

Główne zmiany proteomu i metabolomu surowicy obserwowane w krwi osób poddanych radioterapii dotyczą wskaźników stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej odzwierciedlających systemową toksyczność promieniowania jonizującego

Karol Jelonek, Monika Pietrowska, Piotr Widłak

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii
– Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

STRESZCZENIE

Podstawowym celem radioterapii jest zniszczenie komórek nowotworowych poprzez napromienienie tkanki nowotworowej z uwzględnieniem jedynie niezbędnego marginesu. Pomimo tego, że objętość napromienionych tkanek jest zazwyczaj niewielka w stosunku do całego ciała, efekty indukowane przez promieniowanie jonizujące dotyczą całego organizmu i mogą być obserwowane systemowo na poziomie molekularnych składników krwi. O efektach promieniowania decyduje wielkość dawki i objętość napromienionych tkanek. Jednak intensywność zmian systemowych obserwowanych na poziomie całego organizmu, na przykład w krwi, zależy również od swoistej radiowrażliwości uszkodzonych tkanek oraz rodzaju i nasilenia odczynów toksycznych indukowanych przez promieniowanie. Systemowe efekty promieniowania można rejestrować na poziomie proteomu i metabolomu surowicy. Do analizy tych komponentów krwi wykorzystuje się zwykle tzw. „techniki wysokoprzepustowe”, do których należą przede wszystkim metody oparte o spektrometrię mas. Celem niniejszej pracy jest przegląd dostępnych danych na temat swoistych zmian obserwowanych na poziomie proteomu i metabolomu surowicy u pacjentów onkologicznych eksponowanych na promieniowanie jonizujące w trakcie radioterapii. Nie ulega wątpliwości, że obserwowane efekty są związane przede wszystkim z toksycznością promieniowania, a w szczególności z nasileniem odczynów zapalnych i odpowiedzi immunologicznej.

Słowa kluczowe: radioterapia; stan zapalny; osocze; surowica; lipidomika; metabolomika; proteomika

Adres do korespondencji: Prof. dr hab. n. med. Piotr Widłak
Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice
email: piotr.widlak@io.gliwice.pl

Liczba słów: 2087 **Tabele:** 0 **Ryciny:** 0 **Piśmiennictwo:** 35

Received: 25.09.2016

Accepted: 10.10.2016

Published: 30.10.2016

WSTĘP

Radioterapia (RT), zarówno samodzielna jak i uzupełniająca jest efektywną metodą leczenia pacjentów z nowotworami litymi. W RT stosuje się promieniowanie jonizujące (IR, ang. ionizing radiation) w celu uszkodzenia DNA oraz innych struktur komórkowych, co prowadzi do zahamowania proliferacji i indukcji śmierci uszkodzonych komórek nowotworowych. Ponadto, w ostatnich latach zwraca się uwagę również na pośrednie efekty promieniowania jakimi są uszkodzenia unaczynienia guza oraz stymulacja odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na tak zwaną immunogenną śmierć komórek nowotworowych. Chociaż IR pierwotnie kierowane jest na objętość guza, uszkadza również otaczające tkanki zdrowe. W ostatnich dwu dekadach RT jest coraz częściej dostarczane za pomocą różnych zaawansowanych technologicznie metod np. wykorzystujących modulację intensywności wiązki (IMRT, ang. intensity modulated radiation therapy). Dzięki tej technice możliwe jest podanie wyższych dawek promieniowania do obszaru guza z jednoczesnym obniżeniem dawki dostarczanej do otaczających tkanek zdrowych [1]. Jednakże, potencjalną wadą IMRT jest ekspozycja dużych objętości tkanek zdrowych na niskie dawki promieniowania, co może wywołać ogólnoustrojową odpowiedź organizmu na RT. Uszkodzenia wywołane promieniowaniem jonizującym, poza bezpośrednią eliminacją komórek nowotworowych, prowadzą do zmian w komunikacji międzykomórkowej, odpowiedzi układu odpornościowego i zapalnego, procesów odbudowy tkanek oraz hipertrofii pozostałych komórek by zrównoważyć apoptozę [2]. Wielkość urazu związanego z promieniowaniem, zarów-

no na poziomie komórkowych jak i tkankowym, przede wszystkim zależy od dostarczonej dawki, ale również od objętości napromienionej tkanki, rezerwy funkcjonalnej jak i organizacji strukturalnej narażonego narządu [3]. Obecnie ekspozycja na niskie dawki promieniowania (< 0.1 Gy) dużych objętości ciała (a nawet całego organizmu) zdarza się coraz częściej nie tylko w przypadku radioterapii onkologicznej. Dlatego też konieczne staje się opracowanie nowych modeli eksperymentalnych, które mogłyby umożliwić analizę ogólnoustrojowych skutków biologicznych niskich i średnich dawek promieniowania.

RADIOTERAPIA A STAN ZAPALNY

Stan zapalny jest kluczowym elementem odpowiedzi biologicznej po uszkodzeniu komórki w związku z infekcją lub tzw. jałowym uszkodzeniem (np. śmiercią tejże komórki). Proces ten jest aktywowany przez system odpornościowy w celu zablokowania lub unieszkodliwienia niszczącego bodźca, a następnie rozpoczęcia regeneracji. Chociaż proces zapalny jest zdrową reakcją organizmu na uszkodzenie czy infekcję, może w przypadku złej regulacji zostać wykorzystany przeciw organizmowi. Przykładowo, przewlekłe stany zapalne mogą sprzyjać wszystkim etapom progresji nowotworu. W procesie nowotworzenia mamy najczęściej do czynienia ze współistnieniem pro- i przeciw-nowotworowych czynników zapalnych oraz odpornościowych, a rozwój nowotworu związany jest z przewagą procesów pro-nowotworowych [4].

Promieniowanie jonizujące wpływa na system odpornościowy poprzez zwiększenie ekspresji czynników biorących udział w stanie zapalnym [5]. Kluczowa jest tutaj wywołana przez promieniowanie aktywacja kaskady cytokin [6]. Warto również pamiętać o tym, że radioterapii poddawani są najczęściej pacjenci z nowotworami, u których poziom czynników zapalnych jest znamienne podwyższony w stosunku do zdrowych [7]. Równowaga cytokin pro- i przeciwzapalnych przed leczeniem jest o tyle ważna, że ma ona ogromny wpływ na radiooporność nowotworu oraz stopień popromiennej toksyczności tkanek zdrowych. To właśnie te dawki promieniowania, które nie są w stanie zabić komórki, aktywują procesy prozapalne zarówno w komórkach nowotworowych jak i zdrowych. Najczęściej wymienianym czynnikiem, który łączy kancerogenezę, stan zapalny oraz radiooporność jest NF- κ B, a czynniki, których poziom po promieniowaniu się

podnosi są zwykle od niego zależne. Przykładowo, ludzkie komórki raka jamy ustnej po promieniowaniu zwiększyły produkcję IL-1, IL-6 oraz GM-CSF [8], podczas gdy komórki ludzkiego glejaka wykazywały nadekspresję IL-6 oraz IL-8 [9]. W przypadku cytokiny TNF α literatura w większość przypadków wskazuje popromienną stymulację [10, 11]. Szerszy opis współzależności pomiędzy promieniowaniem jonizującym a stanem zapalnym został już wcześniej przedyskutowany w innych pracach przeglądowych [12, 13].

Skład molekularny krwi pobranej przed radioterapią jako potencjalny wskaźnik promieniowrażliwości

Wskaźniki promieniowrażliwości pozwalają na predykcję toksyczności radioterapii bazując na ocenie składu molekularnego jeszcze przed rozpoczęciem leczenia. Pozwala to na selekcję pacjentów pod względem prognozowanej odpowiedzi na RT, a następnie indywidualne dopasowanie schematu leczenia. Pacjenci, którzy nie są nadwrażliwi na promieniowanie jonizujące mogą w ten sposób otrzymać wyższą dawkę, co pozwala na poprawę skuteczności wyleczenia nowotworu w tej grupie. Takie podejście określa się mianem medycyny precyzyjnej czy też spersonalizowanej. Użyteczne wskaźniki promieniowrażliwości mogą być wykrywane również wśród molekularnych składników krwi.

Jedną z technik, która pozwala na wykrycie i oznaczenie poziomu wybranego białka jest test immunologiczny np. ELISA, gdzie każde białko jest analizowane osobno przy użyciu dedykowanego przeciwciała. Pierwszą pracą, w której szukano wskaźników predykcyjnych toksyczności leczenia polegała na analizie próbek osocza techniką ELISA pod kątem cytokin potencjalnie związanych z objawowym urazem płuc wywołanym przez promieniowanie jonizujące (ang. symptomatic radiation-induced lung injury) [14]. Badanie to ujawniło znamienne niższe poziomy IL-8 w próbkach przed leczeniem u pacjentów, którzy musieli się później zmagać z takimi urazami. Na podstawie otrzymanych wyników wyciągnięto wnioski, iż IL-8 chroni przed objawowym urazem płuc wywołanym przez promieniowanie jonizujące. W innych pracach pokazano natomiast, że IL-8 przejściowo reguluje migrację neutrofilów w trakcie początkowych etapów rozwoju procesu zapalnego [15]. Z drugiej jednak strony, przewlekły wzrost IL-8 może doprowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia migracji neutrofilów [16]. Analiza po-

ziomu cytokin była również użyta do poszukiwania wskaźników ostrej popromiennej toksyczności układu pokarmowego oraz moczowopłciowego w surowicy pobranej przed radioterapią od pacjentów z nowotworami płuc. W pracy tej [17] pokazano korelację toksyczności leczenia wraz ze wzrostem poziomów IL-1 oraz IL-2. W innych pracach wykazano natomiast stymulowaną przez promieniowanie produkcję IL-1, co chroniło komórki hematopoetyczne [18], podczas gdy IL-2 stymulowało wzrost komórek T oraz B jak i produkcję innych cytokin [19].

Kolejną techniką stosowaną w badaniach proteomicznych dotyczących toksyczności promieniowania jest metoda oparta o spektrometrię mas (MS, ang. mass spectrometry). Technika ta pozwala między innymi na wykonanie profilu molekularnego wybranej próbki biologicznej za pomocą MALDI-ToF (ang. Matrix-Assisted Laser-Desorption and Ionization – Time of Flight). W procedurze tej próbka jest mieszana z matrycą na stalowej płytce, a następnie uprotonowana po desorpcji indukowanej przez światło lasera. Wytworzone w ten sposób jony molekularne są przyspieszane w polu elektromagnetycznym, a czas przelotu danego jonu odzwierciedla stosunek masy do ładunku. Powstałe w ten sposób widma masowe zawierają informację o intensywności danego jonu oraz jego wartości m/z (zazwyczaj odpowiadającej masie molekularnej analitu powiększonej o masę jednego protonu) [20]. Opierając się na wieloskładnikowym profilu najbardziej znamienych jonów można stworzyć charakterystyczną sygnaturę (tzw. „odcisk palca”) danego stanu chorobowego. Wykorzystanie takiej sygnatury pozwala osiągnąć wysokie zróżnicowanie między grupami, nawet jeśli poszczególne składowe używane osobno na to nie pozwalają. Takie podejście stosowane było w bardzo wielu pracach, a jego potencjał został udokumentowany na przykładzie detekcji i klasyfikacji nowotworów [21, 22]. Dalsze studia wykazały, iż wieloskładowe profile proteomiczne krwi mogą odzwierciedlać ogólna odpowiedź organizmu na terapię przeciw-nowotworową [23].

W pierwszym badaniu, w którym do wykrycia peptydów krwi związanych z toksycznością radioterapii użyto techniki profilowania MALDI analizowano peptydom osocza od pacjentów traktowanych radioterapią z powodu raków regionu głowy i szyi (RGiSz) [24]. Analizowane próbki osocza zbierane były przed leczeniem. Jediną składową widma masowego, która wykazała znamienne różnice w porównaniu

próbek pochodzących od pacjentów z niską oraz wysoką ostrą toksycznością śluzówki (AMR, ang. acute mucosal reactions) była komponenta o masie 5308 Da. Cztery inne składowe (2219, 2454, 3431 and 5308 Da) wykazywały natomiast statystyczną korelację z maksymalną intensywnością AMR. Inne badanie wykorzystujące profilowanie peptydomu pacjentów poddanych radioterapii z powodu raka szyjki macicy ujawniło 22 składowe związane z podwyższonym ryzykiem zależnego od promieniowania ostrego zapalenia jelita (RIAISs, ang. radiation-induced acute intestinal symptoms) [25]. Warto jednak pamiętać, iż praktyczne zastosowanie przedstawionych badań opierających się na profilowaniu proteomu/peptydomu krwi są ograniczone, ponieważ tego typu technika nie dostarcza dokładnej identyfikacji różnicującej składowej.

Chociaż profilowanie proteomu za pomocą MALDI-MS błyskawicznie generuje szeroki profil związków w próbce, metoda ta nie pozwala na identyfikację znajdujących się tam składowych. Najczęściej stosowaną metodą do identyfikacji białek jest tandemowa spektrometria mas (MS/MS) poprzedzona rozdziałem białek obecnych w mieszaninie (np. surowicy) przy użyciu chromatografii cieczowej (LC). W tej technice próbka białkowa jest trawiona proteazą (np. trypsyną), dzięki czemu powstają peptydy, które mogą być rozdzielone na LC. Próbka jest w ten sposób dzielona na frakcje chromatograficzne, które mogą być oddzielnie analizowane przez MS/MS. Wysokoprzepustowa analiza LC-MS/MS typu „shotgun” została użyta do identyfikacji białek osocza związanych z toksycznością płucną wywołaną przez promieniowanie jonizujące (RILT, ang. radiation-induced lung toxicity) [26]. Badanie wykazało podwyższony poziom białka C4BPA (ang. C4b-binding protein alpha) oraz VTN (ang. Vitronectin) w próbkach pobranych przed radioterapią w grupie osób, u których pojawił się co najmniej drugi stopień toksyczności popromiennej. C4BPA jest związane z mającym prozapalny charakter układem dopełniacza [27], podczas gdy VTN jest zaangażowane w szlak zwłóknienia [28]. Obie ścieżki są zaangażowane w proces gojenia się uszkodzeń popromiennych. Podobne podejście zostało zastosowane w trakcie poszukiwań białek osocza związanych z popromiennym zapaleniem płuc (ang. radiation pneumonitis) [29]. Badanie to pokazało znamienne powiązanie toksyczności promieniowania ze zmierzonymi przed leczeniem poziomami białek $\alpha 2M$, $\alpha 1AC$, CFB, HPX, CO3, PLS2,

HCII, CO4A, CO5 oraz ATIII. Dodatkowo, a2M, którego poziom charakteryzował się największą zmiennością, został z sukcesem potwierdzony w dodatkowym badaniu przy użyciu testu ELISA na niezależnej grupie 20 pacjentów.

Monitorowanie toksyczności radioterapii z wykorzystaniem markerów molekularnych

Poza wskaźnikami predykcyjnymi, które są w stanie ocenić indywidualną promieniowrażliwość pacjenta na podstawie cech molekularnego mierzonych przed rozpoczęciem leczenia, interesującą grupą markerów związanych z promieniowaniem są czynniki, których poziom zmienia się w trakcie leczenia i rozwoju odczynów popromiennych. Identyfikacja oraz analiza poziomu takich związków pozwala na dokładniejsze zrozumienie procesów biologicznych kryjących się za efektami ubocznymi promieniowania. Monitorowanie toksyczności promieniowania jonizującego przeprowadzone zostało po raz pierwszy w badaniu mającym na celu molekularną charakteryzację RILT u pacjentów leczonych radioterapią z powodu nowotworów płuca [30]. Białkowy skład molekularny analizowany był w osoczu pobranym przed, w trakcie oraz po zakończeniu RT za pomocą techniki LC-MS/MS. Rozwój drugiego stopnia RILT znamienne korelował z podwyższonymi poziomami C4BPA, VNT i CO3 w trakcie terapii oraz po jej zakończeniu. C4BPA oraz VNT zostały już opisane we wcześniejszym rozdziale jako składowe charakteryzujące się wysokim potencjałem predykcyjnym popromiennej toksyczności. Z kolei CO3 jest zaangażowane w kaskadę sygnałową układu dopełniacza podczas reakcji zapalnej, która wpływa na powstanie oraz rozwój RILT. Związane z toksycznością promieniowania składniki proteomu były również charakteryzowane metodą MALDI-MS w surowicy pacjentów poddanych RT z powodu RGiSz [31]. Badanie wykazało silną korelację między maksymalną intensywnością AMR a indukowanymi przez promieniowanie zmianami w poziomie 19 składowych peptydomu surowicy. Ciekawe badanie dotyczące związanych z RT cech proteomu surowicy pacjentów leczonych z powodu RGiSz zostało przeprowadzone metodą LC-MS/MS, co umożliwiło identyfikację białek indukowanych przez promieniowanie [32]. Chociaż w pracy nie uwzględniono analizy nasilenia odczynów popromiennych, to uzyskane wyniki potwierdziły, że główną cechą

proteomu krwi w trakcie i po zakończeniu RT jest podwyższony poziom białek związanych z ostrą fazą i odpowiedzią zapalną.

Czynniki molekularne, których zmiana poziomu w trakcie radioterapii jest związana z rozwojem popromiennej toksyczności były również wykrywane w (fosfo)lipidomie surowicy. Indukowane promieniowaniem istotne zmiany obserwowane były w przypadku 14 fosfolipidów, których poziomy korelowały z intensywnością AMR obserwowaną u pacjentów poddanych RT z powodu RGiSz [33]. Dodatkowo, częstość zmian obserwowanych po promieniowaniu była znamienne większa u pacjentów z RGiSz niż w przypadku pacjentów z nowotworami prostaty, gdzie leczenie promieniowaniem było znacznie lepiej tolerowane a wysoka toksyczność popromienna była bardzo rzadko obserwowana [34]. Inna praca, w której analizowano markery krwi związane z toksycznością leczenia pacjentów z RGiSz skupiła się na metabolomie surowicy badanym z wykorzystaniem techniki NMR [35]. To badanie wykonane zostało na próbkach surowicy zebranych po potraktowaniu pacjentów z RGiSz radioterapią lub chemo-radioterapią. Próbkę zostały podzielone na dwie grupy w zależności od intensywności ostrego odczynu. W grupie próbek od pacjentów z wysoką toksycznością odnotowano podwyższone poziomy N-acetyloglikobiałek i octanów oraz obniżone poziomy rozgałęzionych aminokwasów (leucyna, walina i izoleucyna), alaniny, kreatyniny, związków zawierających cholinę, karnityny i glukozy. Autorzy wskazują, iż profile metaboliczne pacjentów z wysoką intensywnością ostrego odczynu są związane ze stanem zapalnym, przemianami w błonie komórkowej oraz metabolizmem energetycznym.

WNIOSKI

Chociaż przedstawione wyniki dotyczące zmian w składzie molekularnym ludzkiej krwi w odpowiedzi na toksyczność radioterapii opierały się na różnych modelach klinicznych i zostały uzyskane z wykorzystaniem różnych technik analitycznych, ogólne wnioski są podobne dla większości opisanych badań. Przede wszystkim, zaobserwowano korelację pomiędzy wielkością popromiennych zmian w składzie molekularnym krwi a rozwojem toksyczności tkanek zdrowych. Większa tolerancja radioterapii związana była z niższą częstością obserwowanych zmian. Dodatkowo, gojenie się odczynów popromiennych było skorelowane w czasie z kom-

pensacją popromiennych zmian. Poza tym, wielkość popromiennych zmian obserwowanych na poziomie proteomu oraz metabolomu wykazywała korelację z objętością tkanek zdrowych znajdujących się w polu napromienienia. Przedstawione wyniki wskazują, iż uszkodzenia tkanek zdrowych podczas radioterapii wywołują zarówno lokalną jak i ogólnoustrojową odpowiedź, które objawiają się w postaci ostrej toksyczności popromiennej oraz zmian w profilu molekularnym krwi. Reakcje zapalne są kluczowymi elementami ostrej odpowiedzi popromiennej. Dodatkowo, czynniki związane ze stanem zapalnym są również głównymi związkami charakterystycznymi dla ogólnoustrojowej odpowiedzi na promieniowanie, co można obser-

wować zarówno na poziomie proteomu jak i metabolomu krwi. Ponadto wykazano, że poziom cytokin pro-zapalnych przed RT związane były z intensywnością ostrej toksyczności wywołanej przez radioterapię. Dlatego też stan procesów zapalnych przed leczeniem może być traktowany jako potencjalny czynnik prognostyczny umożliwiających oszacowanie indywidualnej promieniowrażliwości.

Podziękowania

Ta praca została wykonana przy wsparciu Siódmego Programu Ramowego Unii Europejskiej (604984, OPERRA/VIBRATO) oraz Narodowego Centrum Nauki (grant nr 2015/17/B/NZ5/01387).

- Gupta T, Agarwal J, Jain S i wsp.: Three-dimensional conformal radiotherapy (3D-CRT) versus intensity modulated radiation therapy (IMRT) in squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized controlled trial. *Radiother Oncol* 2012;104(3):343-8.
- Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH: Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 2003;4(9):529-36.
- Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B: Treatment volume and tissue tolerance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;14(4):751-9.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M: Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140(6):883-99.
- Di Maggio FM, Minafra L, Forte GI i wsp.: Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *J Inflamm (Lond)* 2015;12:14.
- Schaue D, Kachikwu EL, McBride WH: Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res* 2012;178(6):505-23.
- Balkwill F, Mantovani A: Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 2001;357(9255):539-545.
- Zhang JS, Nakatsugawa S, Niwa O i wsp.: Ionizing radiation-induced IL-1 alpha, IL-6 and GM-CSF production by human lung cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 1994; 107(9):653-7.
- Pasi F, Facoetti A, Nano R: IL-8 and IL-6 bystander signaling in human glioblastoma cells exposed to gamma radiation. *Anticancer Res* 2010;30(7):2769-72.
- Chendil D, Ranga RS, Meigooni D i wsp.: Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene* 2004;23(8):1599-607.
- Veeraraghavan J, Natarajan M, Aravindan S i wsp.: Radiation-triggered tumor necrosis factor (TNF) alpha-NFkappaB cross-signaling favors survival advantage in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2011;286(24):21588-600.
- Candeias SM, Testard I: The many interactions between the innate immune system and the response to radiation. *Cancer Lett* 2015;368(2):173-8.
- Schaue D, Micewicz ED, Ratikan JA i wsp.: Radiation and inflammation. *Semin Radiat Oncol* 2015;25(1):4-10.
- Hart JP, Broadwater G, Rabbani Z i wsp.: Cytokine profiling for prediction of symptomatic radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63(5):1448-54.
- Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ: Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 1989;169(4):1485-90.
- Simonet WS, Hughes TM, Nguyen HQ i wsp.: Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8. *J Clin Invest* 1994;94(3):1310-9.
- Christensen E, Pintilie M, Evans KR i wsp.: Longitudinal cytokine expression during IMRT for prostate cancer and acute treatment toxicity. *Clin Cancer Res* 2009;15(17):5576-83.
- Neta R: Modulation with cytokines of radiation injury: suggested mechanisms of action. *Environ Health Perspect* 1997;105 Suppl 6:1463-5.
- Hoyer KK, Dooms H, Barron L, Abbas AK: Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* 2008;226:19-28.
- Karas M, Hillenkamp F: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60(20):2299-301.
- Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF: Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(4):267-75.
- Solassol J, Jacot W, Lhermitte L i wsp.: Clinical proteomics and mass spectrometry profiling for cancer detection. *Expert Rev Proteomics* 2006;3(3):311-20.
- Pietrowska M, Widlak P: MALDI-MS-Based Profiling of Serum Proteome: Detection of Changes Related to Progression of Cancer and Response to Anticancer Treatment. *International Journal of Proteomics* 2012;2012:10.
- Pietrowska M, Polanska J, Walaszczyk A i wsp.: Association between plasma proteome profiles analysed by mass spectrometry, a lymphocyte-based DNA-break repair assay and radiotherapy-induced acute mucosal reaction in head and neck cancer patients. *Int J Radiat Biol* 2011; 87(7):711-9.
- Chai Y, Wang J, Gao Y i wsp.: Identification of biomarkers for radiation-induced acute intestinal symptoms (RIASs) in cervical cancer patients by serum protein profiling. *J Radiat Res* 2015;56(1):134-40.
- Cai XW, Shedden KA, Yuan SH i wsp.: Baseline plasma proteomic analysis to identify biomarkers that predict radiation-induced lung toxicity in patients receiving radiation for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6(6):1073-8.
- Chung LP, Bentley DR, Reid KB: Molecular cloning and characterization of the cDNA coding for C4b-binding protein, a regulatory protein of the classical pathway of the human complement system. *Biochem J* 1985; 230(1): 133-41.

28. Zhou A, Huntington JA, Pannu NS i wsp.: How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol* 2003;10(7):541-4.
 29. Oh JH, Craft JM, Townsend R i wsp.: A bioinformatics approach for biomarker identification in radiation-induced lung inflammation from limited proteomics data. *J Proteome Res* 2011;10(3):1406-15.
 30. Cai XW, Shedden K, Ao X i wsp.: Plasma proteomic analysis may identify new markers for radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;77(3):867-76.
 31. Widlak P, Pietrowska M, Polanska J i wsp.: Radiotherapy-related changes in serum proteome patterns of head and neck cancer patients; the effect of low and medium doses of radiation delivered to large volumes of normal tissue. *J Transl Med* 2013;11:299.
 32. Widlak P, Jelonek K, Wojakowska A i wsp.: Serum proteome signature of radiation response: upregulation of inflammation-related factors, and downregulation of apolipoproteins and coagulation factors in cancer patients subjected to radiotherapy – a pilot study. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 2015.
 33. Jelonek K, Pietrowska M, Ros M i wsp.: Radiation-induced changes in serum lipidome of head and neck cancer patients. *Int J Mol Sci* 2014;15(4):6609-24.
 34. Ros M, Jelonek K, Pietrowska M i wsp.: Radiotherapy-induced changes in serum lipid profile of patients with prostate or head and neck cancer. *J Radiat Oncol* 2016;3(2):030.
 35. Boguszewicz Ł, Hajduk A, Mrochem-Kwarciak J i wsp.: 1H NMR based metabolomic approach to monitoring of the head and neck cancer treatment toxicity. *Metabolomics* 2016;12(6):1-15.
-