

WNIOSEK PROJEKTU DOKTORSKIEGO
Szkoła Doktorska Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu

IMIĘ I NAZWISKO AUTORA PROJEKTU	dr hab. Małgorzata Maj, prof. UMK
AFILIACJA AUTORA PROJEKTU (jednostka organizacyjna, telefon kontaktowy, adres e-mail)	Katedra Urologii i Andrologii Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. A. Jurasza ul. M. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz
DYSCYPLINA NAUKOWA, W RAMACH KTÓREJ PROJEKT BĘDZIE REALIZOWANY (zaznaczyć właściwą)	☐ NAUKI FARMACEUTYCZNE ☒ NAUKI MEDYCZNE ☐ NAUKI O ZDROWIU

CZĘŚĆ A:
OPIS PROJEKTU

1. TEMAT PROJEKTU:
Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w glejaku - badania na modelach eksperymentalnych i materiale klinicznym
2. STRESZCZENIE PROJEKTU (max. 1000 znaków ze spacjami):
Glejaki charakteryzują się znaczną heterogennością biologiczną, zdolnością do naciekania otaczających tkanek oraz niekorzystnym rokowaniem. Obecnie stosowane metody diagnostyczne i monitorujące, w tym badania obrazowe oraz analiza materiału pooperacyjnego, nie pozwalają w pełni odzwierciedlić dynamicznych zmian zachodzących w guzie. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs, extracellular vesicles), w tym egzosomy, przenoszą białka, kwasy nukleinowe i lipidy, które mogą odzwierciedlać stan komórek nowotworowych. Celem projektu będzie analiza pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z modeli <i>in vitro</i> glejaka oraz płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów jako potencjalnego źródła biomarkerów. Projekt obejmie badania na liniach ustalonych, pierwotnych liniach komórkowych pochodzących od pacjentów oraz materiale klinicznym. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do wytypowania kandydatów na biomarkery wspierające diagnostykę, ocenę rokowania i monitorowanie przebiegu glejaków.
3. CEL NAUKOWY PROJEKTU I ZNACZENIE PODJĘTEGO PROBLEMU BADAWCZEGO (max. 3000 znaków ze spacjami):
Celem naukowym projektu jest ocena potencjału pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych z modeli komórkowych glejaka oraz materiału pochodzącego od pacjentów jako źródła biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych [1,2]. Glejaki, w tym glejak wielopostaciowy, należą do najbardziej agresywnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Charakteryzują się wysoką heterogennością, naciekającym wzrostem i niekorzystnym rokowaniem. Pomimo postępu w diagnostyce i leczeniu monitorowanie przebiegu choroby oraz ocena odpowiedzi na terapię pozostają wyzwaniem klinicznym. Rezonans magnetyczny oraz analiza materiału tkankowego pozyskanego podczas zabiegu operacyjnego

dostarczają ważnych informacji, jednak nie odzwierciedlają w pełni dynamicznych zmian molekularnych zachodzących w guzie [1,3].

Projekt koncentruje się na pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, w tym egzosomach, uwalnianych przez komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i obecnych w płynach biologicznych, m.in. we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym. Ich ładunek molekularny, obejmujący białka, kwasy nukleinowe, lipidy i metabolity, może odzwierciedlać cechy komórek, z których pochodzą. W glejakach EVs mogą uczestniczyć w komunikacji międzykomórkowej, modulowaniu mikrośrodowiska guza, angiogenezie, progresji choroby oraz oporności na leczenie [1]. Z tego względu mogą stanowić narzędzie płynnej biopsji, umożliwiające mniej inwazyjną i powtarzalną ocenę biologii nowotworu [4].

Podstawowym założeniem projektu jest porównanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z modeli glejaka o narastającym stopniu złożoności biologicznej. W pierwszym etapie badania zostaną przeprowadzone na ustalonych liniach glejakowych, co pozwoli na optymalizację procedur izolacji i charakterystyki pęcherzyków. Następnie projekt zostanie rozszerzony o pierwotne linie komórkowe pochodzące od pacjentów, które lepiej odzwierciedlają heterogenność glejaków niż klasyczne linie komórkowe. W kolejnym etapie planowana jest analiza pęcherzyków z modeli 3D/organoidów pacjenckich oraz materiału biologicznego pacjentów, ze szczególnym uwzględnieniem płynu mózgowo-rdzeniowego. Modele 3D pozwalają zachować część cech fenotypowych i molekularnych guza pierwotnego, w tym jego heterogenność oraz interakcje międzykomórkowe [5].

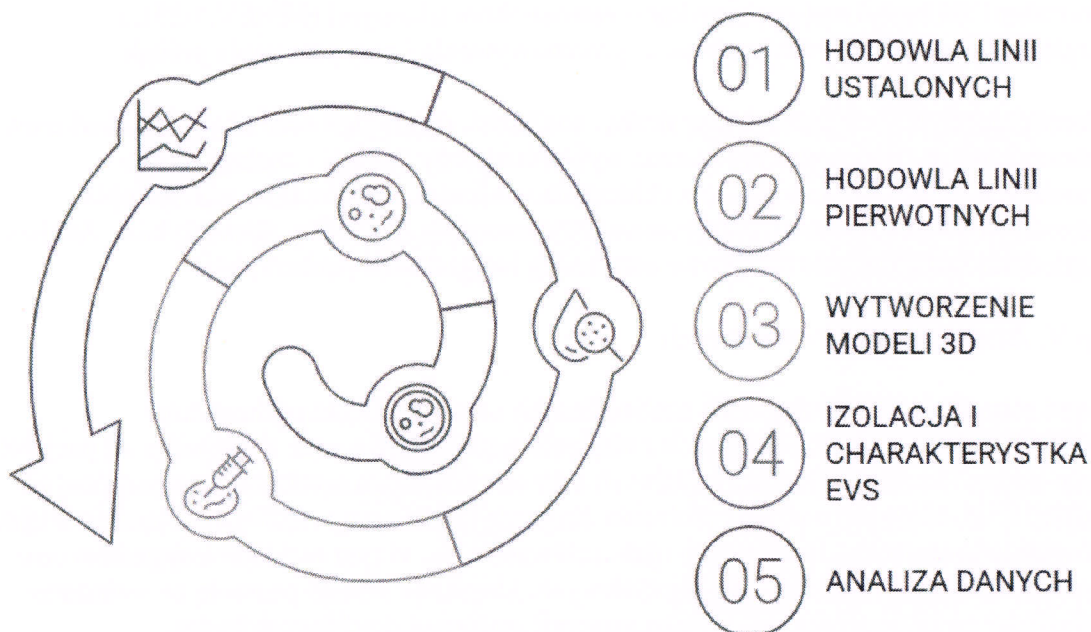
Badania będą obejmowały izolację, charakterystykę i analizę molekularną pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Ocenione zostaną ich podstawowe parametry, takie jak liczba, wielkość, morfologia oraz obecność markerów EVs. Szczególna uwaga zostanie poświęcona zachowaniu spójności i powtarzalności procedur pracy z EVs, ponieważ sposób pobrania, przechowywania, izolacji i charakterystyki materiału ma kluczowe znaczenie dla wiarygodności wyników [2].

Projekt ma na celu dostarczenie nowej wiedzy na temat roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w biologii glejaków oraz ocenę ich przydatności jako źródła biomarkerów. Uzyskane dane mogą przyczynić się do wytypowania kandydatów na biomarkery przydatne w diagnostyce, ocenie rokowania i monitorowaniu przebiegu choroby.

[1] Del Bene M. i wsp. Extracellular vesicles: The key for precision medicine in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 2022 [2] Crescitelli R. i wsp. Recommendations for Studying In Situ Extracellular Vesicles From Solid Tissue. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2025 [3] EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020 [4] Théry C. i wsp. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2023 (MISEV2023): updated guidelines of the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2023 [5] Alsalkini M. i wsp. Cultivating Ex Vivo Patient-Derived Glioma Organoids Using a Tissue Chopper. *Journal of Visualized Experiments*, 2024

4. KONCEPCJA I PLAN BADAŃ Z UWZGLĘDNIENIEM METODYKI (max. 4000 znaków ze spacjami):

Badania będą realizowane etapowo, z wykorzystaniem modeli o narastającym stopniu złożoności biologicznej, tj. od ustalonych linii komórkowych glejaka, przez pierwotne linie pochodzące od pacjentów, modele 3D/organoidy, aż po materiał biologiczny od pacjentów. Takie podejście pozwoli porównać pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzące z różnych modeli choroby oraz ocenić ich przydatność jako źródła biomarkerów.



Etap I: Hodowla ustalonych linii komórkowych glejaka

W pierwszym etapie wykorzystane zostaną ustalone linie komórkowe glejaka hodowane w standardowych warunkach *in vitro*. Po osiągnięciu odpowiedniej konfluencji zbierane będzie medium kondycjonowane przeznaczone do dalszych etapów izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Etap ten posłuży do optymalizacji procedur pracy z EVs oraz ustanowienia punktu odniesienia dla bardziej złożonych modeli biologicznych. Równolegle prowadzona będzie ocena stanu komórek produkujących pęcherzyki, obejmująca żywotność, apoptozę/nekrozę oraz ekspresję wybranych markerów fenotypowych, w celu kontroli jakości materiału wyjściowego.

Etap II: Hodowla pierwotnych linii komórkowych pochodzących od pacjentów

W kolejnym etapie badania zostaną rozszerzone o pierwotne linie komórkowe pochodzące od pacjentów z gleziakiem. Linie te będą hodowane w warunkach sprzyjających zachowaniu cech biologicznych pierwotnych komórek glejaka, z wykorzystaniem odpowiednio przygotowanych powierzchni hodowlanych oraz pożywek wzbogaconych w czynniki wzrostowe. Pozwoli to na analizę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z modeli lepiej odzwierciedlających heterogenność biologiczną glejaków niż klasyczne linie ustalone.

Etap III: Wytworzenie modeli trójwymiarowych / organoidów

Jeżeli dostępny będzie odpowiedni materiał operacyjny, planowane jest wytworzenie modeli trójwymiarowych, w tym organoidów, z materiału pochodzącego od pacjentów. Modele 3D umożliwiają częściowe odtworzenie architektury guza oraz interakcji międzykomórkowych niedostępnych w hodowlach dwuwymiarowych. Na tym etapie oceniona zostanie możliwość pozyskania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z pożywek kondycjonowanych przez organoidy oraz porównania ich profilu z EVs uzyskanymi z modeli 2D.

Etap IV: Izolacja i charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pozyskane z medium kondycjonowanego pochodzącego z hodowli 2D, pierwotnych linii komórkowych, modeli 3D oraz z materiału biologicznego pacjentów (płyn mózgowo-rdzeniowy, a w miarę dostępności również krew obwodowa) zostaną

poddane izolacji oraz charakterystyce. Izolacja EVs będzie prowadzona zgodnie z aktualnymi zaleceniami dla badań nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (MISEV2023), z uwzględnieniem standaryzacji pobrania, przechowywania i przygotowania próbek.

Charakterystyka EVs obejmie ocenę liczby, wielkości, morfologii oraz obecności markerów pęcherzykowych. Wykorzystane zostaną wybrane metody izolacji i analizy, w tym ultrawiórowanie lub chromatografia wykluczania wielkości, western blot, mikroskopia elektronowa oraz cytometria przepływowa przystosowana do analizy pęcherzyków. Analizy uwzględniać będą kontrole izotypowe oraz ocenę integralności pęcherzyków

Etap V: Analiza porównawcza danych

Ostatni etap obejmie porównawczą analizę danych uzyskanych dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z różnych modeli glejaka oraz z materiału od pacjentów. Celem będzie identyfikacja cech wspólnych oraz różnicujących pomiędzy poszczególnymi źródłami EVs, istotnych z punktu widzenia diagnostyki lub oceny rokowania. Analiza obejmie porównanie parametrów ilościowych i jakościowych EVs, w tym rozkładów sygnałów oraz ekspresji wybranych markerów pęcherzykowych. Uzyskane wyniki pozwolą na wskazanie kandydatów na biomarkery, które mogą stanowić podstawę do dalszych badań.

5. SPODZIEWANE ZNACZENIE WYNIKÓW BADAŃ Z OKREŚLENIEM WPŁYWU NA ROZWÓJ DYSCYPLINY (max. 1500 znaków ze spacjami):

Spodziewanym efektem projektu będzie uzyskanie nowych danych dotyczących pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki glejaka oraz obecnych w materiale biologicznym pacjentów. Wyniki pozwolą na lepsze zrozumienie różnic i podobieństw pomiędzy pęcherzykami pochodzącymi z różnych modeli choroby, co ma istotne znaczenie dla interpretacji badań nad rolą mikropęcherzyków w biologii glejaków.

Uzyskane dane mogą przyczynić się do identyfikacji kandydatów na biomarkery, które w przyszłości mogłyby wspierać diagnostykę, ocenę rokowania oraz monitorowanie odpowiedzi na leczenie. Ma to szczególne znaczenie w glejakach, w których klasyczne metody diagnostyczne nie zawsze pozwalają na pełną ocenę heterogenności guza i jego zmian molekularnych w czasie.

Projekt wniesie wkład w rozwój neuroonkologii, biologii nowotworów oraz badań nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi, dostarczając danych porównawczych dotyczących pęcherzyków pochodzących z modeli *in vitro*, modeli trójwymiarowych oraz materiału pacjenckiego. Wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań translacyjnych oraz rozwoju mniej inwazyjnych strategii monitorowania przebiegu glejaków.

6. PLANOWANA FORMA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

☒ **MANUSKRYPT** – tradycyjna forma rozprawy nieopublikowanej

☐ **CYKL PUBLIKACJI** – spójny tematycznie zbiór opublikowanych artykułów

☐ **TRYB HYBRYDOWY** – spójny tematycznie zbiór opublikowanych artykułów i nieopublikowanych manuskryptów