



Cel naukowy projektu. Zachorowalność na raka jest problemem globalnym; według GLOBOCAN do 2040 r. osiągnie 28,4 mln pacjentów na całym świecie. Wśród nowotworów powodujących zgon, **guzy gruczołów ślinowych** (SGTs) są trudne do zdiagnozowania ze względu na ich stochastyczny charakter, heterogeniczną histopatologię i różnorodność genetyczną (różnorodność jednostek i podtypów). Dlatego też opracowanie nowatorskiego podejścia diagnostycznego poprzez połączenie skutecznych metod wykrywania/diagnozowania raka i metod leczenia do zastosowań klinicznych stanowi ogromną potrzebę i wyzwanie. Proponujemy alternatywne podejście do diagnostyki oparte na technice powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana (SERS), jako metodzie wykrywania i aptamerach jako elementach rozpoznających do analizy egzosomów pochodzących z guzów gruczołów ślinowych a badanych w krwi i ślinie. Egzosomy odzwierciedlają stan fenotypowy komórek i ich potencjał przerzutowy, co czyni je kluczowymi biomarkerami wykrywania i leczenia nowotworów. Opracowanie nowej metody izolacji i kompleksowego badania **egzosomów** (EVs) i białek egzosomalnych guzów gruczołów ślinowych jest celem badań prowadzonych w projekcie. Spektroskopia SERS, która ma wyjątkową zaletę szybkiego wykrywania istotnych klinicznie zmian, wysoką czułość i selektywność oznaczeń w krótkim czasie przy jednoczesnym ograniczeniu użycia drogich odczynników ma szansę przewyższyć ograniczenia obecnie stosowanych metod do analizy EVs a tym samym odpowiedzieć na potrzeby medycyny.

Metodologia badań. Projekt jest *interdyscyplinarny*, a jego *innowacyjny charakter* polega na opracowaniu nowych DEP/SERS-aptasensorów do izolacji/wychwytywania EVs z próbek krwi i śliny oraz ich charakterystyki molekularnej, po raz pierwszy za pomocą jednej technologii. W kolejnych etapach realizacji projektu zaprojektujemy i scharakteryzujemy nanostruktury aktywne do pomiarów SERS oraz zoptymalizujemy je pod kątem czułości, powtarzalności i stabilności rejestrowanych sygnałów. Ich morfologia zostanie zwizualizowana za pomocą technik AFM i SEM a pomiary XPS posłużą do ich analizy chemicznej. W ramach badań zaprojektujemy i zsyntetyzujemy aptamery o wysokim powinowactwie do wybranych białek egzosomalnych. Technika BLI, modelowanie strukturalne oraz dokowanie molekularne zostaną zastosowane w badaniach interakcji aptamer-egzom. Następnie opracujemy nową metodę izolacji i analizy egzosomów SGTs czyli SERS-DEP (Lab-on-Chip). Dielektroforeza pozwoli na izolację egzosomów od innych składników płynów i ich osadzenie na opracowanych platformach do badań SERS. Aby ocenić warunki, w których efekt izolacji i depozycji egzosomów będzie optymalny, przeprowadzone zostaną obliczenia numeryczne. We współpracy z naszymi partnerami przeprowadzimy pomiary fluorescencji, aby zbadać specyficzne właściwości biochemiczne pęcherzyków i zweryfikować skuteczność ich izolacji. Moduł SERS/DEP zostanie zaprogramowany zarówno do bezpośrednich (bezznacznikowych) jak i pośrednich (znakowanych) strategii do analiz, odpowiednio całych egzosomów i biomarkerów nowotworowych egzosomów. W bezpośrednim podejściu, biochemiczny odcisk palca całych egzosomów zostanie określony po ich izolacji przez efekt DEP z płynów a sygnały SERS będą rejestrowane bezpośrednio z egzosomów osadzonych na nanoplazmonicznych strukturach SERS. W podejściu pośrednim, sygnały SERS reporterów ramanowskich będą zawierać jakościowe i ilościowe informacje na temat wybranych biomarkerów egzosomalnych (białek) zapewniając wysoką czułość, specyficzność i multipleksowość oznaczeń, co jest szczególnie istotne w analizach próbek o niskim stężeniu EVs. Profilowanie proteomiczne oparte na SERS zostanie zweryfikowane za pomocą uzupełniającej spektrometrii mas. Wykorzystamy również tradycyjne metody chemometryczne i klasyczne modele uczenia maszynowego do odczytania informacji biochemicznych zakodowanych w złożonych obrazach spektralnych.

Wpływ rezultatów projektu. Wyniki badań pozwolą na opracowanie nowej metody izolacji, identyfikacji, ilościowego oznaczania i charakterystyki molekularnej EVs, zapewniając możliwość „płynnej biopsji” w czasie rzeczywistym, która otwiera nowe możliwości dla diagnostyki nowotworów. W przyszłości wyniki projektu ułatwią monitorowanie wyników klinicznych pacjentów.

