu San Pablo CEU w Madrycie zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta naukowego w Zakładzie Biofarmacji i Farmakokinetyki Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach realizacji projektu naukowego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki

w ramach konkursu SONATA BIS pt.: „Identyfikacja nowych biomarkerów stanów patofizjologicznych na podstawie oznaczanych profili metabolomicznych i bioinformatycznie zintegrowanego podejścia systemowego” (2012/07/E/NZ7/ 04411). W ramach kontynuacji współpracy z Centre of Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO) Uniwersytetu San Pablo CEU w Madrycie, ponownie odbyłam 6-tygodniowy staż naukowy, sfinansowany ze środków KNOW Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (09.11.2013-19.12.2013). W latach 2014-2015 kierowałam projektem naukowym finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 7 pt.: „Niecelowana analiza metabolicznych „odcisków palca” w próbkach osocza u osób z nadciśnieniem płucnym z wykorzystaniem chromatografii gazowej i cieczowej sprzężonych ze spektrometrią mas” (2014/13/N/NZ7/ 04231). 17 kwietnia 2015r. uzyskałam z wyróżnieniem tytuł doktora nauk farmaceutycznych nadany przez Wydział Farmaceutyczny z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy doktorskiej był prof. dr hab. n. farm. Michał Jan Markuszewski, a funkcję kopromotora pełniła prof. Coral Barbas z Centre of Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO) Uniwersytetu San Pablo CEU w Madrycie.

***b) Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych***

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych kontynuowałam realizację projektu naukowego PRELUDIUM jako kierownik oraz projektu SONATA BIS jako wykonawca. Zadania badawcze powyższych projektów naukowych były realizowane we współpracy zarówno z ośrodkami zagranicznymi:

- a) Centre of Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO) Uniwersytetu San Pablo CEU w Madrycie,
- b) Spanish National Center for Cardiovascular Research w Madrycie,
- c) Laboratory of Experimental Oncology Uniwersytetu Katolickiego w Lowanium,
- d) Groupe de RMN Biomédicale, Uniwersytetu Paul Sabatier w Tuluzie.



oraz ośrodkami krajowymi:

- a) Katedrą i Kliniką Urologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- b) Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,
- c) Centrum Medycyny Rodzinnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- d) Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- e) Katedrą Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
- f) Zakładem Biomateriałów i Fizyki Medycznej, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Uniwersytet Gdański.

Efektami realizacji powyższych projektów naukowych jest 10 publikacji naukowych:

- 1) **Bujak R.**, Mateo J., Blanco I., Izquierdo-García J.L., Dudzik D., Markuszewski M.J., Peinado V.I., Laclaustra M., Barberá J.A., Barbas C., Ruiz Cabello J. New Biochemical Insights into the Mechanisms of Pulmonary Arterial Hypertension in Humans. *PLoS ONE*, 2016, 11(8): e0160505. doi:10.1371/journal.pone.0160505b)
- 2) **Bujak R.**, Dagher-Wojtkowiak E., Kaliszan R., Markuszewski M.J. PLS-Based and Regularization-Based Methods for the Selection of Relevant Variables in Non-targeted Metabolomics Data. *Front. Mol. Biosci.* 2016, 3:35. doi: 10.3389/fmolb.2016.00035
- 3) **Wawrzyniak R.**, Woźniak A., Gebreyohannes Y.K., Dykcik B., Schöffski P., Markuszewski M.J. Volatile organic compounds in gastrointestinal stromal tumour tissue originating from patient-derived xenografts. *J Breath Res.* 2017, 11. DOI: 10.1088/1752-7163/aa6d87
- 4) Yumba Mpanga A., Siluk D., Jacyna J., Szerkus O., **Wawrzyniak R.**, Markuszewski M., Matuszewski M., Kaliszan R., Markuszewski M.J. Targeted metabolomics in bladder cancer: From analytical methods development and validation towards application to clinical samples. *Anal Chim Acta.* 2018, 1037:188. DOI: 10.1016/j.aca.2018.01.055
- 5) Jacyna J., **Wawrzyniak R.**, Balayssac S., Gilard V., Malet-Martino M., Sawicka A., Kordalewska M., Nowicki Ł., Kurek E., Bulska E., Patejko M., Markuszewski M., Gutknecht P., Matuszewski M., Siebert J., et al.: Urinary metabolomic signature of muscle-invasive bladder cancer: A multiplatform approach. *Talanta.* 2019, 202:572. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.05.039
- 6) Kordalewska M., Macioszek S., **Wawrzyniak R.**, Sikorska-Wiśniewska M., Śledziński T., Chmielewski M., Mika A., Markuszewski M.J. Multiplatform

metabolomics provides insight into the molecular basis of chronic kidney disease. *J Chromatogr B*. 2019, 1117:49. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.04.003

- 7) Yumba-Mpanga A., Struck-Lewicka W., **Wawrzyniak R.**, Markuszewski M., Roslan M., Kaliszan R., Markuszewski M.J. Metabolomic Heterogeneity of Urogenital Tract Cancers Analyzed by Complementary Chromatographic Techniques Coupled with Mass Spectrometry. *Curr Med Chem*. 2017, 26:216. DOI: 10.2174/0929867324666171006150326
- 8) Struck-Lewicka W., **Wawrzyniak R.**, Artymowicz M., Kordalewska M., Markuszewski M., Matuszewski M., Gutknecht P., Siebert J., Markuszewski M.J. GC-MS-based untargeted metabolomics of plasma and urine to evaluate metabolic changes in prostate cancer. *J Breath Res*. 2020, 14:047103. DOI: 10.1088/1752-7163/abaeca
- 9) Lewkowicz A., Bogdanowicz R., Bojarski P., Pierpaoli M., Gryczyński I., Synak A., Mońka M., Karczewski J., Struck-Lewicka W., **Wawrzyniak R.**, Markuszewski M.J. The Luminescence of 1,8-Diazafluoren-9-One/Titanium Dioxide Composite Thin Films for Optical Application. *Materials*. 2020, 13:3014. DOI: 10.3390/ma13133014
- 10) Łuczykowski K., Warmuzińska N., Operacz S., Stryjak I., Bogusiewicz J., Jacyna J., **Wawrzyniak R.**, Struck-Lewicka W., Markuszewski M.J., Bojko B. Metabolic Evaluation of Urine from Patients Diagnosed with High Grade (HG) Bladder Cancer by SPME-LC-MS Method. *Molecules*. 2021, 26: 2194. DOI: 10.3390/molecules26082194

Ponadto po uzyskaniu stopnia doktora byłam kierownikiem projektu naukowego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Edukacji w ramach konkursu Iventus Plus 5 pt.: „Badanie mechanizmów oporności na terapię hipotensyjną z wykorzystaniem niecelowanej i celowanej analizy metabolomicznej” (nr 0042/IP1/2016/74). Projekt realizowany był we współpracy z:

- a) Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, MN, United States,
- b) Department of Clinical Sciences, Lund University, Malmö, Sweden,
- c) Katedrą Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- d) Katedrą i Zakładem Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- e) Katedrą i Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach realizacji powyższego projektu naukowego zostały opublikowane w 3 artykułach naukowych:

- 1) **Wawrzyniak R.**, Mpanga A.Y., Struck-Lewicka W., Kordalewska M., Polonis K., Patejko M., Mironiuk M., Szyndler A., Chrostowska M., Hoffmann M., Smoleński R.T., Kaliszan R., Narkiewicz K., Markuszewski M.J. Untargeted Metabolomics Provides Insight into the Mechanisms Underlying Resistant Hypertension. *Curr Med Chem*. 2017, 26:232. DOI: 10.2174/0929867324666171006122656
- 2) **Wawrzyniak R.**, Kosnowska A., Macioszek S., Bartoszewski R., Markuszewski M.J. New plasma preparation approach to enrich metabolome coverage in untargeted metabolomics: plasma protein bound hydrophobic metabolite release with proteinase K. *Sci Reports*. 2018, 8:1. DOI: 10.1038/s41598-018-27983-0
- 3) Polonis K., **Wawrzyniak R.**, Dagher-Wojtkowiak E., Szyndler A., Chrostowska M., Melander O., Hoffmann M., Kordalewska M., Raczak-Gutknecht J., Bartosińska E., Kaliszan R., Narkiewicz K., Markuszewski M.J. Metabolomic signature of early vascular aging (EVA) in hypertension. *Front Mol Biosci*. 2020, 7:12. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00012/bibtex

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych kierowałam również projektem naukowym finansowanym w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Młody Twórca Nauki, 664/529/61/71-1402) pt.: „Ocena korelacji parametrów klinicznych i zmian metabolicznych w tętnicznym nadciśnieniu płucnym”. Projekt realizowany był we współpracy z:

- a) Kliniką Kardiologii i Elektroterapii Serca Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- b) Centrum Analiz Biostatystycznych i Bioinformatycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały opisane w 2 manuskryptach, zgłoszonych do recenzji:

- 1) Wawrzyniak R., Biesemans M., Kugacka-Dąbrowska A., Lewicka E., Bartoszewski R., Markuszewski M.J. Plasma untargeted metabolomics with proteinase K discloses phospholipid signature associated with pulmonary arterial hypertension. *Scientific Reports* (w recenzji: Submission ID 6fbd5a8b-7a14-4ca1-afff-4f3c8b03126e).
- 2) Wawrzyniak R., Grešner P., Lewicka E., Macioszek S., Furga A., Zięba B., Markuszewski M.J., Dąbrowska-Kugacka A. Metabolomics meets clinics: A multivariate analysis of plasma and urine metabolic signatures in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Proteome Research* (w recenzji: Manuscript ID: pr-2023-00255p).

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

**A. Prowadzona działalność dydaktyczna obejmuje:**

1. Prowadzenie zajęć laboratoryjnych z przedmiotu Toksykologia dla studentów 4 roku kierunku Farmacja, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (od 2010-2012)
2. Prowadzenie ćwiczeń oraz seminariów z przedmiotu Farmakokinetyka dla studentów 4 roku kierunku Farmacja, Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2018)
3. Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu Biofarmacja dla studentów 5 roku kierunku Farmacja, Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2018)
4. Prowadzenie seminariów z przedmiotu Farmakologia dla studentów 4 roku kierunku Analityka Medyczna, Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2019)
5. Prowadzenie ćwiczeń oraz seminariów z przedmiotu Farmakokinetyka i Biofarmacja dla studentów 2 roku kierunku Przemysł Farmaceutyczny i Kosmetyczny, studia II stopnia, Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2019)
6. Prowadzenie zajęć fakultatywnych z przedmiotu Wytwarzanie produktów leczniczych dla studentów 2 roku kierunku Przemysł Farmaceutyczny i Kosmetyczny, studia II stopnia, Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2020)
7. Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu Farmakokinetyka i Biofarmacja dla uczestników studiów podyplomowych kierunku Farmacja Przemysłowa, studia II stopnia, Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2020)
8. Prowadzenie ćwiczeń oraz seminariów z przedmiotu Pharmacokinetics dla studentów 4 roku kierunku Farmacja English Division (ED), Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2021)
9. Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu Biopharmaceutics dla studentów 5 roku kierunku Farmacja English Division (ED), Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2021)
10. Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu Fundamentals of Pharmaceutical Practice II - case studies dla studentów 5 roku kierunku Farmacja English Division (ED), Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2022)

11. Prowadzenie laboratoriów oraz seminariów z przedmiotu Omics in Drug Discovery dla studentów programu International Master in Sustainable Drugs Discovery, Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2023)
12. Pełnienie funkcji opiekuna pracy magisterskiej, Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (9 prac magisterskich; od 2015)
13. Pełnienie funkcji promotora pomocniczego pracy doktorskiej:
  - „Ocena zmian metabolicznych u chorych z rakiem nerki z wykorzystaniem komplementarnych technik analitycznych i niecelowanej analizy metabolomicznej” realizowanej w Zakładzie Biofarmacji i Farmakokinetiki Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (mgr Marta Kordalewska, obrona pracy doktorskiej: 01.07.2020r.)
  - „Kompleksowa charakterystyka, genomika porównawcza i profilowanie metaboliczne wybranych gatunków z rodzaju Pektobakterium pod kątem potencjalnych zastosowań biomedycznych” realizowanej w Katedrze Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (mgr Magdalena Smoktunowicz, przewidywany termin obrony pracy doktorskiej: listopad 2023r.)
14. Kierownik kierunku International Master in Sustainable Drug Discovery od roku akademickiego 2022/2023

**B. Prowadzona działalność organizacyjna obejmuje:**

1. Członkostwo w Komitecie Organizacyjnym konferencji o zasięgu krajowym: Metabolomic Circle 2015 (27-28.11.2015r., Gdańsk)
2. Prowadzenie sesji tematycznej: Analityka Farmaceutyczna i Kliniczna w ramach IX Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej, (6-10.07.2015, Poznań)
3. Członkostwo w Wydziałowej Komisji Wyborczej Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (2016-2020)
4. Pełnienie funkcji sekretarza Komitetu Organizacyjnego konferencji o zasięgu międzynarodowym: 24th International Symposium of Electro-and Liquid Separation Techniques (ITP2017, Sopot, 10-13.09.2017r.) oraz krajowym: XI Polska Konferencja Chromatograficzna (Sopot, 10-13.09.2017r.)
5. Członkostwo w komisji rekrutacyjnej w konkursie na stypendystę oraz biostatystyka w projekcie naukowym OPUS 20, pt.: „Poznanie nowych mechanizmów i konsekwencji wczesnego starzenia się naczyń: rola najnowszych modyfikowalnych czynników ryzyka kardiometabolicznego.” (2020/39/B/NZ5/03305).

### **C. Prowadzona działalność popularyzująca naukę obejmuje:**

1. Członkostwo w towarzystwach naukowych:
  - Polskie Towarzystwo Spektrometrii Mas (od 2014)
  - Gdański Oddział Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (od 2014)
  - Gdańskie Towarzystwo Naukowe (od 2017)
  - Polskie Towarzystwo Metabolomiczne (od 2017)  
w latach 2017-2021 członek Komisji Rewizyjnej
2. Prowadzenie warsztatów szkoleniowych dotyczących zastosowań metabolomiki w badaniach biomedycznych we współpracy z firmami z obszaru chemii analitycznej:
  - Perlan Technologies (Gdynia, 13.10.2015r., Wrocław, 5.11.2015r.)
  - LECO Polska (Gdańsk, 11.09.2017r.)
3. Prezentowanie wyników prowadzonych badań na konferencjach o zasięgu międzynarodowym oraz krajowym

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

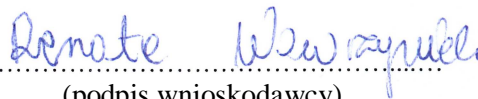
### **Nagrody i wyróżnienia za prowadzoną działalność naukową i dydaktyczną:**

- 1) Stypendium doktorskie dla pracowników Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (2013r.)
- 2) Nagroda Rektora GUMed - Nagroda Dydaktyczna Zespołowa I-go Stopnia - za szczególne zaangażowanie w przygotowanie materiałów dydaktycznych oraz poprawę jakości kształcenia (2014r.)
- 3) 3 nagrody zespołowe za najlepsze prezentacje posterowe podczas konferencji o zasięgu krajowym i międzynarodowym: 8th International Conference on Breath Analysis and Cancer Diagnosis w Toruniu, 26 EuroMeeting DIA we Wiedniu oraz X Konferencja Chromatograficzna w Lublinie (2014r.)
- 4) Nagroda Gdańskiego Towarzystwa Naukowego i Prezydenta Miasta Gdańska dla młodych naukowców, nagroda przyznana w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych za wyróżniającą się rozprawę doktorską (2015r.)
- 5) Travel grant przyznany przez Organizację CASSS w związku z udziałem w 22nd International Symposium on Electro-and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2015), Helsinki, Finlandia (2015r.)
- 6) 3 nagrody Rektora GUMed (2016r.):
  - Nagroda Naukowa Zespołowa I-go Stopnia - za badania służące opracowaniu nowych metod i procedur bioanalitycznych w metabolomice
  - Nagroda Naukowa Indywidualna za Wyróżnioną Rozprawę Doktorską
  - Nagroda Dydaktyczna Zespołowa I-go Stopnia - za opracowanie czterech rozdziałów w książkach uznanych międzynarodowych wydawców naukowych
- 7) 6 nagród Rektora GUMed w latach 2017-2022:
  - Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia - za badania nad modelowaniem farmakokinetyki klinicznej leków w szczególności pediatrycznych

- Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia - za badania farmakologiczne i modelowanie farmakokinetyki związków heterocyklicznych
- Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia - za badania nad wykorzystaniem nowoczesnych analiz metabolomicznych dla celów diagnostyki chorób u pacjentów ambulatoryjnych
- Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia - za opracowanie metod oznaczania związków endogennych w płynach biologicznych do celów badań metabolomicznych
- Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia - za badania nad wykorzystaniem komplementarnych technik analitycznych dla oznaczania profili metabolomicznych w próbkach klinicznych
- Nagroda Naukowa Zespołowa II-go Stopnia - za wykorzystanie zaawansowanych technik obliczeniowych do analizy danych metabolomicznych oraz bioanalitycznych

Prywatnie mam wspaniałego Męża i 5-letnią Córkę, z którymi uwielbiam spędzać czas wolny.

**Nie ubiegałam się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.**

  
.....  
(podpis wnioskodawcy)