

Załącznik 2

Autoreferat przedstawiający opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz pozostałe osiągnięcia i zainteresowania naukowe

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko.

Beata Toczyłowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

1984 – magister inżynier mechanik - Politechnika Warszawska. Wydział Mechaniki Precyzyjnej, Specjalizacja: Inżynieria Biomedyczna. Elektroniczne Urządzenia Medyczne – „Projekt układu do pomiaru czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 w przepływających płynach fizjologicznych”

1994 – doktor nauk technicznych w zakresie inżynierii biomedycznej – Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN - „Wpływ wybranych parametrów fizykochemicznych cieczy na pomiar czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 w przepływających płynach infuzyjnych”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 1985 - nadal Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej Polskiej Akademii Nauk.
Zakład Biopomiarów, Zakład Obrazowania i Pomiarów Biofizycznych, Pracownia Obrazowania Molekularnego.

1985-1999 Centralny Szpital Kliniczny Akademii Medycznej.
Zakład Rentgenodiagnostyki

od 2002- nadal Centralny Szpital Kliniczny Akademii Medycznej
Klinika Kardiologii – Zakład Hemodynamiki

od 1995- nadal Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk.
Środowiskowe Laboratorium NMR.

1996-2001 Fundacja Współpracy Polsko-Niemieckiej

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl publikacji zatytułowany:
„Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach biomedycznych ze szczególnym uwzględnieniem metabolomiki”.

Cykl składa się z 8 prac naukowych wymienionych poniżej.

b) Wykaz publikacji z cyklu

(Współczynniki IF i punkty MNiSW zgodne z rokiem opublikowania)

- B1. **Beata Toczyłowska**, Katarzyna Kierul, (2000), Analysis of 2D proton spectra of cerebrospinal fluid, *Molecular Physics Report*, 29 str.235-238.
- B2. **Beata Toczyłowska**, Igor Zhukov, Grzegorz Dębicki, (1997), High resolution ¹H NMR spectroscopy of human cerebrospinal-fluid: a preliminary study, *Medical Science Monitor*, 3/3, str. 404-409 (IF 5lat – 1,587, MNiSW – 20 pkt).
- B3. Agata Paczkowska, **Beata Toczyłowska**, Paweł Nyckowski, Waldemar Patkowski, Andrzej Kanski, Marek Krawczyk, Urszula Oldakowska-Jedynak, (2003), High-resolution H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis of bile samples obtained from a patient after orthotopic liver transplantation: New perspectives, *Transplantation Proceedings*, 35, str. 2278–2280 (IF – 0,588, MNiSW – 20 pkt).
- B4. **Beata Toczyłowska**, Mariusz Piotrowski, Małgorzata Chalimoniuk, (2011), 31P High Resolution NMR Spectroscopy in Analysis of Phosphate-containing Compounds of Bile, *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 31/1, str. 63-71 (IF – 0,234, MNiSW – 15 pkt).
- B5. Elzbieta Zieminska, **Beata Toczyłowska**, Aleksandra Stafiej, Jerzy W. Lazarewicz, (2010), Low molecular weight thiols reduce thimerosal neurotoxicity in vitro: Modulation by proteins, *Toxicology*, 276, str. 154-163 (IF – 3,641, MNiSW – 35 pkt).
- B6. **Beata Toczyłowska**, Elzbieta Zieminska, Grazyna Goch, Daniel Milej, Anna Gerega, Adam Liebert, (2014), Neurotoxic effects of indocyanine green - cerebellar granule cell culture viability study, *Biomed Opt Express*, 2014 Feb 19, 5/3 str. 800-816 (IF – 3,497, MNiSW – 35 pkt).
- B7. **Beata Toczyłowska**, Małgorzata Chalimoniuk, Magdalena Wodowska, Ewa Mayzner-Zawadzka, (2006), Changes in concentration of cerebrospinal fluid components in patients with traumatic brain injury, *Brain Research*, 1104, str. 183-189 (IF – 2,341, MNiSW – 20 pkt)

- B8. **Beata Toczyłowska**, Zygmunt Jamrozik, Adam Liebert, Hubert Kwiecinski, (2013), NMR-based Metabonomics of Cerebrospinal Fluid Applied to Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 33/1, str. 21-32 (IF – 0,208, MNiSW – 15 pkt).

c) Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Rozważania naukowe, będące tematem mojego Autoreferatu, zawarte w niniejszym jednotematycznym cyklu 8 publikacji pt. "Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach biomedycznych ze szczególnym uwzględnieniem metabolomiki" dotyczą zastosowania spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) w badaniach materiałów biologicznych i medycznych. Badania własne koncentrują się wokół zastosowania NMR w metabolomice. Publikacje przedstawione w Autoreferacie powstały we współpracy z Klinikami Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) i Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN (IMDiK PAN). Ośrodki te umożliwiły pozyskanie materiału klinicznego – płynów ustrojowych i tkanek od pacjentów oraz materiału biologicznego pochodzenia zwierzęcego.

Spektroskopia NMR w badaniach biomedycznych

Badania objęte tematem Autoreferatu podjęłam po uzyskaniu stopnia doktora. Rozpoczęłam wówczas prace badawcze ukierunkowane na poszukiwanie nowej, nieinwazyjnej metody badań przesiewowych do szybkiej i precyzyjnej diagnostyki chorób prowadzących do powstania zaburzeń metabolicznych, dodatkowo niewymagającej wstępnego przygotowania próbek płynów ustrojowych, a jednocześnie umożliwiającej wskazanie biomarkerów patomechanizmów. Zainteresowałam się związkami o małej masie cząsteczkowej zawartymi w płynach ustrojowych, a jako metodę badawczą wybrałam spektroskopię NMR wysokiej rozdzielczości pozwalającą na analizę zarówno jakościową jak i ilościową związków chemicznych. Istotną zaletą spektroskopii NMR jest też możliwość obserwacji jąder cząsteczek pochodzących od wielu związków znajdujących się w badanej próbce, również tych niezidentyfikowanych, w jednym eksperymencie, a analizę ilościową prowadzić z wykorzystaniem jednej substancji wzorcowej. Uważam, że wybrana przeze mnie metodyka badawcza, spektroskopia NMR, a w dalszym etapie metabolomika, może znaleźć praktyczne zastosowanie w diagnostyce klinicznej oraz w badaniach podstawowych w poszukiwaniu patomechanizmów.

Jak wspomniano wyżej, wybrana przeze mnie metoda do badań związków o małej masie cząsteczkowej to spektroskopia NMR. Bada ona oddziaływanie oscylującego pola magnetycznego RF (*Radio Frequency* – o częstotliwości radiowej) z układem jąder molekuł znajdujących się w stałym, zewnętrznym i jednorodnym polu magnetycznym. Uzyskane w ten sposób widma dają informacje o strukturze, a także dynamice cząsteczki, które mogą być trudne lub wręcz niemożliwe do uzyskania innymi metodami analitycznymi. Spektroskopia NMR pozwala na selektywną obserwację jąder posiadających niezerową liczbę spinową. Badanymi jądrami mogą być m.in. protony ^1H (widma protonowe), izotop węgla ^{13}C (widma węgla), izotop azotu ^{15}N (widma azotu), fluor ^{19}F (widma fluoru) i fosfor ^{31}P (widma fosforowe). Spektroskopia protonowa zajmuje się obserwacją przejść między magnetycznymi poziomami energetycznymi najbardziej rozpowszechnionego izotopu wodoru ^1H . To bardzo wygodna metoda określania struktury chemicznej cząsteczek o nieznannej budowie oraz potwierdzania lub oznaczania budowy nowo syntetyzowanych związków. Spełnia także ważną rolę przy wyjaśnianiu mechanizmów działania enzymów oraz przy śledzeniu przebiegu reakcji biochemicznych (1).

Spektroskopię NMR uznaje się za najlepszą z dostępnych technik badania właściwości chemicznych mieszanin związków o małym ciężarze cząsteczkowym (poniżej 1000 Da) (2). Metoda nie wymaga specjalnych procedur przygotowania próbek, poza szczególnymi przypadkami, np. badaniem lipidów, co pozwala na wykonywanie pomiarów w sposób zautomatyzowany. Dolnym progiem detekcji w pomiarach z wykorzystaniem spektroskopii NMR są związki w stężeniach w roztworze rzędu dziesiątków mikromoli. Inne techniki analityczne, takie jak HPLC (ang. *High Performance Liquid Chromatography*), spektrometria mas, ELISA (ang. *Enzyme-linked Immuno Assay*), czy RIA (ang. *Radio Immuno Assay*), pozwalają na detekcję wybranych związków w znacznie mniejszych stężeniach, ale są one, w odróżnieniu do NMR, metodami niszczącymi próbki i nie znajdują tak wszechstronnego zastosowania, jakie ma spektroskopia NMR. Obecnie dąży się do ich wykorzystania łącznie z detekcją NMR, np. LC-NMR (ang. *Liquid Chromatography – NMR*), co pozwala na kombinację najlepszych cech komplementarnych obu metod analitycznych.

Jak wspomniano, NMR charakteryzuje się stosunkowo małą czułością w porównaniu z innymi metodami analitycznymi nawet dla najsilniejszych pól magnetycznych stosowanych w spektrometrach *in vitro* 21,1 T (900 MHz). Jej zalety ujawniają się w przypadkach, gdy poza wykryciem w próbce obecności badanego związku i określeniem jego stężenia, potrzebne są dodatkowe informacje np. budowa jego cząsteczki. Ma to szczególne znaczenie, gdy substancja nie była wcześniej zidentyfikowana. W badaniach roztworów peptydów, białek i mieszanin

związków organicznych z powodzeniem wykorzystuje się spektroskopię protonową. Również płyny ustrojowe, będące mieszaniną substratów i produktów przemiany materii, mogą być obiektem eksperymentów NMR pozwalających na analizę zawartych w nich związków. W widmach NMR większości płynów ustrojowych niemożliwe jest przypisanie wszystkich sygnałów do metabolitów, nawet z wykorzystaniem spektrometrów o najwyższej częstotliwości (900 MHz). Mimo coraz wyższych częstotliwości spektrometrów NMR pozwalających na lepszą identyfikację większej liczby sygnałów pochodzących od jąder cząsteczek związków, nie udaje się rozwiązać wszystkich problemów związanych z identyfikacją, gdyż często ujawniają się nowe.

W pomiarach spektroskopowych badanej próbki niezbędna jest obecność deuterowanego rozpuszczalnika, jakim może być woda ciężka (D_2O) lub chloroform deuterowany $CDCl_3$. Pozwalają one na uzyskanie sygnału pochodzącego z jądra 2H (sygnału *lock*), niezbędnego do uwzględnienia w pomiarach spektroskopowych dryftu stałego pola magnetycznego. Do próbek roztworów wodnych dodawana jest D_2O w stosunku 10% v/v lub rozpuszcza się w niej liofilizowaną/odparowaną próbkę. Ekstrakt lipidowy rozpuszczany jest w $CDCl_3$ po liofilizacji/odparowaniu.

Najczęściej stosowaną metodą badawczą NMR w badaniach biochemicznych, w tym płynów ustrojowych i ekstraktów tkanek, jest spektroskopia jednowymiarowa. W jednowymiarowej spektroskopii NMR jest dostępnych wiele różnych sekwencji impulsów, z których podstawową jest sekwencja jednopulsowa. Taka sekwencja nie tłumi żadnych sygnałów. Jednakże silny sygnał pochodzący od jąder cząsteczek rozpuszczalnika jest głównym problemem w pomiarach metabolitów dających słabe sygnały. Z tego względu konieczna jest redukcja sygnału rozpuszczalnika. Jednym ze sposobów redukcji tego sygnału jest usunięcie rozpuszczalnika w trakcie przygotowania próbek do eksperymentów. Można zastosować odparowanie rozpuszczalnika lub liofilizację próbki i jej ponowne rozpuszczenie w rozpuszczalniku deuterowanym (3-5). Stosując te procedury należy liczyć się z utratą lotnych związków znajdujących się w próbce np. acetonu z roztworów wodnych. W przypadku płynów ustrojowych, będących roztworami wodnymi, gdy zależy nam na uzyskaniu informacji o wszystkich substancjach zawartych w próbce, także lotnych, nie są stosowne procedury przygotowawcze lub są one ograniczane do minimum. Zmniejszenie sygnału rozpuszczalnika (tłumienie) można uzyskać stosując specjalne techniki pomiarowe z zastosowaniem sekwencji z szybkimi impulsami nasycającymi wolno relaksujące jądra cząsteczek rozpuszczalnika. Powoduje to, że sygnały pochodzące od szybko relaksujących jąder cząsteczek metabolitów są

lepiej widoczne w widmie. Stosowanymi sekwencjami impulsów z tłumieniem sygnału rozpuszczalnika mogą być np. „*Presat*”, „*binominal*”, „*WET*” lub „*excitation sculpting*”.

Sekwencje echa spinowego są innymi sekwencjami impulsów stosowanymi w badaniach NMR płynów ustrojowych. Mają one zastosowanie w badaniach płynów zawierających cząsteczki o dużej masie cząsteczkowej, np. białka, lipoproteiny czy lipidy. Jedną z takich sekwencji jest sekwencja CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*). Wykorzystuje ona różnice właściwości relaksacyjnych rozpuszczalnika, makromolekuł i cząsteczek o małej masie cząsteczkowej charakteryzowane przez czasy relaksacji T_2 . Zastosowanie tej sekwencji pozwala uzyskać zmniejszenie sygnałów pochodzących od jąder cząsteczek rozpuszczalnika i makromolekuł. Daje to lepsze uwidocznienie w widmie sygnałów pochodzących od jąder cząsteczek związków o małej masie cząsteczkowej, mających dłuższe czasy relaksacji T_2 . W takim widmie stają się widoczne sygnały pochodzące od jąder cząsteczek, które w widmach zmierzonych z zastosowaniem innych sekwencji impulsów są niewidoczne lub przysłaniane przez sygnały pochodzące od jąder makrocząsteczek.

Do identyfikacji związków w próbkach płynów ustrojowych wykorzystuje się widma dwuwymiarowe homojądrowe proton-proton np.: COSY (*CO*rrelation *S*pectroscop*Y*) oraz heterojądrowe proton-węgiel np.: HSQC (*H*eteronuclear *S*ingle *Q*uantum *C*orrelation) lub HMBC (*H*eteronuclear *M*ultiple *B*ond *C*oherence). Stosowane są także inne sekwencje wykorzystujące dodatkowo techniki gradientowe. Eksperymenty COSY wykorzystywane są do detekcji sygnałów pochodzących od protonów sąsiadujących tej samej cząsteczki (maksymalnie przez cztery wiązania). Sygnały korelacyjne pochodzące od protonów tego samego związku widoczne są tylko wówczas, gdy pomiędzy protonami występuje sprzężenie spinowo-spinowe. Metoda jest użyteczna wówczas, gdy występuje nakładanie się sygnałów multipletowych, które znacznie utrudniają interpretację widma jednowymiarowego. Korelacja heterojądrowa wykorzystywana jest do przypisania sygnałów w widmie wybranego izotopu do sygnałów najczęściej w widmie protonowym. Metoda ta jest pomocna w przypisaniach sygnałów pochodzących od jąder cząsteczek obu izotopów nawet, jeśli znana jest tylko część przypisań sygnałów jednego lub obu izotopów. W przypadku cząsteczek o małym ciężarze cząsteczkowym zazwyczaj korelowany jest proton z izotopem węgla ^{13}C lub fosforem ^{31}P .

Jak zostało wspomniane, spektroskopia NMR pozwala zmierzyć widma pochodzące od jąder wielu izotopów. Analiza widm takich izotopów pozwala wyodrębnić z mieszaniny związki zawierające określony, interesujący atom, np. ^{31}P – charakterystyczny dla fosfolipidów i związków wysokoenergetycznych, ^{19}F – dla metabolitów leków zawierających fluor i ^{15}N – stosowany głównie w przypadku analizy łańcuchów bocznych białek i peptydów, po ich

znakowaniu tym izotopem. Można zatem przeprowadzić badania próbki wybierając kolejno interesujące izotopy (np. ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , ^{15}N), uzyskując w ten sposób szereg widm pozwalających na szczegółową analizę składu biochemicznego próbki lub analizę struktury cząsteczki.

Jedynym występującym w przyrodzie izotopem fosforu jest izotop ^{31}P . Widma tego izotopu rejestruje się wyłącznie technikami impulsowymi z zastosowaniem różnych metod zwiększających czułość detekcji, np. dużej liczby powtórzeń, zwiększonej objętości próbki w obszarze pomiarowym, zastosowanie szerokopasmowego odsprężania oddziaływań z protonami. W badaniach roztworów wodnych próbek biologicznych jako substancję wzorcową przesunięcia chemicznego stosuje się 85% kwas ortofosforowy (H_3PO_4). Ponieważ związków zawierających jądra ^{31}P w próbkach biologicznych jest zdecydowanie mniej niż związków zawierających protony, to widma takie są znacznie prostsze do interpretacji, gdyż sygnały jąder cząsteczek rzadziej nakładają się na siebie. W widmach fosforowych płynów ustrojowych widocznych jest kilka do kilkunastu sygnałów, podczas gdy w widmach protonowych tej samej próbki obserwuje się kilkadziesiąt sygnałów.

Wiele sygnałów w widmach NMR pochodzących od związków zawartych w próbkach kliniczno-biologicznych zostało już zidentyfikowanych i są ujęte w bazach danych np. w *The Human Metabolome Database* (HMDB) (<http://www.hmdb.ca>), *Biomagresbank* (BMRB-Metabolomics) (<http://www.bmrwisc.edu/metabolomics/>), czy *The Birmingham Metabolite Library* (BML-NMR) (<http://www.bml-nmr.org>). Zawierają one jedno i dwuwymiarowe widma protonowe NMR związków referencyjnych wykonanych w różnych warunkach eksperymentalnych i przy różnych parametrach. Bazą danych ukierunkowaną na eksperymenty metabolomiczne jest *MetaboLights* (<http://www.ebi.ac.uk/metabolights/>). Baza ta uwzględnia różne próbki kliniczno-biologiczne oraz różne techniki badawcze, jak również widma substancji wzorcowych. Dodatkowo wyjaśnia rolę biologiczną metabolitów, umiejscowienie w organizmie i stężenie naturalne. Nie jest jednak możliwe wykorzystanie żadnej z tych baz wprost do analiz metabolomicznych lecz dopiero poprzez dodatkowe oprogramowanie. Widma związków zawarte w tych bazach, nawet *MetaboLight*, nie obejmują danych z widm fosforowych (związków wysokoenergetycznych) oraz nie zawierają żadnych danych związków lipidowych. Eksperymenty dotyczą tylko surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego, przy czym w niektórych bazach są one przedstawione jako wyniki eksperymentów przeprowadzonych na próbkach po wcześniejszym ich odfiltrowaniu. W badaniach własnych żadna z powyższych baz nie znalazła zastosowania ze względu na stosowanie innych parametrów pomiarów widm (częstotliwości spektrometru wpływającej na rozdzielczość widm, zastosowanych sekwencji

impulsów, rozpuszczalników, badanych jąder atomów) oraz badanie innych mediów, gdyż oprócz surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego analizowałam żółć, moczu i ekstrakty tkanek mózgu szczura oraz tętnic.

Ekstrakty lipidowe płynów ustrojowych lub tkanek pozwalają na analizę m.in. nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, triglicerydów, fosfolipidów i cholesterolu (6-10). Badania umożliwiają analizę znacznie większej liczby związków, niż w rutynowych badaniach klinicznych. Spektroskopię NMR związków hydrofobowych wraz z analizą dyskryminacyjną danych otrzymanych z tych widm przyjęto nazywać lipidomiką, która jest szczególną częścią metabolomiki.

Zastosowanie substancji wzorcowej o znanym stężeniu w badaniach spektroskopii NMR pozwala na wykonanie nie tylko do analiz jakościowych, ale również pomiarów ilościowych metabolitów. Jest to niezwykle cenna zaleta tej metody, pozwalająca na ocenę zmian ilościowych poszczególnych związków w badanym materiale biomedycznym. Jako substancję wzorcową w pomiarach ilościowych stosuje się sól sodową kwasu 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonowego (DSS) lub sól sodową kwasu 3-(trimetylosililo)(2,2,3,3-d₄) propionowego (TSP). Sygnał pochodzący od jąder cząsteczek substancji wzorcowej umożliwia określenie położenia sygnałów pochodzących od jąder innych cząsteczek w próbce oraz ich analizę ilościową. W badaniach własnych próbek roztworów wodnych jako substancje wzorcowe stosowałam TSP (widma protonowe) i 85% H₃PO₄ (widma fosforowe). W pomiarach stężeń w widmach fosforowych roztworów chloroformowych substancją wzorcową był trifenylofosforan (TPP). W badaniach próbek biologicznych TPP stosowałam jako wzorzec zewnętrzny, który nie kontaktuje się z badaną próbką pozostając jednocześnie w tym samym obszarze pomiarowym co badana próbka. Do pomiarów NMR można wybrać jedną z kilku standardowo wykorzystywanych substancji wzorcowych i różne grupy badawcze wybierają do badań różne z nich. Można też wprowadzić własną, dowolną substancję wzorcową (11-14).

Konkludując, spektroskopia NMR jest wszechstronnym narzędziem badawczym stosowanym w analizach chemicznych i biochemicznych. W zależności od problemu badawczego dobierane są sekwencje impulsów i ich parametry oraz substancje wzorcowe i rozpuszczalniki. Przy wyborze sekwencji impulsów i doborze ich parametrów do badań NMR próbek kliniczno-biologicznych uwzględniałam właściwości próbki, w tym rodzaj rozpuszczalnika oraz właściwości magnetyczne jąder cząsteczek zawartych w próbce.

Metabolomika

Pomimo intensywnych badań prowadzonych w wielu ośrodkach, wciąż nie zostały określone odpowiednie biomarkery umożliwiające jednoznaczną identyfikację niektórych jednostek chorobowych. Ze względu na złożoną etiologię wielu chorób nie jest możliwa diagnostyka oparta na oznaczeniu pojedynczego biomarkera, dlatego też, coraz częściej zwraca się uwagę na zmiany stężeń wielu metabolitów – tzw. określanie profilu metabolicznego np. płynu ustrojowego pacjenta. Spowodowało to zwrot ku tzw. technikom „omicznym”, takim jak: metabolomika, proteomika, transkryptomika i genetyka. Metabolomika zajmuje się identyfikacją i kwantyfikacją metabolomu – zbioru wszystkich metabolitów, cząsteczek o małej masie cząsteczkowej występujących w organizmie, które są końcowym produktem ekspresji genów. Metabolomika została uznana za szybszą i lepszą technikę, w stosunku do innych, postgenomicznych technik analizy próbek biologicznych, wykorzystujących metody rozpoznawania obrazów (15). Zmiany i fluktuacje stężeń metabolitów, które występują w ciągu milisekund, są wynikiem procesów biochemicznych, takich jak sygnałowe procesy kaskadowe. Metabolomika jest narzędziem do pomiarów takich zmian, dającą informacje szybko i z odpowiednią czułością. Dane metaboliczne mogą być uzupełniane innymi np. pochodzącymi z proteomiki, transkryptomiki czy danymi środowiskowymi, klinicznymi. Takie podejście pozwala na identyfikację wielu fizjologicznych biomarkerów wbudowanych we współzależne sieci molekularne, których analiza nie jest dostępna innymi, selektywnymi badaniami analitycznymi (16-23). Do badań metabolomicznych można wykorzystać różne metody spektrometryczne, ale najczęściej wykorzystywane są spektroskopia NMR lub spektrometria mas.

Głównym obiektem moich zainteresowań badawczych stało się zastosowanie spektroskopii NMR w diagnostyce klinicznej. W pierwszej kolejności konieczne było sprawdzenie możliwości detekcji metabolitów znajdujących się w płynach ustrojowych (jakich metabolitów, z jaką czułością). Przeprowadzenie takich badań wymagało opracowania odpowiednich procedur przygotowania próbek kliniczno-biologicznych, ich badania metodą spektroskopii NMR i analizy wyników. W opracowaniu będącym przedmiotem postępowania habilitacyjnego zatytułowanym ”Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach biomedycznych ze szczególnym uwzględnieniem metabolomiki”, przedstawiono wyniki badań własnych, które obejmują:

- (1) opracowanie standardowych procedur pobierania i przechowywania próbek kliniczno-biologicznych (**B1-B4**),

- (2) opracowanie standardowych procedur badań spektroskopowych NMR próbek biomedycznych i identyfikację zawartych w nich związków o małej masie cząsteczkowej (**B1, B4**),
- (3) przygotowanie aplikacji komputerowej (*NMRanalysis*) do analiz metabolomicznych z wykorzystaniem spektroskopii NMR (**B7, B8**).

Tak jak we wszystkich pomiarach tak i w metabolomice występują błędy. Jednak niektóre z nich mają istotne znaczenie w dalszej interpretacji wyników badań. Największe błędy systematyczne powstają w czasie niewłaściwej metody zbierania i przechowywania materiału biologicznego oraz przy zastosowaniu niewłaściwych metod ekstrakcji lipidów lub związków hydrofilowych z komórek i tkanek. Także proces przygotowania próbek po ekstrakcji niesie ze sobą błędy. Wszystkie mają istotne znaczenie w procesie analizy profilu metabolicznego i wnioskowaniu o patomechanizmach.

W chwili rozpoczęcia prac nad wykorzystaniem metabolomiki w badaniach próbek kliniczno-biologicznych nie było standardowych metod pozyskiwania materiału badawczego, ani jego przechowywania oraz pomiaru widm NMR. Metabolomika jest metodą niezwykle czułą na szybkie zmiany powstające w próbkach od momentu pobrania materiału badawczego do momentu jego zamrożenia oraz na kontakt materiału z tlenem i dwutlenkiem węgla z powietrza. W związku z tym konieczne stało się opracowanie własnych procedur. Krytycznym momentem w badaniach próbek biologicznych jest szybkość, z jaką pobrana próbka zostaje zamrożona do -80°C , co wywołuje zatrzymanie metabolizmu i chroni przed zmianami stężeń metabolitów. W badaniach własnych dążyłam do jak najmniejszej ingerencji w próbkę, żeby nie utracić z jej składu związków lotnych, czy ulegających szybkiej degradacji. W związku z tym wszelkie dodatkowe procedury przed rozpoczęciem eksperymentów NMR zostały ograniczone do minimum, tj. do odwirowania składników stałych i korekty pH (w roztworach wodnych). W przypadku badań związków lipidowych konieczna była ich ekstrakcja przed pomiarami.

Kolejnymi, istotnymi elementami wpływającymi na wyniki badań są: procedury ekstrakcji związków hydrofilowych i hydrofobowych oraz przygotowania roztworów ekstraktów z tkanek (lub płynów) do badań (rozpuszczenie wyciągu wcześniej zliofilizowanego/odparowanego w deuterowych rozpuszczalnikach). Ze względu na zależność położenia sygnałów w próbkach wodnych od wartości pH, przed badaniami spektroskopowymi korygowałam ją do wartości fizjologicznej 7,4. Do badań z wykorzystaniem spektroskopii NMR związków hydrofobowych płynów ustrojowych, tkanek i komórek nerwowych zostały przygotowane i przetestowane procedury ich ekstrakcji (praca magisterska A. Mierzejewska, *Metody ekstrakcji lipidów z*

próbek biologicznych do zastosowania w metabolomice opartej na spektroskopii NMR, Uniwersytet Warszawski, 2015, której byłam promotorem). Zmierzone widma pozwoliły wybrać optymalną metodę ekstrakcji lipidów do zastosowań w spektroskopii NMR.

Wynikiem badań własnych było przyjęcie standardowych procedur minimalizujących błędy systematyczne. Błędy wynikały z różnych metod pobierania materiału oraz jego przechowywania w klinikach do czasu pomiarów NMR. Zgodnie z opracowanymi przeze mnie procedurami pobierany był materiał kliniczno-biologiczny wykorzystany następnie w moich pracach nad zastosowaniem spektroskopii NMR w badaniach płynów ustrojowych. Wyniki tych badań przedstawiono w publikacjach (**B1-B4, B7-B8**).

Badane przeze mnie materiały kliniczno-biologiczne np. surowica i żółć, zawierają makrocząsteczki – białka i lipidy. W jednowymiarowym widmie protonowym NMR takich płynów, zmierzonym z zastosowaniem sekwencji jednopulsowej, dominują szerokie sygnały pochodzące od jąder cząsteczek makrocząsteczek. Nakładają się one na wąskie sygnały pochodzące od jąder cząsteczek o małej masie cząsteczkowej. Ponieważ przedmiotem moich zainteresowań są związki o małej masie cząsteczkowej, do badań NMR tych płynów ustrojowych zostały wybrane takie sekwencje impulsów oraz ich parametry, które pozwalają na analizę tylko interesujących związków. Jednocześnie nie wymagają one przeprowadzania dodatkowych procedur usuwających z próbki makrocząsteczki np. odbiałczania, zmieniających jej skład biochemiczny. Za najefektywniejszą uznałam sekwencję echa spinowego CPMG, która została wykorzystana w badaniach własnych próbek surowicy, żółci (**B3, B4**) i płynu stawowego.

Widma NMR płynów ustrojowych z uwagi na dużą liczbę metabolitów o małej masie cząsteczkowej oraz makromolekuł są mało przejrzyste i wymagają zaawansowanych metod ich analizy oraz analizy statystycznej otrzymanych z nich danych. Analizę widm można przeprowadzić dla każdej próbki osobno i takie rozwiązanie stosowałam przy małej ilości próbek – poniżej 5 w grupie (**B2, B3**). Natomiast taka analiza widm kilkunastu do kilkudziesięciu próbek w grupie jest bardzo żmudna i czasochłonna. Do rozwiązania tego problemu zaczęto tworzyć programy automatycznej analizy widm. Wiele algorytmów automatycznej analizy widm NMR jest stosowanych przez różne grupy badawcze głównie w warunkach laboratoryjnych, we własnych badaniach (24;25). Stworzenie takich algorytmów musi uwzględniać rozwiązanie kilku problemów. Jednym z nich jest nakładanie się sygnałów pochodzących od jąder cząsteczek różnych metabolitów, które można rozwiązać stosując np. dopasowanie każdego z sygnałów krzywą Lorentza. Jednak sygnały pochodzące od jąder cząsteczek metabolitu nie muszą być pojedynczym sygnałem (singletem), ale mogą być

dubletem lub multipletem, dlatego stosuje się także porównywanie sygnałów pochodzących od badanych metabolitów z sygnałami w widmach ich substancji wzorcowych (25). Poza nakładaniem się sygnałów i ich rozróżnianiem, kolejnym problemem w automatyzacji analizy widm są różnice w wartościach przesunięcia chemicznego sygnałów jąder cząsteczek tego samego związku w różnych próbkach. W związku z potrzebą analizy większej liczby widm w laboratorium IBIB PAN powstała, przygotowana przeze mnie, półautomatyczna aplikacja *NMRanalysis* umożliwiająca analizę badanych metabolitów poprzez selekcję sygnałów pochodzących od jąder cząsteczek należących do badanych związków. Opracowana na własne potrzeby aplikacja, *NMRanalysis*, dodatkowo normalizuje sygnały pochodzące od jąder cząsteczek metabolitów do sygnału jąder cząsteczek substancji wzorcowej o znanym stężeniu, a także pozwala dokonać korekty linii podstawowej oraz generuje dane do dalszych analiz statystycznych. Aplikację wykorzystałam do analizy widm NMR i opracowania wyników przedstawionych w pracach **B4**, **B7**, **B8**. W czasie tworzenia ww. aplikacji nie były dostępne żadne inne programy. Od kilku lat są już dostępne aplikacje wykorzystywane przez różne grupy badawcze, np. aplikacja firmy Chenomx, dedykowana do analiz metabolomicznych, oraz program firmy Mestrelab Research przeznaczony głównie do analiz widm NMR, umożliwiający także generowanie danych do analiz metabolomicznych z wykorzystaniem metody *binning*.

Metabolomika do analizy danych z widm NMR wykorzystuje analizę dyskryminacyjną. Przed wykonaniem analiz statystycznych dane wymagają normalizacji do sygnału substancji wzorcowej (wzorca wewnętrznego lub zewnętrznego) oraz redukcji danych z kilkunastu-kilkudziesięciu tysięcy do kilkuset par punktów. Jedną z dwóch powszechnie przyjętych metod redukcji danych z widm NMR jest selekcja metabolitów (*targeted profiling*), a drugą *binning* (*bucketing*). Dane z widm NMR po ich redukcji i normalizacji do wzorca w próbce zostają poddane normalizacji do średniej, skalowaniu i transformacji. Algorytmy tych wstępnych procedur analizy statystycznej zawarte są w programie SIMCA (MKS Umetrics, Szwecja) powszechnie stosowanym do badań spektroskopowych i metabolomiki. Różne grupy badawcze tworzą także własne programy służące do redukcji danych widm NMR i ich analizy statystycznej, przeznaczone do zastosowania w środowisku Matlab lub R (np. MetaboLab (26)). Jednak nie znalazły one tak powszechnego zastosowania jak program SIMCA.

Opracowana przeze mnie aplikacja, *NMRanalysis*, służąca do analizy danych otrzymanych z widm NMR, pozwoliła na rozszerzenie zastosowania spektroskopii na badania kliniczne większych grup chorych (20-50 chorych w grupie). Istotnym problemem w przypadku wdrożenia metabolomiki do badań diagnostycznych jest ocena wszechstronności

wykorzystania. W badaniach nad wszechstronnością metodyki wykorzystałam opracowaną ww. aplikację programową, *NMRanalysis*, oraz program SIMCA. Z wykorzystaniem tych aplikacji przeprowadziłam badania zakresu, w jakim metabolomika wykorzystująca spektroskopię NMR zapewnia uzyskanie wiarygodnego różnicowania osób chorych i zdrowych lub dwóch różnych grup chorych. Aplikacje zostały wykorzystane w badaniach prowadzonych w Środowiskowym Laboratorium NMR, IBB PAN (pomiar widm NMR) oraz Laboratorium IBIB PAN (analiza wyników). Wyniki potwierdziły, że opracowana przeze mnie metodyka badawcza, metabolomika wykorzystująca spektroskopię NMR, pozwala na jej aplikację do badań dowolnego medium oraz w diagnostyce różnych patologii, szczególnie w badaniach dużej liczby próbek.

Spektroskopia NMR i metabolomika w badaniach próbek biologicznych - omówienie prac z cyklu

Podjęta przeze mnie tematyka – metabolomika – jest ciągle w naszym kraju pionierska. W chwili podjęcia przeze mnie badań metabolomicznych, w Polsce nie było żadnej grupy badawczej zajmującej się tym tematem. W tym czasie istniała jeszcze jedna grupa badawcza, zajmująca się jedynie analizą widm NMR (ale nie metabolomiką) surowicy pacjentów z chorobami nowotworowymi (pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Małgorzaty Kuliszkiwicz-Janus) (27-30). Opracowana przeze mnie metodyka, metabolomika wykorzystująca spektroskopię NMR i analizę dyskryminacyjną, pozwala na różnicowanie grup chorych lub chorych od zdrowych, bez szczegółowej znajomości profilu metabolicznego pacjenta (**B4, B8**). Umożliwia szybką diagnostykę choroby sugerowanej przez wstępne badania kliniczne oraz na wytypowanie biomarkerów wskazujących patomechanizmy. Ciągle istnieje wiele chorób trudnych do zdiagnozowania pojedynczym biomarkerem. W takiej sytuacji analiza wielu metabolitów, metabolomika, może być jedynym rozwiązaniem.

Sprawdzenie możliwości zastosowania spektroskopii NMR i później metabolomiki w badaniach płynów ustrojowych przeprowadziłam wykorzystując płyn mózgowo-rdzeniowy, surowicę, żółć, płyn stawowy oraz ich ekstrakty lipidowe, jak również ekstrakty hodowli komórek nerwowych i mózgu szczura.

Prace **B1** i **B2** przedstawiają wyniki badań spektroskopii NMR płynu mózgowo-rdzeniowego pobranego od pacjentów w trakcie zabiegów neurochirurgicznych. W eksperymentach NMR wykorzystano odpowiednio dobrane techniki pomiaru widm, a w szczególności sekwencje impulsów i ich parametry. Do wyboru optymalnej sekwencji impulsów i jej parametrów przetestowałam różne sekwencje impulsów z różnymi parametrami (czasami repetycji, długościami impulsów). W pracach **B1** i **B2** oprócz wyników badań przy

dobrych parametrach sekwencji przedstawiono badania możliwości zastosowania spektroskopii NMR w różnicowaniu chorób. W eksperymentach jednowymiarowych widm protonowych płynu mózgowo-rdzeniowego badałam różnice stężeń metabolitów płynu pobranego od pacjentów z grup: kontrolnej, z guzami mózgu i z krwawieniem podpajęczynówkowym. Do analizy wykorzystywałam pomiary intensywności sygnałów pochodzących od jąder cząsteczek metabolitów. Identyfikację związków w widmie NMR płynu mózgowo-rdzeniowego prowadziłam z wykorzystaniem sekwencji jednopulsowej i sekwencji homojądrowej COSY z zastosowaniem substancji wzorcowej TSP dodanej bezpośrednio do próbki (wzorec wewnętrzny). W badaniach spektroskopii NMR płynu mózgowo-rdzeniowego możliwa jest identyfikacja 53 metabolitów, z czego 21 możliwych jest do oznaczenia tylko za pomocą NMR (31). W badaniach własnych oznaczałam min. 33 metabolity (w tym m.in. alanina, mleczan, myo-inozytol) dotychczas nieoznaczanych w rutynowych badaniach klinicznych, w których oznaczane jest stężenie tylko jednego metabolitu (glukozy). Zaobserwowałam mniejsze stężenie glutaminy w grupie z krwawieniem podpajęczynówkowym niż w grupie kontrolnej i z guzami mózgu, a stężenie glukozy i mleczanu było najwyższe w grupie z guzami mózgu. Obserwowane różnice potwierdziły występowanie zwiększonego metabolizmu u chorych z nowotworami mózgu.

Badania własne zostały wykorzystane do oceny możliwości wykorzystania metody spektroskopii NMR do różnicowania stopnia złośliwości guzów mózgu („Spektroskopia MRI wysokiej rozdzielczości wyciągów tkanek nowotworowych i płynu mózgowo-rdzeniowego *in vitro* - zastosowanie w diagnostyce klinicznej”, projekt badawczy KBN 4 PO5B 05414p02, 1998-2001). Wyniki prac, przedstawiane w dwóch publikacjach (**B1**, **B2**) i na 8 konferencjach naukowych międzynarodowych i krajowych (Zał. 3 część E – 9, 10, 18, 35, 37-40), wykazały możliwość różnicowania stopnia złośliwości nowotworu na podstawie badań z wykorzystaniem spektroskopii NMR zarówno bioptatu, jak i płynu mózgowo-rdzeniowego (Zał. 3 część E – 17-20, 38-40). Do analizy statystycznej danych otrzymanych z widm NMR, po normalizacji amplitud sygnałów metabolitów do amplitudy sygnału wzorca oraz selekcji danych, zastosowano analizę statystyczną z wykorzystaniem algorytmu klasyfikacji k-NN sąsiadów. Prace zawarte w załączniku 3 części E nie wchodzi w skład opisywanego osiągnięcia naukowego, ale ukazują możliwości praktycznego wykorzystania opracowanej metodyki badawczej.

W ramach realizacji grantu „Zastosowanie spektroskopii NMR wysokiej rozdzielczości do oceny próbek żółci pobranych od pacjentów po przeszczepieniu wątroby w aspekcie pooperacyjnej oceny funkcji graftu” (projekt badawczy MNiSW 2 PO5C 076 28, 2005-2008)

przeprowadziłam analizę metabolitów w żółci pobranej od pacjentów po przeszczepie wątroby (**B3**, **B4** oraz Zał. 3. część E – 11). Analizowałam zarówno metabolity o małej masie cząsteczkowej w roztworze wodnym, jak i lipidy po ich ekstrakcji z żółci. Były to pierwsze w świecie badania biochemiczne żółci z zastosowaniem spektroskopii NMR i metabolomiczne u chorych po przeszczepie wątroby, których żółć do badań pobierana była zaraz po zakończeniu zabiegu transplantacji. Badania własne miały na celu opracowanie nowej metody szybkiego oznaczenia składników biochemicznych żółci takich jak aminokwasy, kwasy organiczne czy lipidy. Metodą spektroskopii ^{31}P NMR analizowałam stan przeszczepionych wątroby badając trzy związki lipidowe: fosfoetanolaminę (PE), lizofosfatydylocholinę (LPtdC) oraz fosfatydylocholinę (PtdC) i fosfocholiny (PC). Stężenie LPtdC było niższe w żółci pochodzącej od transplantowanej wątroby niż w żółci z grupy kontrolnej. Stężenie PE u pacjentów z przeszczepioną wątrobą było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Stosunek PE/(PtdC+PC) różnił się istotnie statystycznie w obu grupach. Wyniki tych badań wykazały, że dysfunkcja wątroby prowadzi do zaburzenia szlaku PtdC i PE. Badanie te wykazały, że analiza widm NMR żółci może być wykorzystana do oceny stanu hepatocytów przeszczepionej wątroby np. jako dodatkowe narzędzie w ocenie funkcji graftu kilka minut po zabiegu. Wyniki opublikowane w *Transplantation Proceedings* (2003) według mojej najlepszej wiedzy były pierwszym w świecie doniesieniem przedstawiającym innowacyjną metodę wykorzystującą spektroskopię NMR do analizy funkcji przeszczepionej wątroby zaraz po podjęciu pracy przez narząd. Kolejne publikacje, innych autorów, dotyczące zastosowania metabolomiki czy lipidomiki z wykorzystaniem spektroskopii NMR w badaniach przeszczepionej wątroby zaczynają pojawiać się dopiero dwa lata później, w roku 2005 (32;33). Praca **B3** była cytowana 9 razy (7 w czasopiśmie i 2 w monografiach (34;35)), (baza Web of Science z dnia 03.08.2016).

W badaniach biomedycznych nie zawsze niezbędna jest analiza metabolomiczna. Często do analiz wystarczające jest porównanie stężeń między metabolitami lub między badanymi grupami. W kolejnych badaniach własnych metodę spektroskopii NMR wykorzystałam do analizy interakcji między substancjami podawanymi w badaniach toksyczności timerosalu (związku zawierającego rtęć), jak również w badaniach neurotoksyczności dwóch związków kontrastowych, Gadovistu i zieleni indocyjaninowej (ICG) stosowanych w badaniach obrazowych. Badania neurotoksyczności prowadzono na hodowlach pierwotnych neuronów ziarnistych mózdzku szczura.

W pracy **B5** przedstawiono wyniki badań neurotoksyczności timerosalu i neuroprotektynowego działania aminokwasów zawierających grupy tiolowe. Badałam, czy

aminokwasy podawane łącznie z timerosalem działają na komórki nerwowe bezpośrednio, czy też wchodzi w reakcje tworząc kompleksy w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (w środowisku inkubacyjnym), co świadczyłoby o działaniu na komórkę produktów reakcji timerosalu z testowanymi aminokwasami, a nie bezpośrednio substratów. Do tego badania wykorzystywałam spektroskopię NMR i badałam mieszaniny aminokwasów tiolowych i timerosalu. Badania takie wraz z badaniami neurotoksyczności przeprowadzone zostały po raz pierwszy na świecie. Otrzymane wyniki badań spektroskopowych NMR pokazały, że aminokwasy tiolowe łączą się z regionem alifatycznym timerosalu zawierającym rtęć, co wskazuje na główny udział procesów pozakomórkowych w neuroprotekcijnym działaniu testowanych aminokwasów w hodowlach komórkowych. Ponadto, wyniki eksperymentów NMR pozwoliły na stwierdzenie, że także nietoksyczna reszta kwasu sulfosalicylowego pochodząca od timerosalu wiąże aminokwasy zawierające grupę -SH. Powoduje to dodatkowe obniżenie biodostępności dla organizmu wolnych aminokwasów tiolowych, a tym samym ograniczając ich potencjał neuroprotekcyny. Praca **B5** cytowana jest w 16 publikacjach (baza Web of Science z dnia 03.08.2016).

Spektroskopię NMR wykorzystywałam również do sprawdzenia interakcji między dwoma związkami kontrastowymi, Gadovistem i ICG. Oba preparaty stosowane są w badaniach obrazowych – Gadovist zawierający gadolinę w MRI (tomografia rezonansu magnetycznego ang. *Magnetic Resonance Imaging*), a ICG w badaniach fluorescencyjnych. Podejmowane są próby stosowania ICG do monitorowania stanu ukrwienia mózgu na oddziałach intensywnej opieki medycznej, szczególnie u pacjentów w krytycznym stanie z uszkodzoną barierą krew-mózg (36). W związku z tym badano, czy ICG może negatywnie oddziaływać na neurony i jakie jest maksymalne, bezpieczne stężenie środka. Dodatkowo przetestowano jaka jest neurotoksyczność ICG w kombinacji z Gadovistem. Możliwość monitorowania funkcji mózgu z użyciem ICG opisują prace Obrigg et al. (37) oraz grupy badawczej A. Lieberta (38-41). Celem badań było sprawdzenie, czy bezpieczne będzie podanie obu środków kontrastowych jednocześnie, w czasie jednego badania, zarówno z wykorzystaniem MRI, do badań strukturalnych mózgu, jak i fluorescencyjnego do badań funkcjonalnych mózgu. Do tej pory obie substancje, zaliczane do związków o małej toksyczności, były stosowane u ludzi pojedynczo (42-45), ale nieznanne były interakcje między nimi. Dlatego podjęto badania, aby sprawdzić czy ICG i Gadovist podane łącznie będą bezpieczne. W badaniach wybrano stężenia podawanych środków występujące w surowicy u ludzi przy standardowych badaniach obrazowych jak również wielokrotnie wyższe. Wykonane badania spektroskopowe, zarówno NMR jak i Vis-nIR nie wykazały interakcji między badanymi środkami kontrastowymi

niezależnie od stężeń obu substancji. Z literatury wiadomo, że ICG w roztworach wodnych tworzy oligomery (46-48), które są bardziej toksyczne dla komórek niż monomery. Ich ilość w roztworze wzrasta wraz ze stężeniem ICG, dlatego równoległe z badaniami na komórkach prowadzono badania *ex-vivo* nad zjawiskiem oligomeryzacji ICG. Stwierdzono (stosując spektroskopię absorpcyjną), że w roztworze zawierającym 25 μ M ICG przeważają monomery. W przypadku najwyższego stężenia 125 μ M ICG - przeważały oligomery. Wykazano też, że właściwości fizykochemiczne ICG oznaczane przy użyciu spektroskopii NMR i absorpcyjnej są inne w czystym roztworze wodnym niż w jonowym środowisku inkubacyjnym LOCKE, stosowanym w hodowli komórkowej w czasie eksperymentów. Te różnice zanikały, gdy właściwości fizykochemiczne ICG badano w roztworze wodnym wzbogaconym w jony Ca²⁺ w tym samym stężeniu, które występuje w LOCKE. Wysznuo wniosek, że ICG łączy się z jonami wapnia. Na podstawie eksperymentów przeprowadzonych z równoczesnym i sekwencyjnym podawaniem ICG i Gadovistu, można przyjąć, że podawanie obydwu związków kontrastowych w kolejności najpierw Gadovist, a potem ICG jest bezpieczne dla neuronów. Stwierdzono przy tym, że Gadovist wykazuje właściwości neuroprotektcyjne o niejasnym mechanizmie wobec ICG. Wyniki badań z wykorzystaniem spektroskopii NMR i absorpcji atomowej przedstawiono w pracy **B6**.

Własną aplikację, *NMRanalysis*, wykorzystałam do analizy widm protonowych związków hydrofilowych i hydrofobowych płynów ustrojowych i tkanek. Dane otrzymane z widm NMR tych płynów, wygenerowane przez własną aplikację, poddane zostały analizie statystycznej. Oceniałam m.in. zmiany stężeń aminokwasów oraz innych związków organicznych płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów po izolowanym urazie mózgu (**B7**). Były to pierwsze na świecie badania korelacji zmian stężenia tlenu azotu, spowodowanych przez stres oksydacyjny (wynik urazu mózgu) ze zmianami stężenia L-cytruliny w okresie 14 dniowej obserwacji chorych. Dotychczasowe badania prowadzone na zwierzętach w ciągu 72 godzin po wywołaniu stresu oksydacyjnego potwierdzały korelację zmian stężenia L-cytruliny ze zmianami stężenia tlenu azotu (49;50). Badania własne przedłużone do 14 dni wykazały, że stężenie L-cytruliny koreluje ze zmianami tlenu azotu w ciągu 72 godzin, ale później korelacja zanika. Stężenia tlenu azotu powraca do wartości prawidłowych, a stężenie L-cytruliny dalej maleje i spada poniżej wartości prawidłowych (zmierzonych dla grupy kontrolnej). U pacjentów z rozleglejszymi urazami mózgu, mniejszymi wartościami GOS (*Glasgow Outcome Scale*) i RTS (*Revised Trauma Score*), stwierdzano także wyższe stężenia badanych metabolitów: argininy, L-cytruliny, kreatyny, kreatyniny, alaniny, fenyloalaniny, 3-OH-maślanu, octanu, acetonu, acetoctanu, myo-inozytolu i scyllo-inozytolu, tyrozyny, choliny, GABA, izoleucyny, lizyny,

waliny, histydyny, progonianu, mleczanu, cytrynianu, mrówczanu, glutaminy (Gln), glutaminianu (Glu) oraz łącznie Gln i Glu. Przedstawione w pracy **B7** wyniki wskazują, że wyższe stężenia metabolitów w płynie mózgowo-rdzeniowym pomagają w powrocie do zdrowia, co manifestuje się wyższymi wartościami GOS. Praca cytowana jest w 14 publikacjach (baza Web of Science z dnia 03.08.2016).

W ramach projektu badawczego zatytułowanego „Zastosowanie CDP-choliny w izolowanych urazach mózgu” (projekt badawczy MNiSW 6 P05C 02420, 2001-2004) prowadziłam badania profilu metabolicznego płynu mózgowo-rdzeniowego z wykorzystaniem spektroskopii NMR w ciągu 14 dniowej terapii pacjentów. Wyniki pokazały, że chociaż przeżywalność pacjentów poddanych leczeniu CDP-choliną jest większa, to nie zaobserwowano istotnych różnic w profilu biochemicznym płynu mózgowo-rdzeniowego (Załącznik 3 część C – 2, 3, część E – 29, 31, 34, 36). Wyniki te nie wchodzą w skład cyklu publikacji, ale wskazują praktyczne wykorzystanie mojego dorobku w badaniach klinicznych.

W kolejnych badaniach analizę widm NMR rozszerzyłam o analizę dyskryminacyjną otrzymanych z nich danych. Do badań wykorzystałam opracowane przeze mnie procedury zbierania próbek i ich przechowywania oraz własną aplikację wspomagającą analizę widm NMR. Analiza dyskryminacyjna danych uzyskanych z widm NMR umożliwiła zbudowanie modelu klasteryzacji pacjentów. W badaniach własnych stosowałam komercyjną aplikację do analiz statystycznych widm, SIMCA, a w analizie statystycznej metody nienadzorowane i nadzorowane. W analizach chemometrycznych widm NMR (51-62) powszechnie przyjęto stosowanie metody OPLS-DA (analiza dyskryminacyjna zmiennych ortogonalnych metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów, ang. *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*) ze skalowaniem Pareto, które związkom o małych stężeniach nadają większy wpływ na tworzenie modelu niż związkom o większych stężeniach. Wyniki takich analiz pozwalają uzyskać informacje o klasyfikacji pacjentów do grup, a wskazywane biomarkery ukierunkować poszukiwania patomechanizmów.

W pracy własnej **B8** opisano zastosowanie metabolomiki do diagnostyki stwardnienia zanikowego bocznego (SLA). Praca ta jest, według mojej najlepszej wiedzy, drugą pracą na świecie poświęconą tej tematyce. Jest cytowana w jednej publikacji i jednej monografii (70;71). Analiza dyskryminacyjna danych otrzymanych z widm spektroskopowych NMR płynu mózgowo-rdzeniowego pobranego od grupy chorych z SLA i grupy chorych kontrolnych (bez chorób neurologicznych) wykazała możliwość różnicowania grupy chorych od grupy kontrolnej. Analizowane wyniki badań płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów z wykorzystaniem metabolomiki pozwoliły w 91% na prawidłową ich kwalifikację do

odpowiednich grup. Analiza 33 sygnałów pochodzących od jąder cząsteczek metabolitów wskazała potencjalne biomarkery: octan, mleczan, łącznie Glu i Gln, cholinę, mrówczan, fenyloalaninę, glukozę, kreatynę, walinę, tyrozynę, lizynę i alaninę. Stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenia octanu, mleczanu oraz łącznie Gln i Glu u chorych z SLA.

Jednym z istotnych celów moich badań było sprawdzenie, czy opracowana metodyka badawcza, metabolomika z wykorzystaniem spektroskopii NMR, ma zastosowanie ogólne, tzn. nie zależy od badanego medium, nie zależy od badanych grup chorych (różne patologie) oraz może być stosowana zarówno w badaniach ludzi jak i w przypadku badań modeli zwierzęcych chorób. Zastosowanie opracowanych, własnych procedur i aplikacji zostało sprawdzone na próbkach płynów ustrojowych pochodzących od grup chorych liczących 10-30 osób/grupę i/lub w różnych stanach patologicznych podanych poniżej. Współpracujący klinicyści i biolodzy zaproponowali wykorzystanie metabolomiki w badaniach:

- (i) płynu mózgowo-rdzeniowego – w celu wykrycia różnic w profilu metabolicznym grupy kontrolnej i chorych ze stwardnieniem zanikowym bocznym (SLA) (**B8**, Zał. 3 część E – 24), u chorych po urazach mózgu (**B7**, Zał. 3 część E – 35), chorych z guzami mózgu (**B1**, **B2**), chorych z potwierdzoną śmiercią mózgu oraz chorych na stwardnienie rozsiane (SM);
- (ii) żółci – do wczesnej oceny funkcji wątroby po przeszczepie (**B3**, **B4**, Zał. 3 część E – 11, 12, 14, 27, 28, 30, 32, 33);
- (iii) surowicy – do różnicowania pacjentów z dyslipidemią, u których choroba rozwija się jako wielonaczyniowa choroba wieńcowa lub jako ciężka stenoza aortalna (Zał. 3 część E – 2, 50) oraz do różnicowania osób zdrowych i chorych na sarkoidozę (Zał. 3 część E – 1, 46, 51). Wyniki te nie wchodzą w skład cyklu publikacji, ale wskazują praktyczne wykorzystanie mojego dorobku w badaniach klinicznych – badania są kontynuowane;
- (iv) płynu stawowego – do różnicowania reumatoidalnego zapalenia stawów od zwyrodnieniowego zapalenia stawów (Zał. 3 część E – 4, 5). Wyniki te nie wchodzą w skład cyklu publikacji, ale wskazują praktyczne wykorzystanie mojego dorobku w badaniach klinicznych – badania są kontynuowane.

Potwierdzenie śmierci mózgu jest ciągle problematyczne, a ze względu na coraz częstsze pobieranie narządów do transplantacji budzi wiele emocji m.in. rodzin. Ciągle poszukiwana jest niezależna, obiektywna metoda potwierdzająca śmierć mózgu. Metabolomikę wykorzystującą spektroskopię NMR zastosowałam do badań zmian biochemicznych płynu mózgowo-rdzeniowego pobranego od pacjentów ze stwierdzoną śmiercią mózgu. Wykonana przeze mnie analiza widm NMR wskazuje na możliwość jej potwierdzenia na podstawie badań

biochemicznych płynu mózgowo-rdzeniowego. Przeprowadzone badania płynu mózgowo-rdzeniowym pacjentów ze stwierdzoną śmiercią mózgową wykazały zwiększone stężenie m.in. związków cyklu beztlenowej przemiany materii (mleczanu, alaniny i pirogronianu). Kontynuuję badania nad porównaniem zmian biochemicznych płynu mózgowo-rdzeniowego występujących w grupie pacjentów ze śmiercią mózgu ze zmianami w płynie w grupie pacjentów z izolowanym urazem mózgu, zarówno tych, którzy przeżyli 30 dniowy okres obserwacji od urazu, jak i tych, którzy w tym czasie zmarli. Wyniki badań nie wchodzą w zakres opisywanego osiągnięcia naukowego, ale wskazują praktyczne wykorzystanie metabolomiki i opracowanych przeze mnie procedur w badaniach klinicznych.

Metabolomikę, a właściwie lipidomikę, wykorzystałam do badań surowicy chorych na sarkoidozę. To choroba trudna do zdiagnozowania rutynowymi metodami i opracowanie specyficznego testu do jej rozpoznania przyspieszyłoby właściwą terapię. Badania profilu lipidowego z wykorzystaniem spektroskopii NMR pokazały, że zastosowanie lipidomiki pozwala na rozróżnienie osób chorych od zdrowych oraz wskazały potencjalne biomarkery: fosfatydylocholinę, triglicerydy i kwasy tłuszczowe. Wyniki tych badań przedstawiono na konferencjach międzynarodowych i krajowych (Zał. 3 część E – 1, 46, 51). Kontynuuję badania nad wpływem rehabilitacji oddechowej na skład lipidowy surowicy chorych z wykorzystaniem lipidomiki wykorzystującej spektroskopię NMR. Wyniki te nie wchodzą w skład cyklu publikacji, ale wskazują praktyczne wykorzystanie mojego dorobku w badaniach klinicznych. Są to pierwsze badania tą metodą z zastosowaniem do diagnostyki sarkoidozy. Podobne badania z zastosowaniem metabolomiki prowadzone były w Polsce w przypadku innych chorób płuc takich jak guzy płuc i obturacyjna choroba płuc (63), a także w badaniach bezdechu sennego (64;65).

Ze względu na inne postępowanie terapeutyczne w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) i zwyrodnieniowym zapaleniu stawów (ZZS) istotne jest postawienie prawidłowej diagnozy. Przeprowadziłam badania możliwości zastosowania metabolomiki wykorzystującej spektroskopię NMR do badań diagnostycznych obu chorób. Do tej pory diagnostyka tych chorób opiera się na stwierdzeniu obecności przeciwciał anti-CCP (ang. *anti-cyclic citrullinated peptide*), przeciwciał IgG przeciwko cyklicznemu peptydowi cytrulinowemu, w postaci reumatoidalnej choroby. Istnieje jednak grupa chorych seronegatywnych, dla której opóźnienie w leczeniu skutkuje znacznymi i nieodwracalnymi uszkodzeniami stawów. Badania spektroskopowe płynu stawowego pobieranego od chorych w czasie synowektomii stawu kolanowego zostały wykorzystane do zbadania możliwości rozróżniania chorych i tym samym możliwości wczesnej diagnostyki. Analiza OPLS-DA danych spektroskopowych wykazała

różnicowanie grup chorych i prawidłową klasyfikację pacjentów w 100% w RZS i 90% w ZZS. Wyniki badań przedstawiano na konferencjach międzynarodowych (Załącznik 3 część E – 4, 5), ale nie wchodzi one w skład cyklu publikacji lecz wskazują praktyczne wykorzystanie mojego dorobku w badaniach klinicznych. Badania są kontynuowane. Są to pierwsze badania tą metodą w zastosowaniu do różnicowania obu chorób. Badania z zastosowaniem metabolomiki w zastosowaniu do diagnostyki tylko RZS prowadził w Polsce i przedstawił w swojej pracy Ząbek i wsp. (66).

Badalam również możliwość zastosowania spektroskopii NMR i lipidomiki do różnicowania dwóch grup chorych. Byli to chorzy z dyslipidemią, u których rozwijała się wielonaczyniowa choroba wieńcowa lub ciężka stenoza aortalna. Nieznana jest przyczyna powodująca rozwój jednej lub drugiej choroby. Każda z tych chorób wymaga innego leczenia i wskazane jest szybkie postawienie prawidłowej diagnozy. Na podstawie przeprowadzonych badań własnych surowicy chorych (lipidomicznych) można stwierdzić, że możliwe jest rozróżnienie tych dwóch grup chorych. Wyniki przedstawione zostały na konferencjach międzynarodowej i krajowej (Załącznik 3 część E – 2, 50). Są to pierwsze badania tą metodą w tych grupach chorych. Wyniki tych badań nie wchodzi w skład cyklu publikacji, ale wskazują praktyczne wykorzystanie mojego osiągnięcia naukowego w badaniach klinicznych.

W czasie realizacji projektu w ramach sieci naukowej MNiSW „Farmakologiczna i genetyczna protekcja oraz cytoprotekcja w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego” (nr 28/E-32/SN-0053/2007, 2007-2009) prowadzone były badania ekstraktów związków hydrofilowych i hydrofobowych hipokampa szczura. Wyniki badań przedstawiono w publikacji (Załącznik 3 część B – 3) oraz na konferencji (Załącznik 3 część E – 45), nie wchodzi one jednak w skład cyklu publikacji, ale również wskazują praktyczne wykorzystanie mojego dorobku w badaniach biologicznych.

Podsumowując dotychczasowe wyniki badań własnych, można potwierdzić, że metabolomika wykorzystująca spektroskopię NMR, wraz z przygotowaną dedykowaną własną aplikacją, może być stosowana w badaniach dowolnego medium m.in. surowicy, płynu mózgowo-rdzeniowego, żółci, moczu czy ekstraktów tkanek. Metoda pozwala na zbudowanie modelu klasteryzacji, który umożliwia rozróżnianie osób potencjalnie chorych od zdrowych lub podziału osób chorych na dowolną liczbę grup, klasyfikowanych według wybranych kryteriów np. płci, wieku, różnych postaci choroby, dodatkowych badań klinicznych, zastosowanej terapii itp. Wybranie spośród badanych osób potencjalnie chorych, pozwala na dalszą szczegółową diagnostykę tylko tej grupy, podczas gdy pozostali mogą pozostać pod dalszą obserwacją lekarską lub ich diagnostyka może być prowadzona w kierunku innych chorób. Rozróżnienie

grup chorych pozwala również na indywidualny dobór terapii – tzw. terapię spersonalizowaną. Dodatkowo, badania metabolomiczne wskazują także potencjalne biomarkery patomechanizmów. Badania własne prowadzone z wykorzystaniem płynu stawowego wskazały biomarkery takie jak: pirogronian, octan, lizyna, glutaminian (Glu) i glutamina (Gln), cholina, cytrulina, cytrynian (Załącznik 3 część E – 4, 5). Biomarkery te zostały już wcześniej zbadane pojedynczo przez różne grupy badawcze, potwierdzając ich znaczenie z obu badanych przeze mnie chorobach stawów (67-69). Wydaje się, że może to być potwierdzeniem przydatności metabolomiki do celów diagnostycznych i poszukiwania biomarkerów patomechanizmów.

Wszystkie badania prowadzone w ramach opisywanego zagadnienia habilitacyjnego, będącego moim osiągnięciem naukowym, ukierunkowane były na opracowanie nowoczesnej metody pozwalającej na szybką, wstępną diagnostykę – *fingerprint*. Ma to znaczenie dla chorób szczególnie trudnych diagnostycznie, np. sarkoidozy (Załącznik 3 część E – 1, 46, 51) czy SLA (**B8**). Technika ta znalazła zastosowanie między innymi w badaniach wrodzonych chorób metabolicznych, badaniach odrzucania przeszczepionego narządu, toksykologii, diagnostyce i prognostyce chorób, skuteczności działania leków i stanie odżywienia (16;72-95). Podjęta przeze mnie tematyka badawcza jest ważna i stale aktualna, znajdując coraz szersze zainteresowanie wśród klinicystów w diagnostyce klinicznej, jak również w badaniach podstawowych – w poszukiwaniu patomechanizmów. Obecnie w badaniach patomechanizmów dąży się do połączenia metabolomiki, proteomiki, genomiki i transkryptomiki. Żadna z tych metod osobno nie wyjaśnia w pełni patomechanizmów, chociaż może być stosowana jako *fingerprint*. Łącząc informacje otrzymane z analizy profilu metabolicznego z uzyskanymi z badań genetycznych, transkryptomiki i proteomiki można lepiej zrozumieć mechanizmy choroby czy toksyczności leków. Metodyka badawcza, metabolomika wykorzystująca spektroskopię NMR, zaproponowana i wykorzystana w badaniach własnych, oraz opracowane na jej potrzeby procedury badawcze zostały pozytywnie zweryfikowane w wielu zastosowaniach klinicznych i biomedycznych dla różnych rodzajów badanych mediów – płynów ustrojowych i ekstraktów tkanek.

Najważniejszymi osiągnięciami naukowymi badań własnych z wykorzystaniem spektroskopii NMR w badaniach metabolomicznych są opracowania:

- ❖ metodyki badań próbek kliniczno-biologicznych, w tym:
 - a. opracowanie protokołów pobierania i przechowywania próbek,
 - b. metody ekstrakcji związków hydrofobowych i hydrofilowych z próbki,
 - c. dobranie sekwencji impulsów i ich parametrów do pomiarów widm NMR.

- ❖ aplikacji komputerowej *NMRanalysis* do analizy widm NMR próbek kliniczno-biologicznych zawierająca:
 - a. normalizację amplitud sygnałów metabolitów do amplitudy sygnału substancji wzorcowej,
 - b. korektę linii podstawowej,
 - c. redukcję danych metodą selekcji metabolitów,
 - d. analizę widm protonowych i fosforowych,
 - e. analizę widm zarówno związków hydrofilowych jak i hydrofobowych.
- ❖ modeli do stworzenia *fingerprintu* bazującego na badaniach metabolomicznych z wykorzystaniem spektroskopii NMR, do zastosowania we wczesnej diagnostyce klinicznej i do terapii spersonalizowanej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Do roku 1994, tj. do czasu uzyskania stopnia doktora, zajmowałam się zjawiskiem NMR i jego wykorzystaniem w diagnostyce medycznej. Początkowo uczestniczyłam w pracach zespołu pracującego nad konstrukcją przepływomierza wykorzystującego zjawisko NMR. Wyniki prac przedstawione zostały na konferencjach, także jeszcze po uzyskaniu stopnia doktora (Załącznik 3 część E – 8, 13, 41). Urządzenie dokonywało pomiaru zarówno prędkości przepływu płynu poza ustrojem, jak również czasu relaksacji T_1 medium. Pomiar czasu relaksacji T_1 wykorzystano do oceny zmian składu płynu przepływającego w rurkach. Urządzenie pracowało w polu magnetycznym magnezu stałego (ok. 200 mT) i wykorzystywane było do badań różnic składu biochemicznego przepływających płynów. Ocena możliwości wykorzystania tej metody do różnicowania własności fizykochemicznych płynów w warunkach dynamicznych, w czasie przepływu płynu w rurce, stanowiły tezy mojej rozprawy doktorskiej. Po uzyskaniu stopnia doktora zajęłam się spektroskopią NMR wysokiej rozdzielczości i jej zastosowaniem do badań biochemicznych płynów ustrojowych.

W roku 1997, w czasie pracy w IBIB PAN i w szpitalu klinicznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, we współpracy z IMDiK PAN wykonywałam badania uszkodzonego doświadczalnie mózgu szczura (niedokrwienie jednej półkuli mózgu). W badaniach tych wykorzystywałam rentgenowską tomografię komputerową (CT) wykonując obrazowanie mózgu szczura. Opracowałam procedurę badawczą, polegającą na dopasowaniu parametrów ekspozycji do badań mózgu szczura oraz przeprowadziłam analizę porównawczą obu półkul mózgu w celu określenia zakresu i wielkości zmian wywołanych niedokrwieniem.

Obecnie we współpracy z IMDiK PAN biorę udział w badaniach:

- (i) neurotoksyczności nanocząstek srebra (prace w toku) oraz neurotoksyczności tetrabromobisfenolu A (Załącznik 3 część B – 1, 2, 8, 9),
- (ii) oddziaływania syntetycznych bastadyn na receptory rianodynowe (Załącznik 3 część B – 4),
- (iii) zmian w stężeniach wybranych interleukin w surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona (Załącznik 3 część B – 3).

Uczestniczę również w pracach zespołu w IBIB PAN, który zajmuje się zastosowaniem obrazowania fluorescencyjnego w badaniach klinicznych. Badania te wykorzystują czasowo-rozdzielczą spektroskopię w bliskiej podczerwieni oraz optyczny środek kontrastowy ICG, który podany pacjentowi dożylnie napływa wraz z krwią do mózgu. Jest to nieinwazyjna technika optyczna pozwalająca wyznaczyć szybkość napływu optycznego środka kontrastowego i jego klirens, który daje informacje o perfuzji. Zmiany perfuzji w półkulach mózgu pozwalają na różnicowanie chorej i zdrowej. Badania przepływu krwi z wykorzystaniem ICG pokazały, że metoda obrazowania fluorescencyjnego pozwala na różnicowanie grup chorych: ze śmiercią mózgu, obrzękiem, uszkodzoną barierą krew-mózg i grupą kontrolną. Wyniki przedstawiono w publikacjach (Załącznik 3 część B – 5, 6, 7) i doniesieniach konferencyjnych (Załącznik 3 część E – 5-7, 22, 23, 47-49).

Informacje uzupełniające o pracach badawczych:

- kierowanie jednym projektem badawczym (Załącznik 3 część D - 1),
- udział jako główny wykonawca lub wykonawca w trzech projektach badawczych i trzech sieciach naukowych,
- opiekun naukowy pięciu prac magisterskich, w tym jednej jako promotor.

Efektom mojej pracy naukowej są 22 publikacje w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o łącznym IF = 35.458 oraz 51 doniesień prezentowanych na krajowych i międzynarodowych zjazdach i sympozjach naukowych, publikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o łącznym IF = 32.736. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) wynosi 155 (144), w tym 140 (132) bez autocytowań, a indeks Hirscha według bazy WoS wynosi 7.

Wykonałam też 134 ekspertyzy projektów medycznych i biologicznych, z których realizacja 68 była przeze mnie nadzorowana. Uczestniczyłam, jako ekspert, w czterech komisjach przetargowych dotyczących zakupu kardioangiografów oraz 68 innych komisjach przetargowych.

Literatura

- (1) Zielinski W, Rajca A. Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych. WNT; 1995.
- (2) Clarke CJ, Haselden JN. Metabolic Profiling as a Tool for Understanding Mechanisms of Toxicity. *Toxicologic Pathology* 2008 Jan;36(1):140-7.
- (3) Petroff OA, Rothman DL. Measuring human brain GABA in vivo: effects of GABA-transaminase inhibition with vigabatrin. *Mol Neurobiol* 1998 Feb;16(1):97-121.
- (4) Garseth M, Sonnewald U, White LR, Rod M, Zwart JA, Nygaard O, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy of cerebrospinal fluid in neurodegenerative disease: indication of glial energy impairment in Huntington chorea, but not Parkinson disease. *J Neurosci Res* 2000 Jun 15;60(6):779-82.
- (5) Wevers RA, Engelke U, Heerschap A. High-resolution ¹H-NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. *Clin Chem* 1994 Jul;40(7 Pt 1):1245-50.
- (6) Bajhaiya AK, Dean AP, Driver T, Trivedi DK, Rattray NJ, Allwood JW, et al. High-throughput metabolic screening of microalgae genetic variation in response to nutrient limitation. *Metabolomics* 2016;12(1):9.
- (7) Frohnert BI, Rewers MJ. Metabolomics in childhood diabetes. *Pediatr Diabetes* 2016 Feb;17(1):3-14.
- (8) Milan AM, Nuora A, Pundir S, Pileggi CA, Markworth JF, Linderborg KM, et al. Older adults have an altered chylomicron response to a high-fat meal. *Br J Nutr* 2016 Jan 15;119(1):1-9.
- (9) Overgaard AJ, Weir JM, De Souza DP, Tull D, Haase C, Meikle PJ, et al. Lipidomic and metabolomic characterization of a genetically modified mouse model of the early stages of human type 1 diabetes pathogenesis. *Metabolomics* 2016;12(1):13.
- (10) Perreault L, Starling AP, Glueck D, Brozinick JT, Sanders P, Siddall P, et al. Biomarkers of Ectopic Fat Deposition: The Next Frontier in Serum Lipidomics. *J Clin Endocrinol Metab* 2016 Jan;101(1):176-82.
- (11) Wagstaff JL, Masterton RJ, Povey JF, Smales CM, Howard MJ. (¹H) NMR spectroscopy profiling of metabolic reprogramming of Chinese hamster ovary cells upon a temperature shift during culture. *PLoS One* 2013;8(10):e77195.
- (12) Jana SK, Dutta M, Joshi M, Srivastava S, Chakravarty B, Chaudhury K. ¹H NMR based targeted metabolite profiling for understanding the complex relationship connecting oxidative stress with endometriosis. *Biomed Res Int* 2013;2013:329058.
- (13) Srivastava NK, Pradhan S, Mittal B, Gowda GA. High resolution NMR based analysis of serum lipids in Duchenne muscular dystrophy patients and its possible diagnostic significance. *NMR Biomed* 2010 Jan;23(1):13-22.
- (14) Srivastava NK, Pradhan S, Gowda GA, Kumar R. In vitro, high-resolution ¹H and ³¹P NMR based analysis of the lipid components in the tissue, serum, and CSF of the patients with primary brain tumors: one possible diagnostic view. *NMR Biomed* 2010 Feb;23(2):113-22.
- (15) Weckwerth W, Morgenthal K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov Today* 2005 Nov 15;10(22):1551-8.
- (16) Lauri I, Savorani F, Iaccarino N, Zizza P, Pavone LM, Novellino E, et al. Development of an Optimized Protocol for NMR Metabolomics Studies of Human Colon Cancer Cell Lines and First Insight from Testing of the Protocol Using DNA G-Quadruplex Ligands as Novel Anti-Cancer Drugs. *Metabolites* 2016;6(1).

- (17) Rocca-Serra P, Salek RM, Arita M, Correa E, Dayalan S, Gonzalez-Beltran A, et al. Data standards can boost metabolomics research, and if there is a will, there is a way. *Metabolomics* 2016;12(1):14.
- (18) Gralka E, Luchinat C, Tenori L, Ernst B, Thurnheer M, Schultes B. Metabolomic fingerprint of severe obesity is dynamically affected by bariatric surgery in a procedure-dependent manner. *Am J Clin Nutr* 2015 Dec;102(6):1313-22.
- (19) Dubey A, Rangarajan A, Pal D, Atreya HS. Chemical Shifts to Metabolic Pathways: Identifying Metabolic Pathways Directly from a Single 2D NMR Spectrum. *Anal Chem* 2015 Dec 15;87(24):12197-205.
- (20) Bouhifd M, Beger R, Flynn T, Guo L, Harris G, Hogberg H, et al. Quality assurance of metabolomics. *ALTEX* 2015;32(4):319-26.
- (21) de Graaf RA, Prinsen H, Giannini C, Caprio S, Herzog RI. Quantification of H NMR Spectra from Human Plasma. *Metabolomics* 2015 Dec;11(6):1702-7.
- (22) Doscokcz M, Marchewka Z, Jez M, Passowicz-Muszynska E, Dlugosz A. Preliminary Study on J-Resolved NMR Method Usability for Toxic Kidney's Injury Assessment. *Adv Clin Exp Med* 2015 Jul;24(4):629-35.
- (23) Mickiewicz B, Kelly JJ, Ludwig TE, Weljie AM, Wiley JP, Schmidt TA, et al. Metabolic analysis of knee synovial fluid as a potential diagnostic approach for osteoarthritis. *J Orthop Res* 2015 Nov;33(11):1631-8.
- (24) Balsgart NM, Mulbjerg M, Guo Z, Bertelsen K, Vosegaard T. High Throughput Identification and Quantification of Phospholipids in Complex Mixtures. *Anal Chem* 2016 Feb 16;88(4):2170-6.
- (25) Ravanbakhsh S, Liu P, Bjorndahl TC, Mandal R, Grant JR, Wilson M, et al. Accurate, fully-automated NMR spectral profiling for metabolomics. *PLoS One* 2015;10(5):e0124219.
- (26) Ludwig C, Gunther UL. MetaboLab--advanced NMR data processing and analysis for metabolomics. *BMC Bioinformatics* 2011;12:366.
- (27) Kuliszkiwicz-Janus M, Baczynski S. Treatment-induced changes in 31P-MRS (magnetic resonance spectroscopy) spectra of sera from patients with acute leukemia. *Biochim Biophys Acta* 1997 Feb 27;1360(1):71-83.
- (28) Kuliszkiwicz-Janus M, Janus W, Baczynski S. Application of 31P NMR spectroscopy in clinical analysis of changes of serum phospholipids in leukemia, lymphoma and some other non-haematological cancers. *Anticancer Res* 1996 May;16(3B):1587-94.
- (29) Kuliszkiwicz-Janus M, Baczynski S. Application of 31P NMR spectroscopy to monitor chemotherapy-associated changes of serum phospholipids in patients with malignant lymphomas. *Magn Reson Med* 1996 Apr;35(4):449-56.
- (30) Kuliszkiwicz-Janus M, Baczynski S. Chemotherapy-associated changes in 31P MRS spectra of sera from patients with multiple myeloma. *NMR Biomed* 1995 May;8(3):127-32.
- (31) Wishart DS, Lewis MJ, Morrissey JA, Flegel MD, Jeroncik K, Xiong YP, et al. The human cerebrospinal fluid metabolome. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2008 Aug 15;871(2):164-73.
- (32) Conti F, Manganaro M, Miccheli A. Metabolomics and medical practice. *Clin Ter* 2006 Nov;157(6):549-52.
- (33) Serkova NJ, Zhang Y, Coatney JL, Hunter L, Wachs ME, Niemann CU, et al. Early detection of graft failure using the blood metabolic profile of a liver recipient. *Transplantation* 2007 Feb 27;83(4):517-21.
- (34) Daykin CA, Wuelfert F. *NMR Spectroscopy Based Metabonomics: Current Technology and Application*. Bentham Science Publisher Ltd.; 2006. p. 151-73.

- (35) Villas-Bôas SG, Roessner U. *Metabolome Analysis. An Introduction*. John Wiley & Sons, Inc.; 2006.
- (36) Sakka SG, Reinhart K, Wegscheider K, Meier-Hellmann A. Comparison of cardiac output and circulatory blood volumes by transpulmonary thermo-dye dilution and transcutaneous indocyanine green measurement in critically ill patients. *Chest* 2002 Feb;121(2):559-65.
- (37) Obrig H, Steinbrink J. Non-invasive optical imaging of stroke. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 2011 Nov 28;369(1955):4470-94.
- (38) Weigl W, Milej D, Gerega A, Toczyłowska B, Kacprzak M, Sawosz P, et al. Assessment of cerebral perfusion in post-traumatic brain injury patients with the use of ICG-bolus tracking method. *Neuroimage* 2014 Jan 15;85 Pt 1:555-65.
- (39) Gerega A, Milej D, Weigl W, Botwicz M, Zolek N, Kacprzak M, et al. Multiwavelength time-resolved detection of fluorescence during the inflow of indocyanine green into the adult's brain. *J Biomed Opt* 2012 Aug;17(8):087001.
- (40) Milej D, Gerega A, Zolek N, Weigl W, Kacprzak M, Sawosz P, et al. Time-resolved detection of fluorescent light during inflow of ICG to the brain-a methodological study. *Phys Med Biol* 2012 Oct 21;57(20):6725-42.
- (41) Gerega A, Zolek N, Soltysinski T, Milej D, Sawosz P, Toczyłowska B, et al. Wavelength-resolved measurements of fluorescence lifetime of indocyanine green. *J Biomed Opt* 2011 Jun;16(6):067010.
- (42) Saikia P, Maisch T, Kobuch K, Jackson TL, Baumler W, Szeimies RM, et al. Safety testing of indocyanine green in an ex vivo porcine retina model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 Nov;47(11):4998-5003.
- (43) Prince MR, Lee HG, Lee CH, Youn SW, Lee IH, Yoon W, et al. Safety of gadobutrol in over 23,000 patients: the GARDIAN study, a global multicentre, prospective, non-interventional study. *Eur Radiol* 2016 Mar 9.
- (44) Gutierrez JE, Rosenberg M, Seemann J, Breuer J, Haverstock D, Agris J, et al. Safety and Efficacy of Gadobutrol for Contrast-enhanced Magnetic Resonance Imaging of the Central Nervous System: Results from a Multicenter, Double-blind, Randomized, Comparator Study. *Magn Reson Insights* 2015;8:1-10.
- (45) Wack C, Steger-Hartmann T, Mylecraine L, Hofmeister R. Toxicological safety evaluation of gadobutrol. *Invest Radiol* 2012 Nov;47(11):611-23.
- (46) Rotermund F, Weigand R, Penzkofer A. J-aggregation and disaggregation of indocyanine green in water. *Chem Phys* 1997 Aug 1;220(3):385-92.
- (47) Weigand R, Rotermund F, Penzkofer A. Aggregation dependent absorption reduction of indocyanine green. *J Phys Chem A* 1997 Oct 16;101(42):7729-34.
- (48) Zhou JF, Chin MP, Schafer SA. Aggregation and degradation of indocyanine green. *SPIE* 1994;2128:495-505.
- (49) McAdoo DJ, Hughes MG, Nie L, Shah B, Clifton C, Fullwood S, et al. The effect of glutamate receptor blockers on glutamate release following spinal cord injury. Lack of evidence for an ongoing feedback cascade of damage --> glutamate release --> damage --> glutamate release --> etc. *Brain Res* 2005;1038(1):92-9.
- (50) Wagner AK, Bayir H, Ren D, Puccio A, Zafonte RD, Kochanek PM. Relationships between cerebrospinal fluid markers of excitotoxicity, ischemia, and oxidative damage after severe TBI: the impact of gender, age, and hypothermia. *J Neurotrauma* 2004 Feb;21(2):125-36.
- (51) Mun JH, Lee H, Yoon D, Kim BS, Kim MB, Kim S. Discrimination of Basal Cell Carcinoma from Normal Skin Tissue Using High-Resolution Magic Angle Spinning 1H NMR Spectroscopy. *PLoS One* 2016;11(3):e0150328.

- (52) Cocco E, Murgia F, Loreface L, Barberini L, Poddighe S, Frau J, et al. (1)H-NMR analysis provides a metabolomic profile of patients with multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016 Feb;3(1):e185.
- (53) Zhang J, Zhong X, Li S, Zhang G, Liu X. Metabolic characterization of natural and cultured *Ophicordyceps sinensis* from different origins by 1H NMR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 2015 Nov 10;115:395-401.
- (54) Shahfiza N, Osman H, Hock TT, Shaari K, Abdel-Hamid AH. Metabolomics for characterization of gender differences in patients infected with dengue virus. *Asian Pac J Trop Med* 2015 Jun;8(6):451-6.
- (55) De Pascali SA, Del CL, Felling S, Mollo E, Terlizzi A, Fanizzi FP. 1H NMR Spectroscopy and MVA Analysis of *Diplodus sargus* Eating the Exotic Pest *Caulerpa cylindracea*. *Mar Drugs* 2015 Jun;13(6):3550-66.
- (56) Fauvelle F, Boccard J, Cavarec F, Depaulis A, Deransart C. Assessing Susceptibility to Epilepsy in Three Rat Strains Using Brain Metabolic Profiling Based on HRMAS NMR Spectroscopy and Chemometrics. *J Proteome Res* 2015 May 1;14(5):2177-89.
- (57) Zhou A, Ni J, Xu Z, Wang Y, Zhang H, Wu W, et al. Metabolomics specificity of tuberculosis plasma revealed by (1)H NMR spectroscopy. *Tuberculosis (Edinb)* 2015 May;95(3):294-302.
- (58) Kumar D, Gupta A, Mandhani A, Sankhwar SN. Metabolomics-derived prostate cancer biomarkers: fact or fiction? *J Proteome Res* 2015 Mar 6;14(3):1455-64.
- (59) Liu PF, Liu QH, Wu Y, Jie H. A pilot metabolic profiling study in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* with white spot syndrome virus based on (1)H NMR spectroscopy. *J Invertebr Pathol* 2015 Jan;124:51-6.
- (60) Deja S, Porebska I, Kowal A, Zabek A, Barg W, Pawelczyk K, et al. Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharm Biomed Anal* 2014 Nov;100:369-80.
- (61) Villasenor A, Kinross JM, Li JV, Penney N, Barton RH, Nicholson JK, et al. 1H NMR global metabolic phenotyping of acute pancreatitis in the emergency unit. *J Proteome Res* 2014 Dec 5;13(12):5362-75.
- (62) Wei DD, Wang JS, Wang PR, Li MH, Yang MH, Kong LY. Toxic effects of chronic low-dose exposure of thioacetamide on rats based on NMR metabolic profiling. *J Pharm Biomed Anal* 2014 Sep;98:334-8.
- (63) Deja S, Porebska I, Kowal A, Zabek A, Barg W, Pawelczyk K, et al. Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharm Biomed Anal* 2014 Nov;100:369-80.
- (64) Mlynarz P, Deja S, Stanimirova I, Zabek A, Barg W, Jankowska R. Metabolomics of chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea syndrome: response to Maniscalco and Motta. *Metabolomics* 2016;12:33.
- (65) Zabek A, Stanimirova I, Deja S, Barg W, Kowal A, Korzeniewska A, et al. Fusion of the 1H NMR data of serum, urine and exhaled breath condensate in order to discriminate chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea syndrome. *Metabolomics* 2015;11(6):1563-74.
- (66) Zabek A, Swierkot J, Malak A, Zawadzka I, Deja S, Bogunia-Kubik K, et al. Application of (1)H NMR-based serum metabolomic studies for monitoring female patients with rheumatoid arthritis. *J Pharm Biomed Anal* 2016 Jan 5;117:544-50.
- (67) Hitchon CA, El-Gabalawy HS, Bezabeh T. Characterization of synovial tissue from arthritis patients: a proton magnetic resonance spectroscopic investigation. *Rheumatol Int* 2009 Aug;29(10):1205-11.

- (68) Cillero-Pastor B, Martin MA, Arenas J, Lopez-Armada MJ, Blanco FJ. Effect of nitric oxide on mitochondrial activity of human synovial cells. *BMC Musculoskelet Disord* 2011;12:42.
- (69) Damyanovich AZ, Staples JR, Chan AD, Marshall KW. Comparative study of normal and osteoarthritic canine synovial fluid using 500 MHz ¹H magnetic resonance spectroscopy. *J Orthop Res* 1999 Mar;17(2):223-31.
- (70) Ibanez C, Cifuentes A, Simo C. Recent advances and applications of metabolomics to investigate neurodegenerative diseases. *Int Rev Neurobiol* 2015;122:95-132.
- (71) Krueger T. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications. *General Methods in Biomarker Research and their Applications*. Springer; 2015. p. 1031-52.
- (72) Wolohan SM, Hirt D, Glenn TC. *Translational Metabolomics of Head Injury: Exploring Dysfunctional Cerebral Metabolism with Ex Vivo NMR Spectroscopy-Based Metabolite Quantification*. 2015.
- (73) Pacchiarotta T, Deelder AM, Mayboroda OA. Metabolomic investigations of human infections. *Bioanalysis* 2012 May;4(8):919-25.
- (74) Patterson RE, Kalavalapalli S, Williams CM, Nautiyal M, Mathew JT, Martinez J, et al. Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016 Jan 26;ajpendo.
- (75) Bonneau E, Tetreault N, Robitaille R, Boucher A, De G, V. Metabolomics: Perspectives on potential biomarkers in organ transplantation and immunosuppressant toxicity. *Clin Biochem* 2016 Jan 12.
- (76) Amigo N, Mallol R, Heras M, Martinez-Hervas S, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC, et al. Lipoprotein hydrophobic core lipids are partially extruded to surface in smaller HDL: "Herniated" HDL, a common feature in diabetes. *Sci Rep* 2016;6:19249.
- (77) Gebregiworgis T, Nielsen HH, Massilamany C, Gangaplara A, Reddy J, Illes Z, et al. A Urinary Metabolic Signature for Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica. *J Proteome Res* 2016 Jan 27.
- (78) Lu J, Shi Y, Wang S, Chen H, Cai S, Feng J. NMR-based metabolomic analysis of *Haliotis diversicolor* exposed to thermal and hypoxic stresses. *Sci Total Environ* 2016 Mar 1;545-546:280-8.
- (79) Cocco E, Murgia F, Lorefice L, Barberini L, Poddighe S, Frau J, et al. (¹H)-NMR analysis provides a metabolomic profile of patients with multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016 Feb;3(1):e185.
- (80) Kaikkonen JE, Kresanov P, Ahotupa M, Jula A, Mikkila V, Viikari JS, et al. Longitudinal study of circulating oxidized LDL and HDL and fatty liver: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Free Radic Res* 2016 Jan 28;1-9.
- (81) Wu J, Domellof M, Zivkovic AM, Larsson G, Ohman A, Nording ML. NMR-based metabolite profiling of human milk: A pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. *Biochem Biophys Res Commun* 2016 Jan 15;469(3):626-32.
- (82) Chan AW, Mercier P, Schiller D, Bailey R, Robbins S, Eurich DT, et al. (¹H)-NMR urinary metabolomic profiling for diagnosis of gastric cancer. *Br J Cancer* 2016 Jan 12;114(1):59-62.
- (83) Casadei L, Valerio M. (¹H) NMR Metabolomic Footprinting Analysis for the In Vitro Screening of Potential Chemopreventive Agents. *Methods Mol Biol* 2016;1379:89-97.
- (84) Zhang B, Xie M, Bruschweiler-Li L, Bruschweiler R. Nanoparticle-Assisted Removal of Protein in Human Serum for Metabolomics Studies. *Anal Chem* 2016 Jan 5;88(1):1003-7.
- (85) Fotakis C, Zervou M. NMR metabolic fingerprinting and chemometrics driven authentication of Greek grape marc spirits. *Food Chem* 2016 Apr 1;196:760-8.

- (86) Arjmand M, Madrakian A, Khalili G, Najafi DA, Zamani Z, Akbari Z. Metabolomics-Based Study of Logarithmic and Stationary Phases of Promastigotes in *Leishmania major* by ¹H NMR Spectroscopy. *Iran Biomed J* 2016;20(2):77-83.
- (87) Diaz SO, Pinto J, Barros AS, Morais E, Duarte D, Negrao F, et al. Newborn Urinary Metabolic Signatures of Prematurity and Other Disorders: A Case Control Study. *J Proteome Res* 2016 Jan 4;15(1):311-25.
- (88) Blasco H, Nadal-Desbarats L, Pradat PF, Gordon PH, Madji HB, Patin F, et al. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: combining metabolomic and clinical parameters to define disease progression. *Eur J Neurol* 2016 Feb;23(2):346-53.
- (89) Zabek A, Swierkot J, Malak A, Zawadzka I, Deja S, Bogunia-Kubik K, et al. Application of (¹H) NMR-based serum metabolomic studies for monitoring female patients with rheumatoid arthritis. *J Pharm Biomed Anal* 2016 Jan 5;117:544-50.
- (90) Carrola J, Bastos V, Ferreira de Oliveira JM, Oliveira H, Santos C, Gil AM, et al. Insights into the impact of silver nanoparticles on human keratinocytes metabolism through NMR metabolomics. *Arch Biochem Biophys* 2016 Jan 1;589:53-61.
- (91) Buas MF, Gu H, Djukovic D, Zhu J, Drescher CW, Urban N, et al. Identification of novel candidate plasma metabolite biomarkers for distinguishing serous ovarian carcinoma and benign serous ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2016 Jan;140(1):138-44.
- (92) Andra SS, Austin C, Wright RO, Arora M. Reconstructing pre-natal and early childhood exposure to multi-class organic chemicals using teeth: Towards a retrospective temporal exposome. *Environ Int* 2015 Oct;83:137-45.
- (93) Mickiewicz B, Tam P, Jenne CN, Leger C, Wong J, Winston BW, et al. Integration of metabolic and inflammatory mediator profiles as a potential prognostic approach for septic shock in the intensive care unit. *Crit Care* 2015;19:11.
- (94) Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem* 2015 Jul;407(17):4879-92.
- (95) Motta A, Paris D, D'Amato M, Melck D, Calabrese C, Vitale C, et al. NMR metabolomic analysis of exhaled breath condensate of asthmatic patients at two different temperatures. *J Proteome Res* 2014 Dec 5;13(12):6107-20.

Beata Toczyłowska