



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Chemii

Zakład Fizyki Chemicznej

Zespół Obrazowania Ramanowskiego

ROZPRAWA DOKTORSKA

„Spektroskopowa charakterystyka modeli in vitro wybranych podtypów białaczki wraz z oceną ich interakcji z substancjami egzogennymi”

Mgr Adriana Adamczyk

Promotor:

Prof. dr hab. Małgorzata Barańska

Promotor pomocniczy:

Dr Katarzyna Majzner

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków, 2023

Spis Treści

Podziękowania	1
Podziękowania dla instytucji finansujących	2
Streszczenie	3
Abstrakt	4
Wykaz skrótów i zwrotów	5
I. Część teoretyczna	9
1. Techniki spektroskopowe oparte na rozpraszaniu promieniowania	10
1.1. Spektroskopia rozpraszania ramanowskiego	10
1.2. Techniki spektroskopowe wykorzystujące efekty nieliniowe	13
1.3. Obrazowanie z użyciem spontanicznego rozpraszania ramanowskiego	16
1.4. Bezznacznikowe i znacznikowe podejście do spektroskopii ramanowskiej	18
2. Metody analizy danych spektroskopowych	27
2.1. Eliminacja artefaktów z widm ramanowskich	27
2.2. Analiza obrazów	30
2.3. Metody uczenia nienadzorowanego	32
2.4. Metody uczenia nadzorowanego	37
2.5. Analiza wydajności modeli predykcyjnych	39
2.6. Wieloparametrowa dekonwolucja sygnału z wykorzystaniem iteracyjnej metody najmniejszych kwadratów	40
3. Barwienia histochemiczne	41
3.1. Barwienie May-Grunwald -Giemsa, MGG	41
4. Cytometria przepływowa	42
5. Białaczka-przyczyny epidemiologia i leczenie	44
5.1. Pochodzenie i podział elementów morfotycznych krwi	44
5.2. Białaczka i jej klasyfikacja	46
5.3. Podtypy ostrej białaczki limfoblastycznej	46
5.4. Terapie celowane z wykorzystaniem inhibitorów kinaz	49
6. Różnicowanie komórek hematopoetycznych w modelach <i>in vitro</i>	50
7. Wykorzystanie spektroskopii ramanowskiej w diagnostyce i monitorowaniu procesu leczenia białaczek	53
II. Hipoteza badawcza	56
III. Cel Pracy	57
IV. Część eksperymentalna	58
1. Spektroskopowa charakterystyka blast BCP-ALL z rearanzacją <i>KMT2A</i> oraz fuzją genów <i>BCR-ABL1</i>	58
1.1. Opis stosowanych metod.	58
1.2. Wyniki i dyskusja	61
1.3. Wnioski	76

2. Spektroskopowa charakterystyka interakcji ruksolitynibu w modelach <i>in vitro</i> Ph-like BCP-ALL z mutacją punktową kinazy JAK2	79
2.1. Opis stosowanych metod.	79
2.2. Wyniki i dyskusja	81
2.3. Wnioski	94
3. Charakterystyka spektroskopowa modelu <i>in vitro</i> indukowanego różnicowania modelu promielocytów z wykorzystaniem znaczników ramanowskich	96
3.1. Opis stosowanych metod	96
3.2. Wyniki i dyskusja	102
3.3. Wnioski	129
V. Podsumowanie	130
VI. Bibliografia	131
Spis ilustracji	145
Spis tabel	151
Wykaz publikacji z listy JCR	152
Wykaz zgłoszeń patentowych	153
Wykaz ustnych wystąpień konferencyjnych	153
Kierowanie grantem	153
Udział w projektach badawczych	154
Wykaz staży i wyjazdów naukowych	154
Wykaz uczestnictwa w szkoleniach i szkołach naukowych	154
Działalność organizacyjna	155

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania promotorowi pracy **prof. dr hab. Małgorzacie Barańskiej** oraz promotorowi pomocniczemu **dr Katarzynie Majzner** za możliwość realizacji badań i kształcenia doktorskiego pod ich opieką. Bez Waszego wsparcia merytorycznego i wspólnych dyskusji naukowych niemożliwe byłoby udoskonalenie mojego warsztatu badawczego, jak również rozwijania szeregu kompetencji miękkich niezbędnych w pracy naukowej.

Podziękowania składam również **prof. UJ dr hab. Kamilli Małek** za możliwość współpracy oraz wszelkie dyskusje.

Pragnę szczególnie podziękować **dr Annie M. Nowakowskiej**, która inspirowała mnie do testowania nowych podejść i metod rozwiązywania problemów badawczych. Ponadto dziękuję pozostałym członkom zespołu **TEAM-NET** **dr Aleksandrze Borek-Dorosz**, **dr Krzysztofowi Brzozowskiemu**, **mgr Patrycji Leszczenko**, **mgr. Patrycji Dawiec**, **mgr Adriannie Wislockiej-Orłowskiej** oraz **mgr Klaudii Mielnik** za możliwość współpracy. Ta praca doktorska nie mogłaby powstać bez wsparcia i ekspertyzy członków konsorcjum z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi **prof. dr hab. n. med. Wojciechowi Młynarskiemu**, **dr Kindze Ostrowskiej**, **dr Agacie Pastorczak**, **dr Marcie Ząbczyńskiej** i **dr Justynie Jakubowskiej**. Dziękuję również wszystkim członkom konsorcjum **TEAM-NET**.

Składam podziękowania **obecnym i byłym członkom Zespołu Obrazowania Ramanowskiego** za wsparcie, życzliwość przyjazną atmosferę oraz możliwość dyskusji i wymiany doświadczeń.

Dziękuję również **dr Davidowi Perez-Guaita** za dzielnie się ekspertyzą i możliwość współpracy.

Jako ostatnim pracę podziękować **mojej Rodzinie**, która wspierała moją edukację na każdym poziomie i zachęcała do dalszego rozwoju, w tym mojemu **mężowi Krzysztofowi** za codzienne motywowanie do dalszej realizacji ambitnych planów badawczych oraz udoskonalania kompetencji.

Podziękowania dla instytucji finansujących

Składam podziękowania za wsparcie finansowe badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej następującym projektom:

Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, Projekt Team-Net (POIR.04.04.00-00-16ED/18-00), Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, Projekt Team-Net (POIR.04.04.00-00-16ED/18-00), *Platforma do szybkiego, bezznacznikowego obrazowania, identyfikacji i sortowania podtypów komórek białaczkowych*



Narodowe Centrum Nauki, Projekt Preludium UMO-2021/41/N/ST4/03069 do projektu badawczego nr 2021/41/N/ST4/03069 *Reportery ramanowskie jako narzędzie do oceny różnicowania komórek na przykładzie modeli in vitro komórek prekursorowych krwi linii mieloidalnej.*



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Składam podziękowania za wsparcie finansowe zagranicznego stażu naukowego *Inicjatywie Doskonałości UJ* w ramach modułu *Visibility and Mobility Module*.



Streszczenie

Białaczki stanowią heterogeniczną grupą nowotworów układu krwiotwórczego polegające na klonalnym rozroście nieprawidłowo funkcjonujących elementów układu krwiotwórczego. Mogą mieć one przebieg nagły oraz przewlekły i dotyczyć komórek o różnym stopniu dojrzałości. Szerokie spektrum istniejących niekorzystnych zmian genetycznych prekursorów wpływa na ich skład molekularny i metabolizm, który jest odzwierciedlony w przebiegu klinicznym choroby, rokowaniach i skuteczności chemioterapii. W praktyce klinicznej prowadzi się czasochłonne immunotypowanie, badania cytogenetyczne czy molekularne. Jako jedną z alternatyw do obecnych metod diagnostycznych wskazuje się spektroskopię ramanowską, która dostarcza pełniej informacji o składzie badanej próbki również w środowisku wodnym, bez konieczności znakowania substancjami egzogennymi. Wsparcie analizy danych spektroskopowych metodami chemometrycznymi polepsza potencjał diagnostyczny tej metody jednocześnie dostarczając informacji o zmianach biochemicznych powiązanych ze stanem komórki i występującymi zaburzeniami.

Niniejsza rozprawa doktorska zawiera część teoretyczną i eksperymentalną, w których wyniki badań przedstawiono w trzech podrozdziałach weryfikujących postawione hipotezy badawcze. W pierwszym z nich z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej zidentyfikowano markery molekularnych podtypów B komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej o niekorzystnym rokowaniu: blasty z rearanżacją *KMT2A* oraz z fuzją genów *BCR-ABL1* (chromosomem *Philedelphia*) na podstawie ich modeli *in vitro*. Kolejna część zgłębiała zmiany stanu biochemicznego i metabolicznego modelowych układów *in vitro* komórek z mutacjami kinazy JAK2 na skutek interakcji z jej inhibitorem ruxsolutynibem. Ostatni podrozdział części wynikowej wskazuje spektroskopię ramanowską wspartą reporterami ramanowskimi jako skuteczne narzędzie oceny oddziaływania z substancjami wywołującymi proces indukowanego różnicowanie komórek o fenotypie promieloblastów do neutrofilii oraz wysoce czułą i swoistą metodę klasyfikacyjną w badanym układzie.

Podsumowując spektroskopia ramanowska wsparta metodami chemometrycznymi jest skutecznym narzędziem do charakterystyki modeli *in vitro* wybranych podtypów białaczki oraz oceny ich interakcji z lekami. Wykazano również zalety podejścia znakowanego do skuteczniejszej charakterystyki procesów metabolicznych i klasyfikacji.

Abstrakt

Leukemias are highly heterogeneous malignancies of the haematopoietic system that lead to clonal growth of abnormal, malfunctioning blood cells. Depending on the course of disease it is classified to chronic or acute leukemias, and involve cell of varying degrees of maturity. A wide range of genetic lesions present in blood precursors influence their molecular composition and metabolism, which is reflected in the course of clinical disease, prognosis and required chemotherapy. In clinical practice, immunotyping methods, cytogenetic, and molecular tests are used as diagnostic methods. Raman spectroscopy is indicated as an alternative, which provides complete information about the studied biological system, also in an aqueous environment, without the need to have a confirmation mark of the presence of exogenous substances. Supporting the analysis of spectroscopic data with chemometric methods improves the diagnostic potential simultaneously providing information on biochemical changes in related to the cell state.

The doctoral dissertation contains a theoretical and experimental part, in which the results are presented in three subchapters that verify the research hypothesis. In the first, using Raman spectroscopy, markers of molecular subtypes of acute lymphoblastic leukemia of B cell precursors were identified using *in vitro* blast models with *KMT2A* rearrangement and with the *BCR-ABL1* gene fusion (*Philedelphia* chromosome). The next part concerned biochemical and metabolic changes in *in vitro* model of B cell precursors with JAK2 kinase mutations after treatment with the kinase inhibitor ruxolitinib. The last subsection proves that Raman spectroscopy supported by Raman reporters is an effective tool to follow drug-induced differentiation of promyeloblasts to neutrophil-like cells neutrophils and classify them with high specificity and sensitivity.

In conclusion, Raman spectroscopy supported by chemometric methods is an effective tool for characterisation of *in vitro* models of selected leukemia subtypes and for following drug-related molecular and metabolic changes. The advantages of the labeled approach for effective classification have also been demonstrated.

Wykaz skrótów i zwrotów

ANOVA — analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)

ATRA — kwas *trans*-retinowy, tretynoina (ang. *all-trans-retinoic acid*)

CARS — wymuszona antystokesowska spektroskopia ramanowska (ang. *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*)

CD — antygen różnicowania komórkowego (ang. *Cluster Differentiation*)

CRS — koherentne rozpraszanie ramanowskie (ang. *Coherent Raman Scattering*, CRS)

DNA — kwas doeksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

DMSO — Dimetylosulfotlenek (ang. *Dimethyl Sulfoxide*)

E_0 - wektor elektryczny fali elektromagnetycznej

EMSC — rozszerzona multiplikatywna korekta sygnału (ang. *Extended Multiplicative Signal Correction*)

FBS — bydlęca surowica płodowa (ang. *Foetal Bovine Serum*)

FWM — mieszanie czterofalowe (ang. *Four-wave mixing*, WFM)

HBSS — zrównoważony roztwór soli Hanksa (ang. *Hanks Balanced Salt Solution*)

HCA — hierarchiczna analiza skupień (ang. *Hierarchical cluster analysis*)

I — intensywność

JAK — kinazy janusowe (ang. *Janus-activated kinases*)

j.u — jednostki umowne

KMCA — niehierarchiczna analiza skupień metoda k-średnich (ang. *K-means Cluster Analysis*)

LV — zmienna ukryta (ang. *Latent Variable*)

MCC — współczynnik korelacji Matthews'a (ang. *Matthew Correlation Coefficient*)

MCR — wielowymiarowa metoda dekonwolucji (ang. *Multivariate Curve Resolution*)

MSC — multiplikatywna korekta sygnału (ang. *Multiplicative Signal Correction*)

O-PLS-DA — ortogonalna analiza dyskryminacyjna metodą częściowych najmniejszych kwadratów (ang. *Partial Least Squares Discriminant Analysis*)

PBS — buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej (ang. *Phosphate Buffered Saline*)

PCA — analiza głównych składowych (ang. *Principal Component Analysis*)

PC — główna składowa (ang. *Principal Component*)

PMA lub MPA — octan 1-metoksy-2-propylu; ester 2-metoksypropylowy kwasu octowego (ang. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*)

PLS-DA — analiza dyskryminacyjna metodą częściowych najmniejszych kwadratów (ang. *Partial Least Squares Discriminant Analysis*)

PLS-R — regresja metodą częściowych najmniejszych kwadratów (ang. *Partial Least Squares Regression*)

RMSE — pierwiastek błędu średniokwadratowego (ang. *Root Mean Square Error*)

RMSEC — pierwiastek błędu średniokwadratowego kalibracji (ang. *Root Mean Square Error of Calibration*)

RMSECV — pierwiastek błędu średniokwadratowego walidacji krzyżowej (ang. *Root Mean Square Error of Cross-Validation*)

RMSEP — pierwiastek błędu średniokwadratowego predykcji (ang. *Root Mean Square Error of Prediction*)

RUX- ruksolitynib (ang. *Ruxolitinib*)

ROC-AUC — pole powierzchni pod krzywą charakterystyki operacyjnej odbiornika (ang. *Receiver Operating Characteristic Area Under Curve*)

SD — odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

SNV—standardowa normalna wariancja (ang. *Standard Normal Variate*)

STAT— przetworniki i aktywatory transkrypcji (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription*)

SVM — metoda wektorów nośnych (ang. *Support Vector Machines*)

SVM-DA— analiza dyskryminacyjna metodą wektorów nośnych (ang. *Support Vector Machines Discriminant Analysis*)

SRS — stymulowane rozpraszanie ramanowskie (ang. *Stimulated Raman Scattering*)

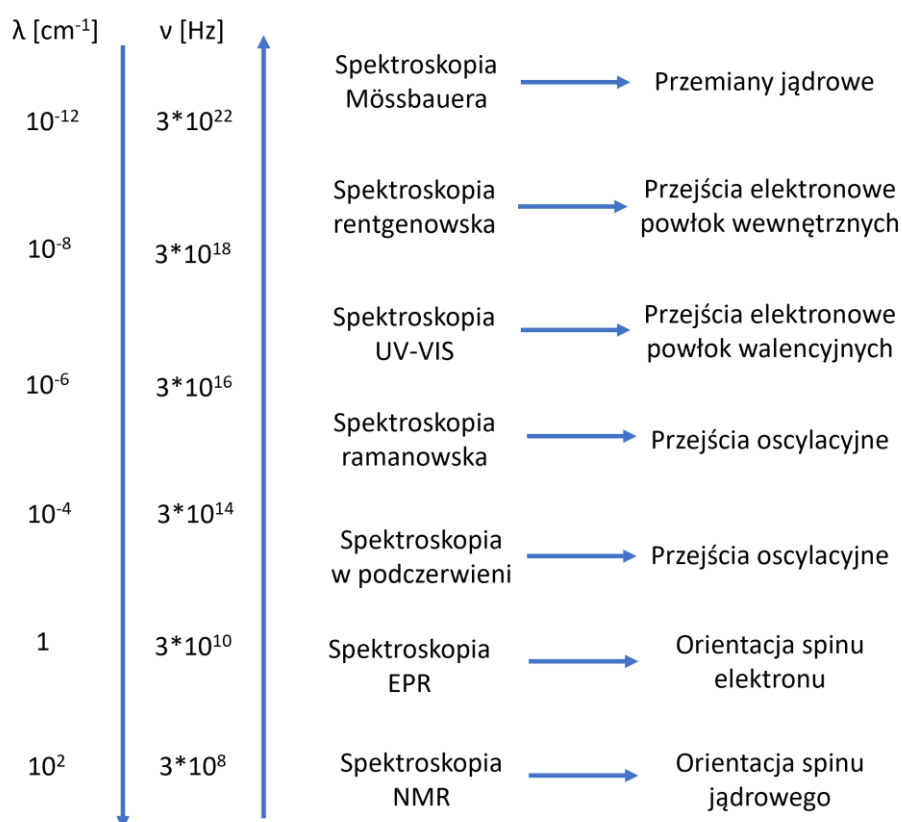
SERS— powierzchniowo wzmocnione rozpraszanie ramanowskie (ang. *Surface Enhanced Raman Scattering*)

VIP — zmienne istotne dla projekcji (ang. *Variables Important in Projection*)

μ_{ind} — indukowany moment dipolowy

I. Część teoretyczna

Oddziaływanie materii z promieniowaniem elektromagnetycznym jest przedmiotem badań spektroskopii molekularnej wykorzystującej szereg technik, które można zróżnicować m. in. ze względu na energię użytego promieniowania. Wśród nich wyróżniamy spektroskopię Mossbauera opisującą przemiany jądrowe, spektroskopię rentgenowską i UV-VIS badające przejścia elektronowe odpowiednio powłok wewnętrznych i walencyjnych, a także spektroskopię EPR i NMR związane ze zmianami orientacji spinu odpowiednio elektronowego i jądrowego (**Rysunek 1**) [1]. Badania przejść oscylacyjnych umożliwia z kolei spektroskopia ramanowska oraz spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni.



Rysunek 1 Zakresy promieniowania elektromagnetycznego stosowanego w technikach spektroskopowych oraz badane przejścia.

1. Techniki spektroskopowe oparte na rozpraszaniu promieniowania

1.1. Spektroskopia rozpraszania ramanowskiego

Zjawisko rozpraszania ramanowskiego można wyjaśnić za pomocą klasycznej teorii Placzka. Teoria ta opisuje generowanie światła rozproszonego poprzez indukowany moment dipolowy (μ_{ind}). Wykorzystując fakt, że światło cechuje się naturą korpuskularno-falową, rozpraszanie światła można opisać jako wynik oddziaływania składowej elektrycznej E promieniowania elektromagnetycznego z rozkładem ładunku w atomie lub molekuale. W wyniku tego oddziaływania indukuje się moment dipolowy μ_{ind} , drgający z częstością oscylacji promieniowania ν_0 . Indukowany moment dipolowy zależy od wartości E i od polaryzowalności α oscylatora, która jest związana ze zdolnością do odkształcania ładunku w zewnętrznym polu elektromagnetycznym. W przypadku molekuly izotropowej μ_{ind} wyrażony jest następująco:

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \quad (1)$$

gdzie α oznacza polaryzowalność (tj. potencjalną zdolność przemieszczania się elektronów względem jąder w polu elektrycznym), E_0 - wektor elektryczny fali elektromagnetycznej, a ν - częstość promieniowania.

Wiedząc, że w czasie oscylacji może dochodzić do zmiany tensora polaryzowalności, należy założyć, że wielkość ta jest funkcją współrzędnej drgania normalnego q i można zapisać ją w postaci szeregu Maclaurina:

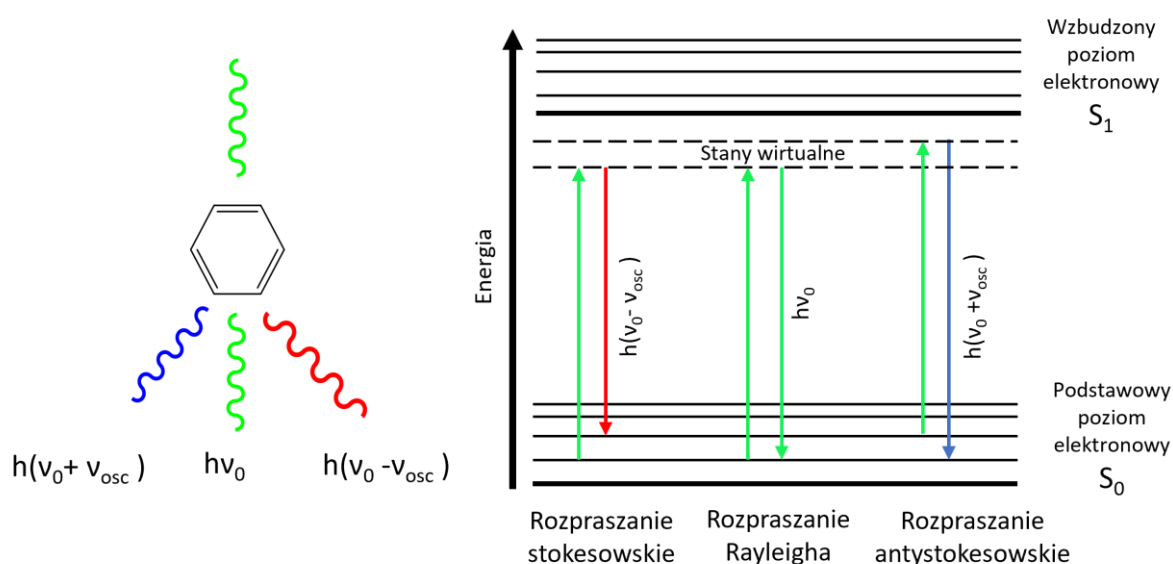
$$\alpha(q) = \alpha_{q=0} + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_{q=0} q + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \alpha}{\partial^2 q}\right)_{q=0} q^2 + \dots \quad (2)$$

Po podstawieniu równań (2) do (1) otrzymujemy równanie (3), które wyjaśnia, jak indukowany moment dipolowy generuje jednocześnie promieniowanie elektromagnetyczne o trzech różnych częstościach odpowiadających elastycznemu rozpraszaniu Rayleigha (promieniowanie rozpraszane o częstości takiej samej jak promieniowanie padające ν_0), stokesowskiemu i antystokesowskiemu (nieelastyczne promieniowanie rozpraszane o mniejszej $\nu_0 - \nu_{osc}$ lub większej $\nu_0 + \nu_{osc}$ wartości energii oscylacji molekuly):

$$\mu_{ind} = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_{q=0} q E_0 [\cos 2\pi(\nu_0 - \nu_{osc})t + \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_{osc})t] \quad (3)$$

Z równania (3) wynika także, że rozpraszanie nieelastyczne jest obserwowane gdy polaryzowalność, jako funkcja drgania normalnego, zmienia się w czasie oscylacji (zmiana przynajmniej jednej składowej tensora polaryzowalności), co stanowi jedną z reguł wyboru w spektroskopii ramanowskiej [1–3]. Teoria Placzka wyjaśnia dodatkowo niezależność wartości przesunięcia ramanowskiego od długości fali promieniowania wzbudzającego.

Powyższe rozważania wykorzystują falową naturę światła, jednak rozpraszanie można również opisać za pomocą diagramu poziomów energetycznych, ukazującego oddziaływanie materii z promieniowaniem monochromatycznym o energii niedopasowanej do różnicy poziomów oscylacyjnych (**Rysunek 2**).



Rysunek 2 Ideowy schemat rozpraszania promieniowania przez cząsteczkę benzenu (lewa część) i uproszczony diagram poziomów energetycznych z zaznaczonymi rozpraszaniem Rayleigha, ramanowskim stokesowskim i antystokesowskimi.

Promieniowanie rozproszone elastyczne i nieelastyczne zachodzi we wszystkich kierunkach i może być rejestrowane przez detektor w postaci trzech sygnałów o różnej intensywności przedstawionych w funkcji różnicy częstości lub liczby falowej względem promieniowania padającego. Intensywność promieniowania rozproszonego jest proporcjonalna do kwadratu indukowanego momentu dipolowego i częstości promieniowania rozproszonego do czwartej potęgi (4) [1–3].

$$I \sim \mu_{ind}^2 \nu^4 \quad (4)$$

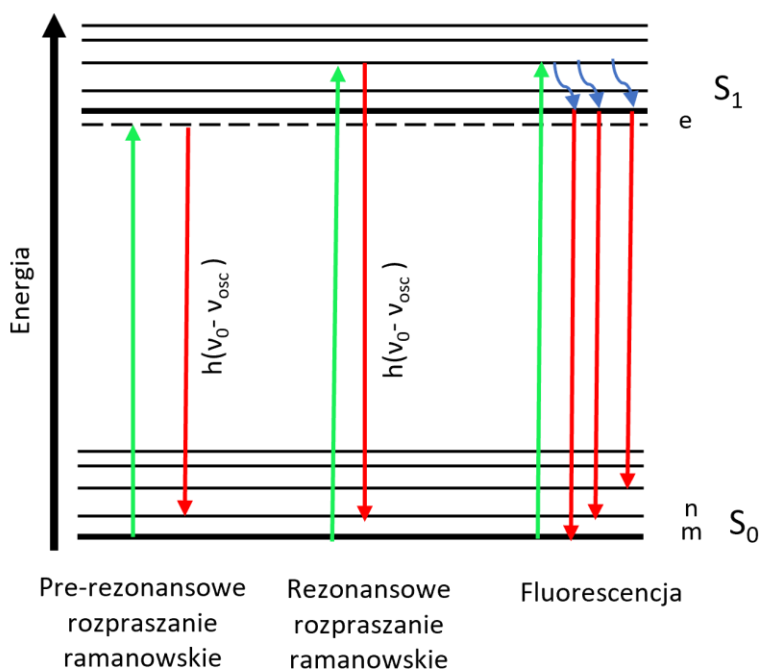
Ze względu na fakt, że rozpraszanie nieelastyczne jest słabym efektem, pasma stokesowskie i antystokesowskie mają znacznie mniejszą intensywność od pasma Rayleigha. Porównując

składową antystokesowską do stokesowskiej ma ona niższą intensywność (choć obie niosą tę samą informację o energii oscylacji molekuly), dlatego najczęściej nie jest rejestrowana w badaniach eksperymentalnych. Stosunek intensywności tych składowych zależy także od temperatury, co można obliczyć wykorzystując funkcję rozkładu Boltzmana [1,2].

Ze względu na dość niską intensywność promieniowania ramanowskiego poszukuje się metod, które umożliwiłyby ich wzmocnienie oraz czulszą detekcję. Szczególną metodą wzmacniania intensywności rozpraszania jest wykorzystanie promieniowania padającego o energii w zakresie pasma elektronowej absorpcji związku, co określa się mianem rezonansowej spektroskopii ramanowskiej (ang. *Resonance Raman Spectroscopy*, RRS, **Rysunek 3**). Postać tensora polaryzowalności można wyrazić za pomocą czasowo zależnego równania Kramera-Heisenberga na rozpraszanie, w którym w warunkach rezonansu tylko pierwszy człon jest brany pod uwagę, gdyż dąży do nieskończoności (5).

$$(\alpha_{ij})_{m,n} = \frac{1}{hc} \sum_{e \neq m,n} \frac{(M_j)_{me}(M_i)_{en}}{\nu_e - \nu_0 + i\Gamma_e} + \frac{(M_j)_{me}(M_i)_{en}}{\nu_e + \nu_0 + i\Gamma_e} \quad (5)$$

gdzie indeks e oznacza stan wzbudzony, a indeksy m i n stan początkowy i końcowy, zaś $(M_j)_{me}$, $(M_i)_{en}$ oznaczają dipolowe momenty przejść elektronowych dla kierunków i oraz j z odpowiednich stanów.



Rysunek 3. Schematy diagramu energetycznego ilustrujący pre-rezonansowe i rezonansowe rozpraszanie ramanowskie oraz fluorescencję. Zakrzywione strzałki odpowiadają bezpromienistemu rozproszeniu energii.

Stosując promieniowanie o długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji rozpraszającej molekule dochodzi do rezonansowego rozpraszania ramanowskiego skutkującego wzrostem intensywności pasm na widmie związanych z oscylacjami próbkowanego chromoforu. W sytuacji szerokich pasm absorpcji wzmocnienie sygnału można także uzyskać próbując długością fali w zakresie niemal pasma absorpcji. Jednak wykorzystując długość fali nieodpowiadającą maksimum pasma, obserwuje się zjawisko pre-rezonansowego rozpraszania ramanowskiego (**Rysunek 3**). Uzyskane w opisany sposób wzmocnienie znacząco wpływa na wzrost selektywności i czułości metody w porównaniu do spontanicznego rozpraszania ramanowskiego. Jednakże efekt pre-rezonansowego rozproszenia ramanowskiego konkuruje z elektronową emisją promieniowania — fluorescencją, ze względu na dłuższy czas życia stanu wzbudzonego, powodując niekorzystne podniesienie linii podstawy widma. Długotrwałe naświetlanie próbki podczas pomiaru ramanowskiego prowadzi do zaniku obserwowanej fluorescencji na rzecz obserwowania tylko rozpraszania, jednak równoczesna absorpcja promieniowania może doprowadzić do rozpadu próbkowanej cząsteczki [2].

Rozproszone promieniowanie o różnych częstościach odpowiada energii oscylacji odpowiednich grup funkcyjnych i związków występujących w badanym materiale, dlatego też można na podstawie zapisu widma ramanowskiego identyfikować molekularny skład badanej próbki. Dzięki temu spektroskopia ramanowska jest wykorzystywana do charakterystyki szerokiego spektrum materiałów włączając to katalizatory, polimery czy próbki biologiczne o różnym pochodzeniu [4].

1.2. Techniki spektroskopowe wykorzystujące efekty nieliniowe

Technologia laserowa istotnie wpłynęła na rozwój metod spektroskopowych zapewniając intensywne źródło monochromatycznego promieniowania. W przeciwieństwie do spontanicznego rozpraszania ramanowskiego, zastosowanie silnego pola elektrycznego powoduje, że zależność między polaryzacją ośrodka P , a przenikalnością elektryczną χ przestaje być liniowa. Zapisując polaryzację ośrodka jako szereg Taylora, przy interakcji ośrodka z silnym polem, należy wziąć pod uwagę człony wyższego rzędu (6).

$$P(t) = \epsilon_0 [\chi^{(1)}E(t) + \chi^{(2)}E^2(t) + \chi^{(3)}E^3(t) + \dots] = P^{(1)}(t) + P^{(2)}(t) + P^{(3)}(t) + \dots \quad (6)$$

Ultraszybkie impulsy promieniowania rzędu piko lub femtosekund dwóch laserów czasowo i przestrzennie dopasowanych oddziałujące z molekułami z zachowaniem warunków dopasowania fazowego, mogą być źródłem spójnego (koherentnego) wymuszonego rozpraszania ramanowskiego związanego z nieliniowymi zjawiskami optycznymi trzeciego rzędu $\chi^{(3)}$. Do metod wykorzystujących wymuszone rozpraszanie ramanowskie zalicza się m.in. koherentne antystokesowskie rozpraszanie ramanowskie (ang. *Coherent Antistokes Raman Scattering*, CARS) oraz wymuszone rozpraszanie ramanowskie (ang. *Stimulated Raman Scattering*, SRS). Zjawiska te mogą występować jednocześnie, jednakże sposób ich detekcji znacznie się różni. W obu przypadkach częstość lasera pompującego ω_p i stokesowskiego ω_s muszą być dobrane tak, aby generowały drgania spójne w fazie o częstości oscylacji badanej próbki $\omega_{osc} = \omega_p - \omega_s$. Sygnał SRS jest obserwowany poprzez pomiar spadku intensywności wiązki pompującej ω_p (ang. *Stimulated Raman Loss*, SRL) lub wzrost intensywności wiązki o stokesowskiej (ang. *Stimulated Raman Gain*, SRG) (**Rysunek 4 A, B, D**) [5–7]. Intensywności SRL ΔI_p i SRG ΔI_s zależą od ilości próbkowanych molekuł N oraz intensywności obu wiązek (7).

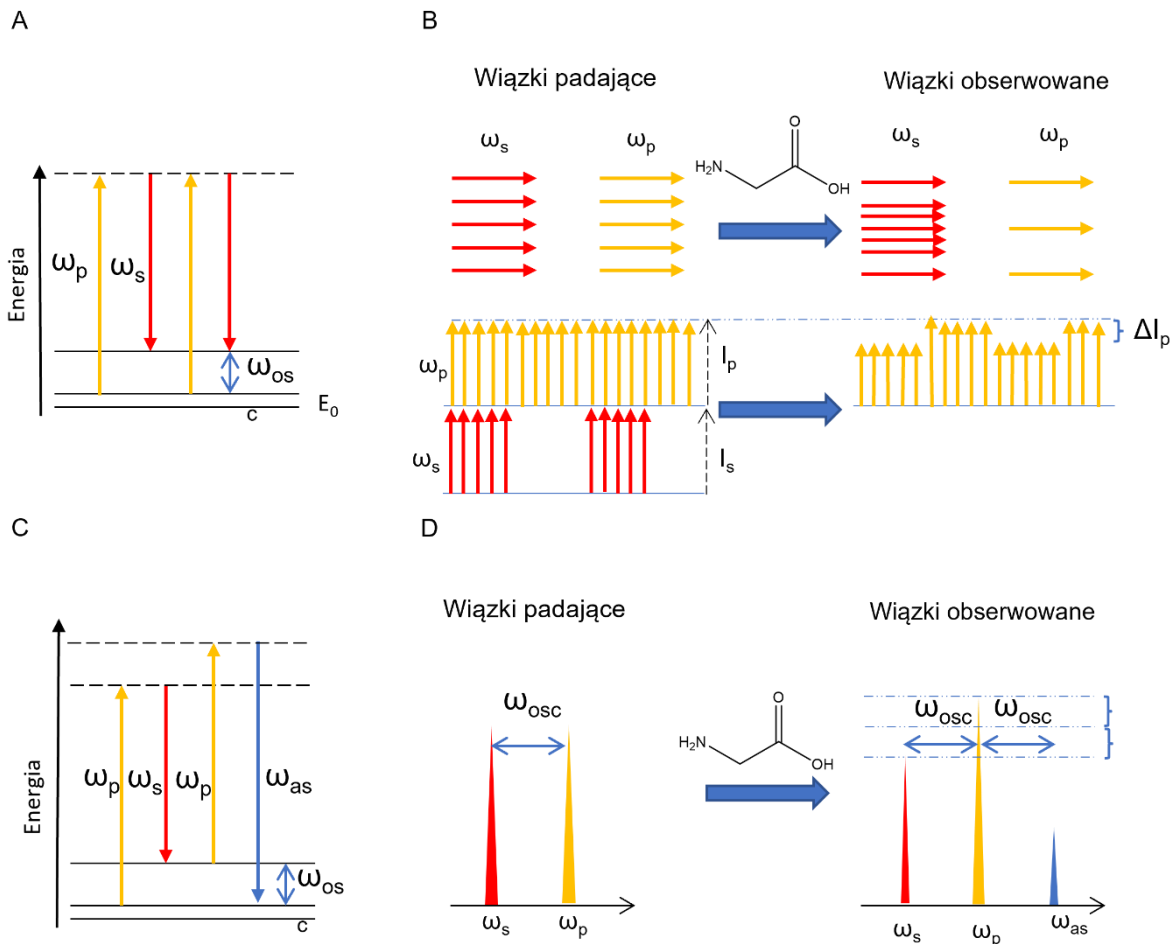
$$\Delta I_s = -\Delta I_p \propto N \operatorname{Im}(\chi^{(3)}) I_p I_s \quad (7)$$

Obecność części urojonej χ^3 w równaniu (7) powoduje, że w spektroskopii SRS nie obserwuje się nierezonansowego tła, a częstości sygnałów SRS odpowiadają częstościom pasm obserwowanych na widmach otrzymanych podczas pomiaru spontanicznego rozpraszania ramanowskiego.

W CARS boltzmanowski stosunek obsadzeń poziomów oscylacyjnych zostaje zaburzany, a generowane rozpraszanie ma częstość $\omega_{as} = \omega_p + (\omega_p - \omega_s)$ (**Rysunek 4C, D**).

$$I_{CARS} \propto N^2 |\chi^{(3)}|^2 I_p^2 I_s \quad (8)$$

Sygnał CARS (8) jest proporcjonalny od kwadratu ilości próbkowanych molekuł N oraz dodatkowo jest proporcjonalny do intensywności wiązki stokesowskiej i kwadratu intensywności wiązki pompującej. Zależność intensywności sygnału CARS od kwadratu rzeczywistej części $\chi^{(3)}$ znacznie wpływa na kształt widm, które są obarczone nierezonansowym tłem przez co różnią się od widm spontanicznego rozpraszania oraz SRS [5].



Rysunek 4 Schemat diagramu energetycznego przejść w SRS (A) oraz schemat detekcji sygnału na przykładzie pomiaru ubytku intensywności wiązki pompującej (B). Schemat diagramu energetycznego wraz z detekcją w metodzie CARS (C).

SRS i CARS to procesy koherentne zapewniające znacznie silniejsze sygnały w stosunku do spontanicznej spektroskopii ramanowskiej, co teoretycznie pozwala na osiągnięcie dużo lepszej czułości niż w przypadku rejestracji spontanicznego rozpraszania ramanowskiego. Jednakże w praktyce obie techniki nie są pozbawione wad. Podstawową wadą CARS są sygnały pochodzące od innych nieliniowych efektów związanych z mieszaniem czterech fal (ang. *Four wave mixing*, WFM), które interferując z sygnałem CARS tworząc tzw. nierezonansowe tło. Z kolei sygnał SRS jest bardzo trudny w detekcji i wymaga zastosowania skomplikowanej aparatury i technik związanych z modulacją jednej z wiązek świetlnych oraz homodynowej detekcji z użyciem wzmacniacza fazoczułego typu *lock-in*. Warto zauważyć, że obie techniki z uwagi na nieliniowość procesu, pozwalają na detekcje ze zwiększoną rozdzielczością w porównaniu do spontanicznej spektroskopii ramanowskiej. Dodatkową zaletą jest także to, że w przeciwieństwie do spontanicznego Ramana, w technikach koherentnych (ang. *Coherent Raman Scattering*, CRS) pomiar adresujemy do wybranego

drżania molekuł zamiast całego spektrum, co pozwala na dużo szybsze obrazowanie z użyciem tych technik. Na rzecz szybkości tracimy jednak wszechstronność technik CRS. Z pomocą przychodzą tu jednak rozwijane multipleksowe systemy CRS pozwalające na rejestrację szerokiego zakresu spektralnego z szybkością i rozdzielczością typową dla CRS, jednakże są to bardzo skomplikowane rozwiązania niedostępne komercyjnie [5].

W świetle wymienionych wyżej zalet i wad, koherentne rozpraszanie ramanowskie znajduje szereg zastosowań do charakterystyki materiałów zarówno nieorganicznych (ciekłe kryształy, katalizatory) oraz biologicznych [5,7,8]. W szczególności połączenie spektroskopii CRS z mikroskopią ma potencjał do wspierania diagnostyki w klinikach.

1.3. Obrazowanie z użyciem spontanicznego rozpraszania ramanowskiego

Wyposażenie spektrometru ramanowskiego w konfokalny mikroskop optyczny pozwala na wysokorozdzielczą rejestrację pojedynczych widm z niewielkiej objętości próbki zwanej wokselem, dzięki czemu możliwa jest charakterystyka badanych obiektów o dużej heterogeniczności. Obrazowane w płaszczyźnie wertykalnej jest możliwe dzięki zastosowaniu systemu konfokalnego z przesłoną (ang. *pinhole*), która zapobiega trafianiu do detektora promieniowania rozproszonego pochodzącego spoza płaszczyzny obrazowania (**Rysunek 5 A**). Soczewka obiektywu skupia światło laserowe na próbce, a następnie zbiera promieniowanie rozpraszane, które jest przekazywane do spektrometru i detektora półprzewodnikowego (ang. *Charge Coupled Device, CCD*) [2]. Filtr tzw. *laser-line* zawęża szerokość spektralną linii lasera wzbudzającego z dokładnością do pojedynczych nm, natomiast filtr górno-przepustowy lub filtr typu *notch* eliminuje sygnał ze światła powstałego w wyniku rozpraszania Rayleigha. Zastosowanie promieniowanie z zakresu UV (ultrafiolet < 400 nm) lub NIR (podczerwień > 800 nm) wymaga specjalnych elementów optycznych [4]. Ogniskowanie widzialnego światła lasera wzbudzającego o długości fali λ przez obiektyw mikroskopu o dobrze zdefiniowanej aperturze numerycznej NA (ang. *Numerical Aperture, NA*) pozwala na uzyskanie rozdzielczości lateralnej (Δx , **(9)**) oraz przestrzennej w głąb (Δz , **(10)**) zgodnie z kryterium Rayleigha [2]:

$$\Delta x = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (9)$$

$$\Delta z = \frac{\lambda}{NA^2} \quad (10)$$

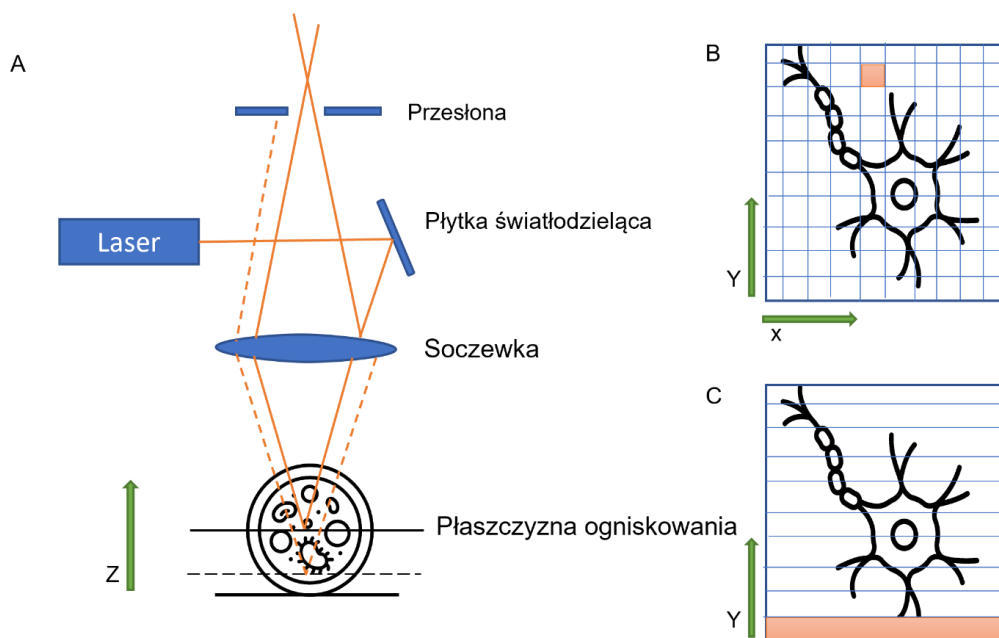
W przypadku nieliniowych technik CRS zarówno rozdzielczość lateralna, jak i podłużna (w głąb) ulegają polepszeniu zgodnie z równaniami 11 i 12:

$$\Delta x = \sim 0,32 \frac{\lambda}{\sqrt{2}NA} \quad (11)$$

$$\Delta z = \sim 0,532 \frac{\lambda}{\sqrt{2}} \left(\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right) \quad (12)$$

gdzie n to współczynnik załamania ośrodka w którym rozchodzi się światło [9].

Obrazowanie spektroskopowe „punkt po punkcie” generuje dane wielowymiarowe, których analiza wymaga zastosowania metod redukcji informacji i panelu metod chemometrycznych (**Rysunek 5 B**). Alternatywą jest iluminacja liniowa (**Rysunek 5 C**), pozwalająca na jednoczesny pomiar widm kierunku y , podczas gdy kierunek x jest mapowany.



Rysunek 5 Schemat działania mikroskopu konfokalnego (A). Iluminacja punktowa (B) i liniowa (C) wykorzystywane w obrazowaniu ramanowskim.

W obrazowaniu globalnym lub szerokopolowym cały obrazowany obszar jest oświetlany przez laser wzbudzający. Pożądaný zakres spektralny rozproszonego światła wybiera się za pomocą elementu filtrującego zamiast spektrometru. Rozpraszane światło jest następnie ogniskowane na kamerze CCD za pomocą optyki zachowującej obraz, dzięki czemu

odczytywane jest natężenie wybranego zakresu spektralnego dla każdego piksela. To podejście pozwala uzyskać wysoką rozdzielczość przestrzenną obrazów ramanowskich w krótkim czasie, jednak rozdzielczość spektralna jest niższa niż opisanych wyżej technikach [4].

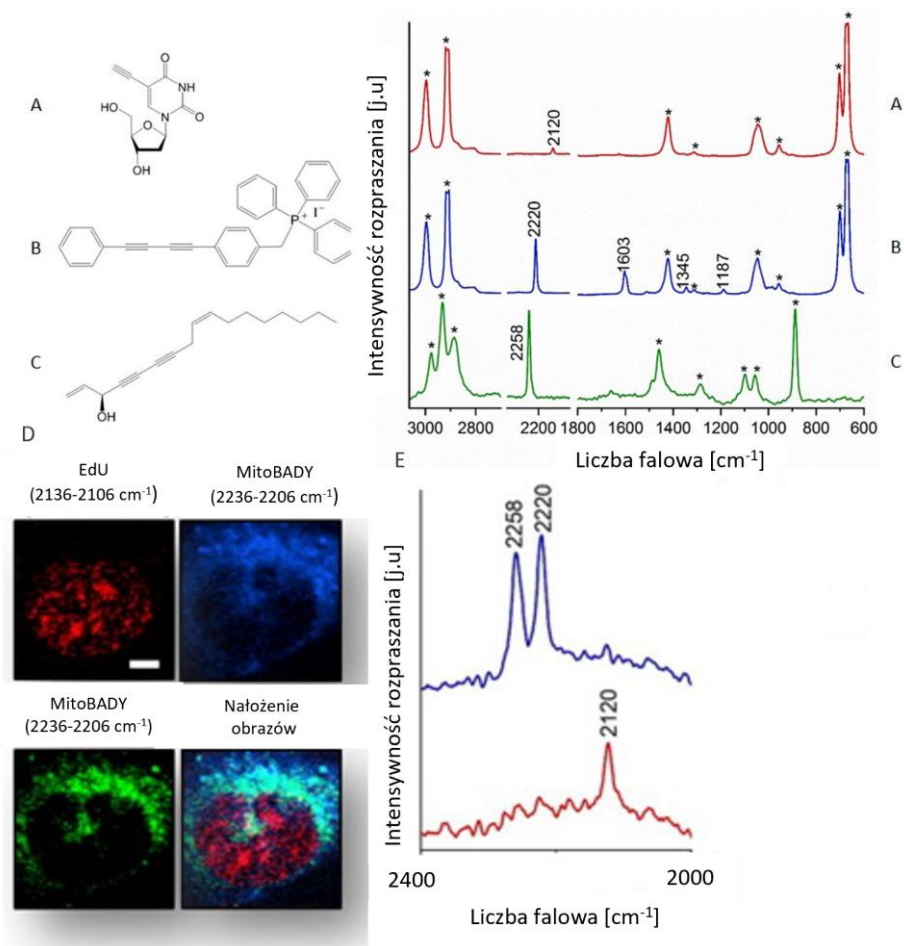
1.4. Bezznacznikowe i znacznikowe podejście do spektroskopii ramanowskiej

Spektroskopia ramanowska umożliwia detekcję składu chemicznego badanej próbki bez konieczności jej znakowania dodatkowymi fluoroforami czy izotopami, co pozwala uniknąć procedur mogących zmienić właściwości próbki, a nawet ją uszkodzić. Badania spektroskopowe złożonych materiałów, do jakich należą przede wszystkim układy biologiczne, są dodatkowo skomplikowane ze względu na mnogość rejestrowanych sygnałów, które mogą się ze sobą nakładać utrudniając interpretację wyników lub prowadząc do błędnych wniosków dotyczących składu czy stężenia składników. Jest to szczególnie zauważalne w zakresie daktyloskopowym (ang. *fingerprint*) ($1800\text{-}300\text{ cm}^{-1}$) i drgań C-H rozciągających ($3030\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$) [10]. W ciągu ostatniej dekady wzrosło znacząco zainteresowanie technikami obrazowania ramanowskiego w zakresie identyfikowania zmian biochemicznych w różnych modelach chorób *ex vivo*, *in vivo*, oraz *in vitro*. Jednakże, mimo znacznych korzyści płynących z poprawy zdolności rozdzielczej mikroskopów ramanowskich nadal sporym wyzwaniem jest badanie pierwotnych procesów komórkowych zachodzących w specyficznych organelach komórkowych.

Wnioskowanie o rozkładzie i stanie biochemicznym organelli komórkowych technikami obrazowania ramanowskiego wymaga śledzenia pasm charakterystycznych dla związków specyficznych lub dominujących w tych strukturach. Niemniej jednak, nie ma markera ramanowskiego dla małych organelli (m.in. lizosomów czy rybosomów). Lokalizacja jądra komórkowego jest wskazywana na podstawie drgań kwasów nukleinowych i drgań PO_2^{2-} łańcucha bocznego DNA, położenie siateczki śródplazmatycznej identyfikowane jest na podstawie dystrybucji fosfolipidów. Szczególne trudności może przynosić badanie spektroskopią ramanowską mitochondriów zawierających m.in. cytochrom C, którego zredukowana forma (Fe^{2+}) na widmie absorpcyjnym UV-Vis poza pasmem Soreta przy 415 nm, wykazuje obecność pasm absorpcji elektronowej α i β odpowiednio przy długości fali 550 i 520 nm. Pod wpływem długotrwałego naświetlania związek ten utlenia się wykazując znacznie niższą intensywność rozpraszania. Co więcej, podniesiona linia podstawy widma

w wyniku konkurencji fluorescencji i rezonansowego rozpraszania ramanowskiego może wpłynąć na błędne wnioski odnośnie zawartości cytochromu, a tym samym stanu mitochondriów [8]. W celu wyeliminowania powyżej opisanych problemów co raz częściej w badaniach wykorzystuje się tak zwane molekularne reportery ramanowskie, które ze względu na obecność charakterystycznej struktury cechują się obecnością pasma w zakresie 2800-1800 cm^{-1} zwanym „zakresem cichym” na widmie komórkowym. W zakresie tym obserwuje się głównie drgania wiązań potrójnych oraz związków podstawionych izotopowo deuterem.

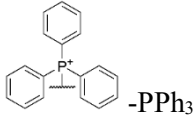
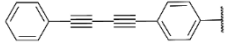
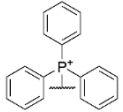
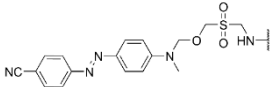
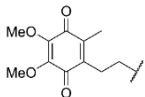
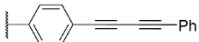

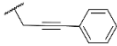
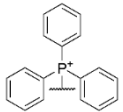

Molekularne reportery ramanowskie przeważnie są zbudowane z grupy kierującej, o powinowactwie do wybranych struktur komórkowych oraz z części sygnałowej (reporterowej). Dobrze zaprojektowane reportery o odpowiednio wąskich i odizolowanych od siebie pasmach pozwalają jednocześnie śledzić dystrybucję kilku struktur komórkowych, co pokazano na przykładzie zawierających wiązania potrójne: 5-etynylo-2'-deoksyurydyny (EdU) (2120 cm^{-1}) (**Rysunek 6 A**), MitoBADY (2220 cm^{-1}) (**Rysunek 6 B**) i falkarinolu (2258 cm^{-1}) (**Rysunek 6 C**) [11]. EdU, analog tyminy, w czasie duplikowania materiału genetycznego jest wbudowane w jego strukturę, MitoBADY ze względu na dodatni ładunek i znaczną lipofilowość akumuluje się w mitochondriach oraz przy wydłużonym czasie inkubacji lub wysokim stężeniu także w strukturach lipidowych, natomiast falkarinol przede wszystkim odkłada się w siateczce śródplazmatycznej (**Rysunek 6 D E**). Idealne reportery ramanowskie poza wąskimi pasmami muszą się charakteryzować neutralnością dla badanego układu biologicznego, aby nie powodować wtórnych zmian w badanym układzie.

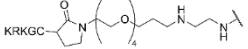
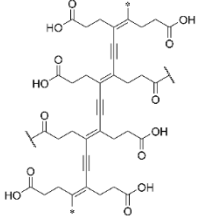
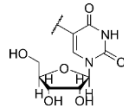


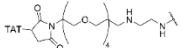
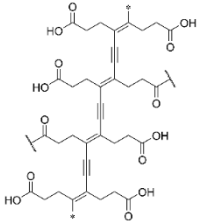
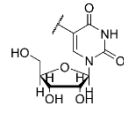
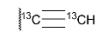


Rysunek 6 Wzór 5-etynylo-2'-deoksyurydyny (EdU) (A), MitoBADY (B) i falkarinolu (C) wraz z widmami ramanowskimi ich roztworów o stężeniu 10 g/l w DMSO (A, B) i etanolu (C). Pasma rozpuszczalnika zaznaczono gwiazdką. Obrazy dystrybucji reporterów ramanowskich dla reprezentacyjnej komórki linii komórkowej HMEC-1 inkubowanej z 20 μM EdU przez 24h, 400 nM MitoBADY przez 2h i 50 μM falkarinolu przez 2 h otrzymano poprzez integrację pasm w zakresie spektralnym 2136-2106 cm^{-1} (EdU), 2236-2206 cm^{-1} (MitoBADY), 2270-2250 cm^{-1} (falkarinol) (D). Średnie widma ramanowskie obszaru cytoplazmy (niebieskie widmo) i jądra (czerwone widmo) (E). Pomiaru komórek dokonywano z czasem integracji 0,5 s i krokiem 0,5 μm , roztwory badanych reporterów mierzono z czasem integracji 1s i 25 akumulacjami. Moc lasera mierzona przed obiektywem wynosiła 20 mW. Rysunek przedrukowany z [11].

Badania nad reporterami oraz ich zastosowaniami są wciąż rozwijane ze względu na swój potencjał aplikacyjny. Poniżej zestawiono dotychczas opisane w literaturze związki stosowane jako molekularne reportery ramanowskie wykorzystywane do czułego i szybkiego obrazowania mitochondriów, DNA, RNA, siateczki śródplazmatycznej (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) i lizosomów.

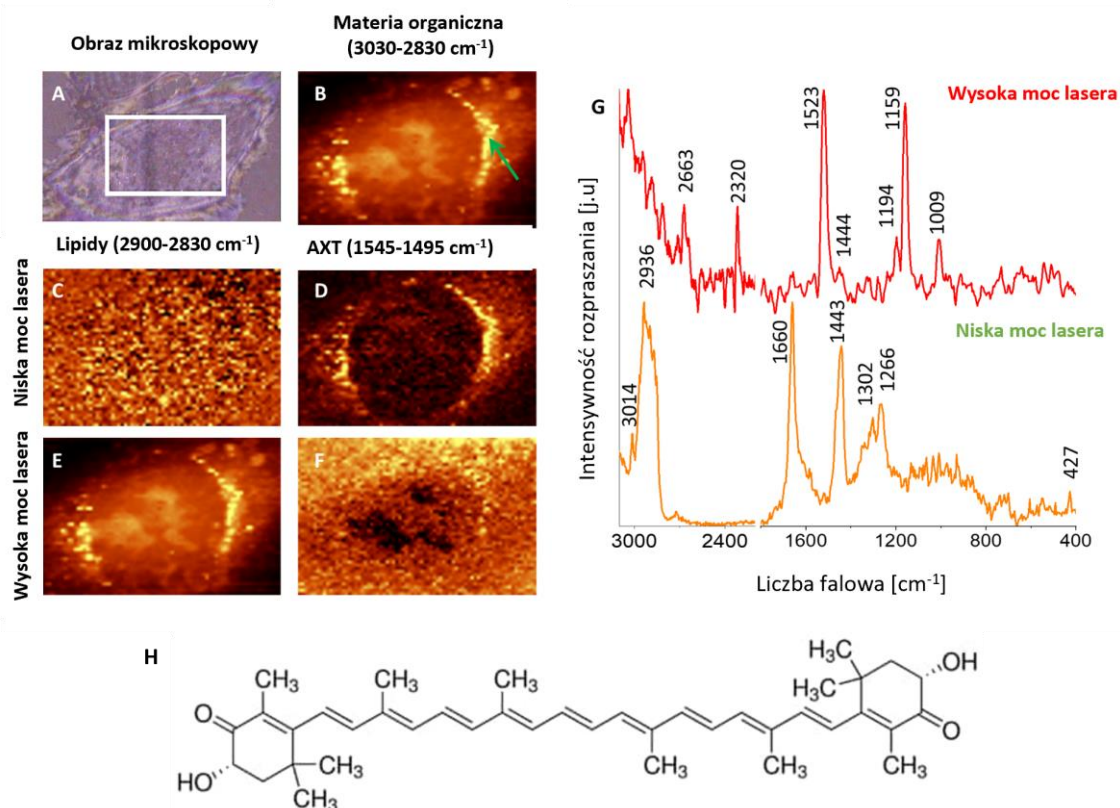
Tabela 1 Aktualne zestawienie reporterów ramanowskich do obrazowania organelli na podstawie [8]

Nazwa	Grupa kierująca	Grupa sygnałowa	Cel komórkowy	Polożenie pasma (cm ⁻¹)	Referencja
MitoBADY			Mitochondria	2220	[11–14]
MitoAzo				1375	[15]
AITQ2				2249	[16]
AltQ4				2258	
AltQ5				2231	
Mito-Carbow2141				2141	[17]

P3			2120	[18]	
EdU			DNA	2122	[11,19,20]
Modyfikacje EdU orto-karboranem				2203(C≡C) i 2631 (B- B)	[21]
P4	 TAT: CRRRQRRKKR		2120	[18]	
¹³C EU			RNA	2077	[22]

Nϵ-[(2- propynyloksy)-carbonyl]-L-lizyna			ER	2135	[23]
D5-Glutamina	$\begin{array}{c} \text{D} \\ \text{O} \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CD}_2 \\ \\ \text{CD}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	C-D		2067	[24]
Carbow 2226 ER				2226	[17]
BlackBerry Quencher 650 (BBQ-650)-LYSO			Lizosomy	1087-1133	[25]
PDDA-LYSO				2120	[18]

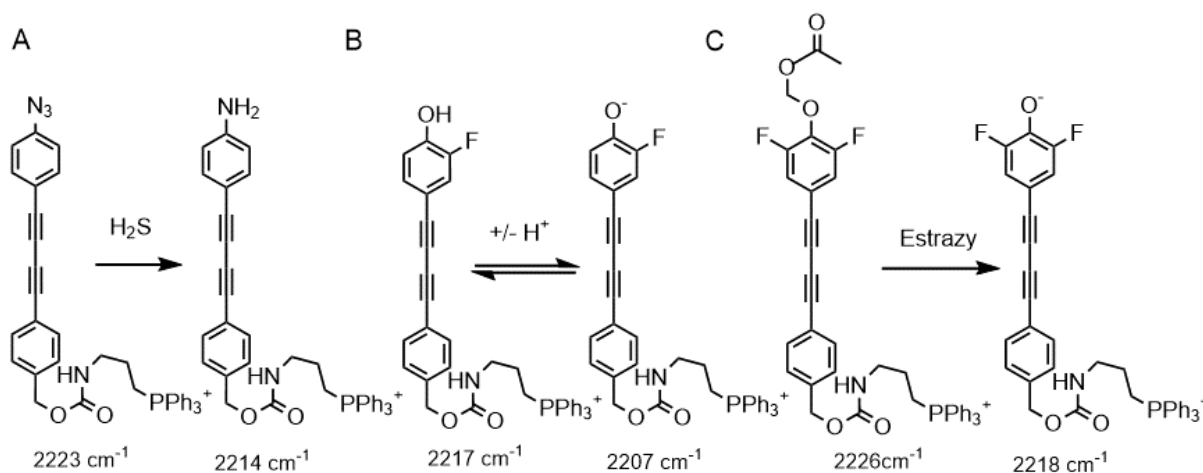
Innym przykładem znakowanego reporterami ramanowskimi obrazowania komórek jest zastosowanie (3S, 3'S)-astaksantyny (AXT), naturalnego ksantofilu o właściwościach hydrofilowych i wysokiej rozpuszczalności w lipidach. AXT zawiera grupę chromoforową w postaci długiego polienowego łańcucha składającego się z jedenastu sprzężonych wiązań C=C, w tym dwóch w strukturze pierścieni (**Rysunek 7 H**). AXT absorbuje w zakresie promieniowania widzialnego, pokrywającego się z energią wzbudzenia laserów powszechnie stosowanych w badaniach próbek biologicznych (zakres widzialny), co pozwala otrzymać rezonansowe widma ramanowskie z pasmami charakterystycznymi przy ok. 1520, 1158, i 1008 cm^{-1} (**Rysunek 7 G**). AXT gromadzi się w strukturach lipidowych komórek stając się markerem ich obecności i dystrybucji w sposób zależny od czasu inkubacji, co daje możliwość nie tylko obrazowania bogatego w lipidy obszaru okołojądrowego, w tym siateczki śródplazmatycznej, ale również oPtoczki jądrowej (**Rysunek 7 A-F**) stosując niewielką moc lasera minimalizując możliwość uszkodzenia próbki [13,26].



Rysunek 7 Dystrybucja lipidów w komórce śródbłonna linii komórkowej HMEC-1 inkubowanej z 10 μM AXT przez 3 h. Obraz mikroskopowy (A) oraz ramanowski dla drgań C-H rozciągających (B) uzyskany przez integrację pasm w zakresie spektralnym 3030-2830 cm^{-1} obrazując dystrybucję materii organicznej, lipidów (C, E) w zakresie 2900-2830 cm^{-1} i AXT w zakresie 1595-1545 cm^{-1} (D, F) mierzone przy odpowiednio niskiej (~ 3 mW) i wysokiej (~ 30 mW) mocy lasera. Pojedyncze widma ramanowskie (G) kropli lipidowej uzyskane przy niskiej i wysokiej mocy lasera (widmo z punktu zaznaczonego zieloną strzałką na B). Obrazowanie ramanowskie przeprowadzono

z wykorzystaniem lasera o długości wzbudzenia 532 nm oraz dla czasu akwizycji pojedynczego widma 0,5 s i kroku 0,5 μm . Obraz przedrukowano z referencji [26]

Reportery ramanowskie projektowane są również w celu dostarczanie informacji o parametrach fizykochemicznych układu takie jak detekcja H_2S (**Rysunek 8 A**) [27], F^- [28], pH wewnątrz mitochondriów (**Rysunek 8 B**) [29], czy do oceny aktywności enzymów (**Rysunek 8 C**) [30].



Rysunek 8 Reportery ramanowskie do detekcji (A) H_2S , (B) pH oraz (C) aktywności enzymatycznej estراز.

Badania dotyczące projektowania nowych molekularnych reporterów ramanowskich koncentrują się głównie na zwiększeniu wydajności obrazowania ramanowskiego, ze szczególnym naciskiem na zastosowanie w obrazowaniu SRS. Rzeczywista lokalizacja subkomórkowa tych związków jest często szacowana w odniesieniu do mikroskopii fluorescencyjnej wykorzystującej znaczniki o szerokim paśmie emisji. Dlatego też zastosowanie reporterów ramanowskich wydaje się być obiecującym podejściem do osiągnięcia lepszej czułości obrazowania ramanowskiego (zarówno opartego na detekcji rozpraszania spontanicznego, jak i wymuszonego) oraz oferuje atrakcyjną możliwość wykrywania i identyfikacji zmian biochemicznych na poziomie pojedynczych organelli.

2. Metody analizy danych spektroskopowych

Zastosowanie metod statystycznych i numerycznych do zaprojektowania optymalnych warunków eksperymentalnych oraz zmaksymalizowania ilości informacji chemicznej otrzymanej podczas interpretacji danych jest określane mianem chemometrii [31–33]. Obejmuje ona szereg algorytmów niezbędnych do analizy i wizualizacji danych wielowymiarowych uzyskiwanych podczas obrazowania ramanowskiego i SRS, będących wiodącymi technikami badawczymi niniejszej rozprawy. Jednym z podejść stosowanych w chemometrii jest rozpoznawanie wzorców (ang. *pattern recognition*) zawartych w zbiorze analizowanych danych, obejmujące ich grupowanie na podstawie podobieństwa (**Rozdział 2.3**) oraz klasyfikacji (**Rozdział 2.4**). Istotne jest również wykorzystanie metod kalibracji do modelowania zależności między czynnikami, a odpowiedzią badanego układu [31,32].

2.1. Eliminacja artefaktów z widm ramanowskich

Widma ramanowskie niejednokrotnie są obciążone obecnością artefaktów i zaburzeń wynikających z właściwości próbki oraz z niedoskonałości aparatury. Artefakty te przed przystąpieniem do analizy i interpretacji danych muszą zostać skorygowane. Pierwszym krokiem przygotowania zarejestrowanych danych jest usunięcie intensywnych pasm o niewielkiej szerokości połówkowej związanych z detekcją wysokoenergetycznych kwantów promieniowania przez kamerę CCD. Ich położenie na widmie jest przypadkowe i przeważnie są rejestrowane na pojedynczych widmach lub pikselach w puli wszystkich zarejestrowanych widm/pikseli [34]. Korekta promieniowania kosmicznego najczęściej polega na interpolacji fragmentu widma na podstawie widm z przylegających pikseli. Istotne jest również ujednolicenie przesunięcia ramanowskiego np. względem widma referencyjnego lub wybranego pasma, tak aby dane zarejestrowane w kolejnych eksperymentach lub ich niezależnych powtórzeniach miały zgodne wartości przesunięcia ramanowskiego poszczególnych pasm [34,35].

Ze względu na możliwą fluorescencję związków biologicznych czy obecność zanieczyszczeń wpływających na kształt widm oraz intensywność pasm, linia podstawy widma musi także zostać skorygowana. Pośród wielu algorytmów korekty linii podstawy widm można wyróżnić:

— Odejmowanie wielomianu dopasowanego do wybranego zakresu wartości przesunięć ramanowskich. Rząd wielomianu w przypadku braku nakładających się efektów fluorescencji może wynosić 1 lub 0, natomiast ich występowanie powoduje konieczność dobrania wielomianu wyższego rzędu [34,36].

— Przedstawianie widm w postaci drugiej pochodnej pozwala wyeliminować problemy związane z linią podstawy. To podejście jest rzadziej wykorzystywane w spektroskopii ramanowskiej, w której widma próbek biologicznych zwykle cechuje gorszy stosunek sygnału do szumu, niż np. w przypadku spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni. W celu uniknięcia wzmocnienia wpływu szumu w czasie obliczeń drugiej pochodnej widm dodatkowo wprowadza się metody wygładzania np. algorytmem Savitzky-Golay [31,34,36].

— Usuwanie linii podstawy metodą najmniejszych kwadratów. Linia podstawy jest szacowana dla kilku widm ramanowskich, natomiast suma kwadratów różnicy między surowym sygnałem, a linią podstawową jest iteracyjnie minimalizowana. Aby zapewnić dodatnie wartości błędu standardowego oraz ich minimalizację, asymetryczna metoda najmniejszych kwadratów wprowadza dodatkowy człon pochodnej drugiego rzędu [34,36–38].

— Multiplikatywna Korekta Sygnału (ang. *Multiplicative Signal Correction*, MSC) pozwala na uzyskanie jak największego podobieństwa pomiędzy widmem s , a referencją m (najczęściej widmem średnim) poprzez uwzględnienie różnych fizycznych i chemicznych źródeł zmienności widm (np. stałe przesunięcie a , efekty multiplikatywne b , oraz resztę niewęglonych efektów E) (13) z wykorzystaniem zwykłej lub ważonej metody najmniejszych kwadratów.

$$s(\bar{\nu}) = a + bm(\bar{\nu}) + E(\bar{\nu}) \quad (13)$$

Optymalizacja parametrów metodą najmniejszych kwadratów pozwala uzyskać widmo s_{corr}

$$s_{corr}(\bar{\nu}) = \frac{s(\bar{\nu}) - a}{b} \quad (14)$$

Metoda ta jest używana również do normalizacji poprzez eliminację efektów wzmocnienia i stałego przesunięcia zależnych od długości fali między widmami a wzorcem, a także efektów fizycznych związanych z temperaturą, grubością próbek [34,36,39].

—Rozszerzona Multiplikatywna Korekta Sygnału (ang. *Extended Multiplicative Signal Correction*, EMSC), która po za stałymi efektami linii podstawy i normalizacją widm

uwzględnia zależne od przesunięcia ramanowskiego zmiany linii podstawowej przy użyciu wielomianów o rosnącym stopniem $d_n \bar{\nu}^n$, [34,36,39].

$$s(\bar{\nu}) = a + bm(\bar{\nu}) + d_1 \bar{\nu} + d_2 \bar{\nu}^2 + \dots + d_n \bar{\nu}^n + E(\bar{\nu}) \quad (15)$$

$$s_{corr}(\bar{\nu}) = \frac{s(\bar{\nu}) - a - d_1 \bar{\nu} - d_2 \bar{\nu}^2 - \dots - d_n \bar{\nu}^n}{b} \quad (16)$$

— Korekta linii podstawy z dopasowaniem okręgu (ang. *Rolling-Circle Filter*, RCF). Linie podstawy szacuje się poprzez toczenie okręgu o odpowiedniej wielkości w kontakcie z widmem. Promień krzywizny koła jest mniejszy niż promień linii podstawy, ale większy niż promień widma ramanowskiego, tak aby koło było styczne do linii podstawy, ale nie do widma. Ostatecznie linie podstawy można obliczyć łącząc łuki okręgów stycznych do linii bazowej [38,40].

Szum jest nieodłącznym składnikiem każdego mierzzonego sygnału, który usuwany jest np. algorytmami wygładzania (usuwającymi składowe o wysokiej częstotliwości) i odsumiania (eliminuje tylko składowe sygnału o ograniczonej amplitudzie). Najbardziej rozpowszechnione w opracowywaniu danych ramanowskich jest wykorzystanie algorytmu Savitzky'ego-Golay'a, który zakłada dopasowanie wielomianu do kilku sąsiadujących przesunięć ramanowskich (zwane oknem). Dopasowana wartość wielomianu jest zachowywana dla centralnego punktu, a następnie okno jest przesuwane o jeden punkt i dopasowanie jest powtarzane [34,36]. Wykorzystywane są również metody oparte na transformacie Fouriera czy transformacie falkowej, które zakładają, że składowe szumu linii podstawowej i sygnału rzeczywistego są dobrze rozdzielone w dziedzinie częstotliwości. Jako że, częstotliwości związane z linią podstawową widma (niska częstotliwość) i szumem (wysoka częstotliwość) są różne w porównaniu z rzeczywistymi pasmami ramanowskimi (średnia częstotliwość), przy optymalnej rozdzielczości spektralnej można zastosować odpowiednie progi w celu jednoczesnego wyeliminowania linii podstawowej i szumu. Następnie, poprawiony sygnał ramanowski może być uzyskany przez odpowiednią odwrotną transformację Fouriera oraz odwrotną transformację falkową [31,36].

Grubość próbki, fluktuacje mocy lasera czy wybór płaszczyzny ogniskowania mogą wpływać na intensywność rejestrowanych widm, dlatego ich wzajemne porównywanie wymagają zastosowania algorytmów skalowania zwanych normalizacją. Poza wymienionymi wyżej metodami MSC i EMCS dostępnych jest szereg metod normalizacji, wśród których najczęściej stosowane są:

— Normalizacja względem wybranego pasma.

— Normalizacja wektorowa. Norma widma jest definiowana jako pierwiastek kwadratowy sumy kwadratów intensywności q (17). Następnie wartości intensywności dla kolejnych przesunięć ramanowskich J są dzielone przez normę (18) [34,36].

$$q = \sqrt{\sum_{i=1}^J s_i^2} \quad (17)$$

$$s_{i,norm} = \frac{s_i}{q} \quad (18)$$

— Normalizacja min-max wykorzystująca minimalną s_{min} i maksymalną s_{max} wartość intensywności widma. Następnie intensywność znormalizowanego widma jest obliczenia poprzez odjęcie minimalnej wartości intensywności i podzielenie przez różnicę intensywności maksymalnej i minimalnej (19) [34].

$$s_{i,norm} = \frac{(s_i - s_{min})}{(s_{max} - s_{min})} \quad (19)$$

— Normalizacja metodą standardowej normalnej wariancji (ang. *Standard Normal Variate*, SNV). Intensywność znormalizowanego widma definiuje się jako różnicę między wartością intensywności s_i a wartością średnią intensywności s_{mean} następnie podzieloną przez jej odchylenie standardowe s_{std}

$$s_{i,norm} = \frac{s_i - s_{mean}}{s_{std}} \quad (20)$$

2.2. Analiza obrazów

Połączenie mikroskopii z spektroskopią oraz rozwój kamer CCD wpłynęły znacząco na wzrost popularności obrazowania ramanowskiego, generującego wymagające w interpretacji dane o strukturze wielowymiarowej. W celu określenia dystrybucji wybranych składników w próbce wykorzystuje się analizę obecności pasm charakterystycznych dla ich grup funkcyjnych. Intensywność obserwowanych pasm jest liniowo zależna od stężenia oscylatora w danym punkcie. Wobec tego obliczenie pola powierzchni pod pasmem świadczącym o obecności danej struktury oraz graficzne przedstawienie wartości obliczonej całki na obrazie w skali kolorystycznej (tzw. kodowanie kolorystyczne) pozwala śledzić nie tylko obecność, ale także i zawartość danego składnika na obrazie ramanowskim. To podejście jest określane mianem analizy integracyjnej lub analizy pasm charakterystycznych (markerowych).

Jak wcześniej opisano, pasma charakterystyczne niektórych związków biologicznych, ze względu na zbliżone energie oscylacji grup funkcyjnych, mogą nakładać się ze sobą, dlatego do analizy jakościowej i ilościowej warto odpowiednio dobrać dobrze izolowane pasma charakterystyczne. Kodowanie kolorystyczne w odpowiedniej skali intensywności czy nakładanie się obrazów dystrybucji w domenie przestrzennej jest dogodną metodą wizualizacji danych spektroskopowych. W **Tabela 2** przedstawiono najczęściej obserwowane na widmach ramanowskich komórki pasma markerowe związków organicznych obecnych w układów biologicznych. Omawiając analizę obrazów prezentujących dystrybucję wartości intensywności wybranych pasm warto zwrócić uwagę na możliwość zwiększenia specyficzności poprzez szereg działań matematycznych na odpowiednio przygotowanych obrazach integracyjnych w domenie spektralnej. Podejście to stanowi podstawę analizy ratiometrycznej w RS i SRS, pozwalając na wyodrębnienie większej ilości informacji specyficznych pod względem chemicznym oraz ilościowym [41,42].

Tabela 2 Zestawienie istotnych pasm charakterystycznych wraz z przypisaniem.

Pasmo/zakres (cm⁻¹)	Przypisanie	Grupa związków	Referencja
720-725	Drgania grup N ⁺ (CH ₃) ₃	Cholina (fosfo- i sfingolipidy)	[43]
750	Drgania oddychające pierścienia porfirynowego	Hemoproteiny	[44,45]
790	Drgania oddychające zasad azotowych U, T, C	DNA i RNA	[46]
1006	Drgania oddychające fenyloalaniny	Białka	[10,47]
1440-1455	Drgania deformacyjne CH ₂	Białka, lipidy	[10,44,46,48]
1650-1680	Drganie amidowe I oraz rozciągające C=C	Białka, lipidy nienasycone	[10,43,48]
2850-2890	Drgania rozciągające CH ₂	Lipidy	[10,43,48]
2930	Drgania rozciągające CH ₃	Białka	[10,48]
3005-3015	Drgania rozciągające grupy C=C-H	Lipidy nienasycone	[10,43,48]
3030-2800	Drgania rozciągające grup C-H	Związki organiczne	[10,48]

2.3. Metody uczenia nienadzorowanego

Metody analizy danych oparte na nauczaniu nienadzorowanym zakładają grupowanie danych bez wykorzystywania informacji o ich przynależności do konkretnej klasy. Jedną z takich metod jest grupowanie w skupienia na podstawie analizy odległości między obiektami zwane analizą skupień (ang. *Cluster Analysis*, CA). Przynależność obiektu do klasy określa się za pomocą np.: odległości euklidesowej ((21), **Rysunek 9 A**), odległości typu miejskiego (Manhattan) ((22) oraz **Rysunek 9 B**), odległości Mahalanobisa (23) lub współczynnika wzajemnej korelacji Pearsona (24) [2,32].

$$d_n(\bar{x}, \bar{y}) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2} \quad (21)$$

$$d_n(\bar{x}, \bar{y}) = \sum_{i=1}^n |y_i - x_i|^2 \quad (22)$$

$$d_n(\bar{x}, \bar{y}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2}{\sigma_x \sigma_y}} \quad (23)$$

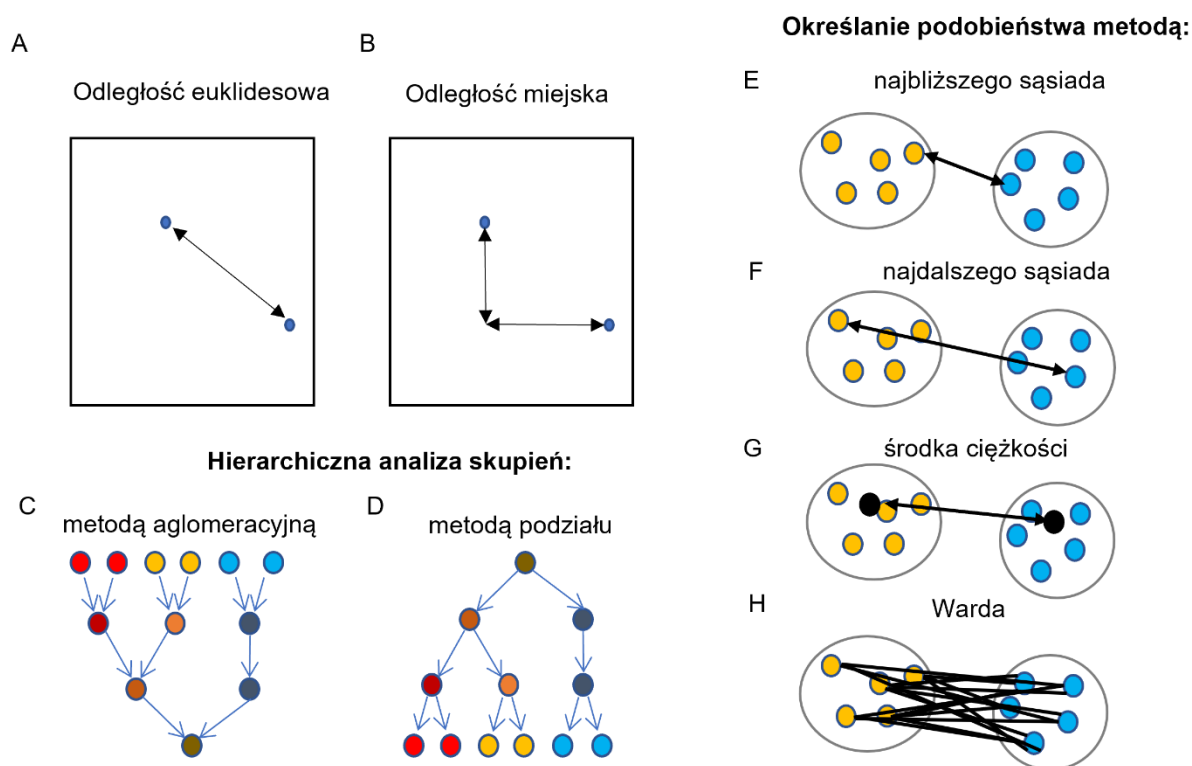
$$\rho_{x,y} = \frac{cov(x,y)}{\sigma_x \sigma_y} \quad (24)$$

Skupienia mogą być tworzone w sposób hierarchiczny (ang. *Hierarchical Cluster Analysis*, HCA), traktując każdy obiekt jako klasę i łącząc je w większe (metoda aglomeracyjna) (**Rysunek 9 C**) lub dzieląc skupienie zawierające wszystkie badane obiekty na mniejsze (metoda podziału) (**Rysunek 9 D**). Graficznie wyniki HCA można przedstawić w postaci dendrogramu.

W HCA podobieństwo między poszczególnymi skupieniami określa się w oparciu o jedną z poniższych metod [2,32]:

- najbliższego sąsiada (ang. *Single Linkage*) (**Rysunek 9 E**), gdzie wyznaczana jest najmniejsza odległość między skupieniami. Formowane skupienia są duże i wydłużone.
- najdalszego sąsiada (ang. *Complete Linkage*) (**Rysunek 9 F**), gdzie wyznaczana jest największa odległość między skupieniami. Powstające skupienia są małe sferyczne i dobrze upakowane.
- średnich połączeń (ang. *Average Linkage*), gdzie wyznacza się średnią odległość między wszystkimi parami obiektów należących do dwóch różnych skupień

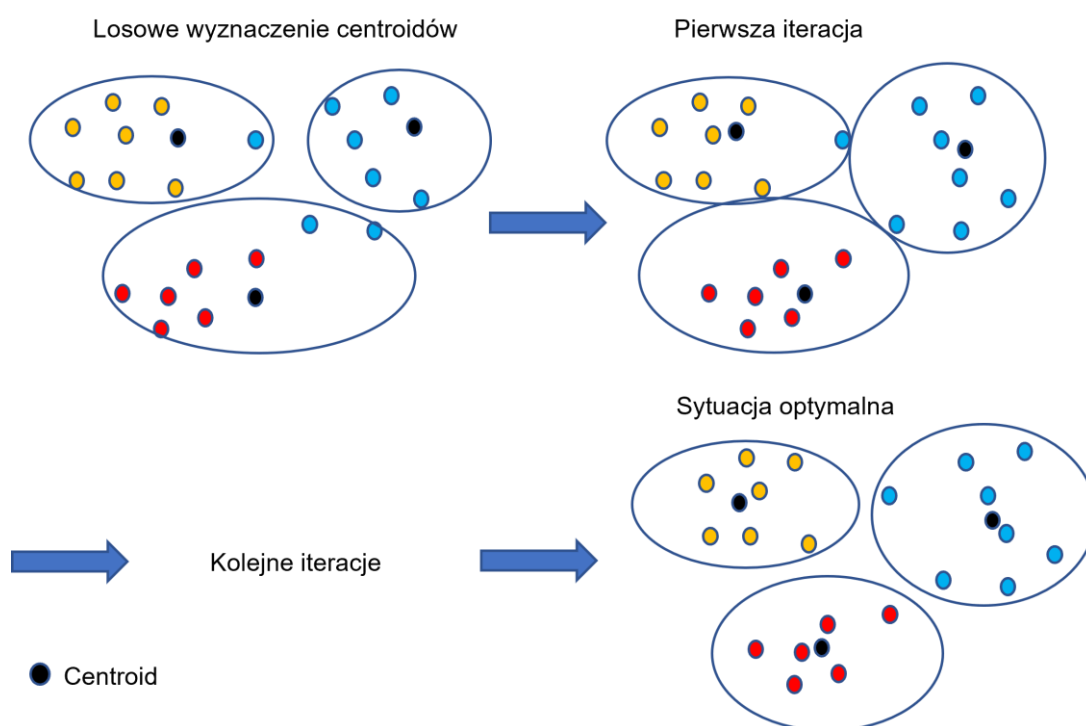
- środka ciężkości (ang. *Centroid Linkage*) (**Rysunek 9 G**), gdzie wyznaczany jest geometryczny środek ciężkości (zwany centroidem), obliczony na podstawie średniej, który następnie używany jest do obliczenia odległości między centroidami dwóch skupień.
- mediany (ang. *Median Linkage*), gdzie centroidy są wyznaczane na podstawie mediany skupienia, a następnie wykorzystywane do obliczenia odległości.
- Warda (**Rysunek 9 H**), gdzie skupienia są wyznaczane w taki sposób, aby uzyskać minimalny wzrost błędu sumy kwadratów wewnątrz grupy. Błąd sumy kwadratów definiuje się jako sumę podzieloną przez kwadrat odchylenia każdego centroidu własnego skupienia. Ta metoda jest najczęściej wykorzystywana, gdyż daje dobrze ustrukturyzowane dendrogramy.



Rysunek 9 Schemat miar odległości (A) euklidesowej i (B) miejskiej. Graficzne przedstawienie hierarchicznej analizy skupień metodą (C) aglomeracyjną, (D) podziału oraz metod określania podobieństwa (E-H).

W przeciwieństwie do HCA, w niehierarchicznej analizie skupień obiekty są łączone bez uwzględnienia ich hierarchii. Analiza ta wymaga zdefiniowania liczby skupień na którą zestaw danych ma zostać podzielony. Najbardziej popularnym algorytmem niehierarchicznej analizy skupień jest metoda k-średnich, (ang. *K-Means Cluster Analysis*, KMCA). Przynależność obiektu do klasy określa się korzystając z odległości obiektu od losowo wybranego centroidu, którego położenie w kolejnych iteracjach algorytmu jest korygowane,

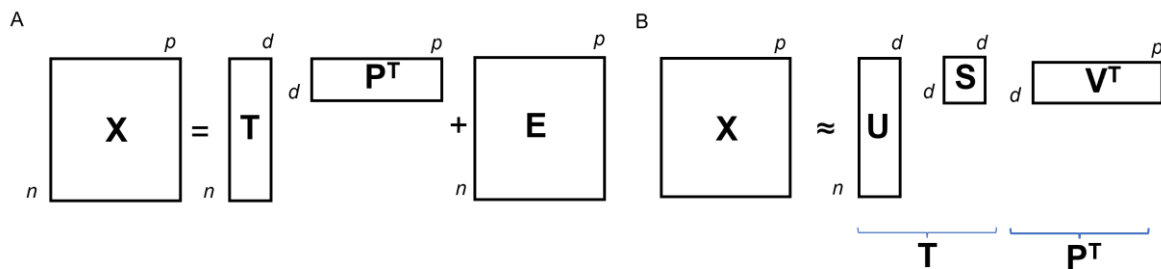
aż do momentu, gdy nie dochodzi do migracji obiektów między skupieniami oraz wariancja wewnątrzklasowa jest minimalna. KMCA jest odwracalna i można korygować błędy popełnione na etapie przydzielania obiektów do skupień, jednak ze względu na losowość wyboru pierwotnych centroidów jest metodą niepowtarzalną (**Rysunek 10**). W KMCA obiekt należy tylko do jednego skupienia, które mogą mieć różną liczebność. Alternatywną metodą niehierarchicznej analizy skupień jest rozmyta niehierarchiczna analiza skupień (ang. *Fuzzy k-means Cluster Analysis*, FCA), gdzie obiekty mogą być przypisane do kilku klas z wagą w skali 0 (brak przynależności) do 1 (pełna przynależność) [2,31,32].



Rysunek 10 Graficzna ilustracja algorytmu KMCA.

Odmiernym podejściem do analizy danych spektralnych, wykorzystującym nienadzorowane metody uczenia, jest projekcja danych w układzie o zredukowanej ilości zmiennych, zwaną analiza głównych składowych (ang. *Principal Component Analysis*, PCA). Oryginalną macierz danych \mathbf{X} o n wierszach (próbki) i p kolumnach (zmiennych lub liczbach falowych w przypadku spektroskopii ramanowskiej) można przedstawić jako produkt macierzy \mathbf{T} (ang. *Scores*) o n wierszach i d kolumnach (odpowiadających zredukowanej liczbie wymiarów/zmiennych, czyli głównych składowych) oraz transponowanej macierzy \mathbf{P} ładunków czynnikowych (ang. *Loadings*) o d kolumnach i p wierszach (**Rysunek 11 A**).

Nowy układ głównych składowych jest liniową kombinacją oryginalnych zmiennych [32]. Do obliczenia czynników wykorzystuje się między innymi algorytm iteracyjnej procedury cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*, NIPALS) lub rozkład macierzy według wartości osobliwych (ang. *Singular Value Decomposition*, SVD) [31,32]. SVD zakłada, że każdą macierz można przedstawić jako produkt trzech macierzy: ortonormalnych \mathbf{U} i \mathbf{V} , oraz diagonalnej \mathbf{S} . Dodatkowo \mathbf{US} odpowiada macierzy \mathbf{T} , natomiast $\mathbf{V}=\mathbf{P}$ (**Rysunek 11 B**) [32].



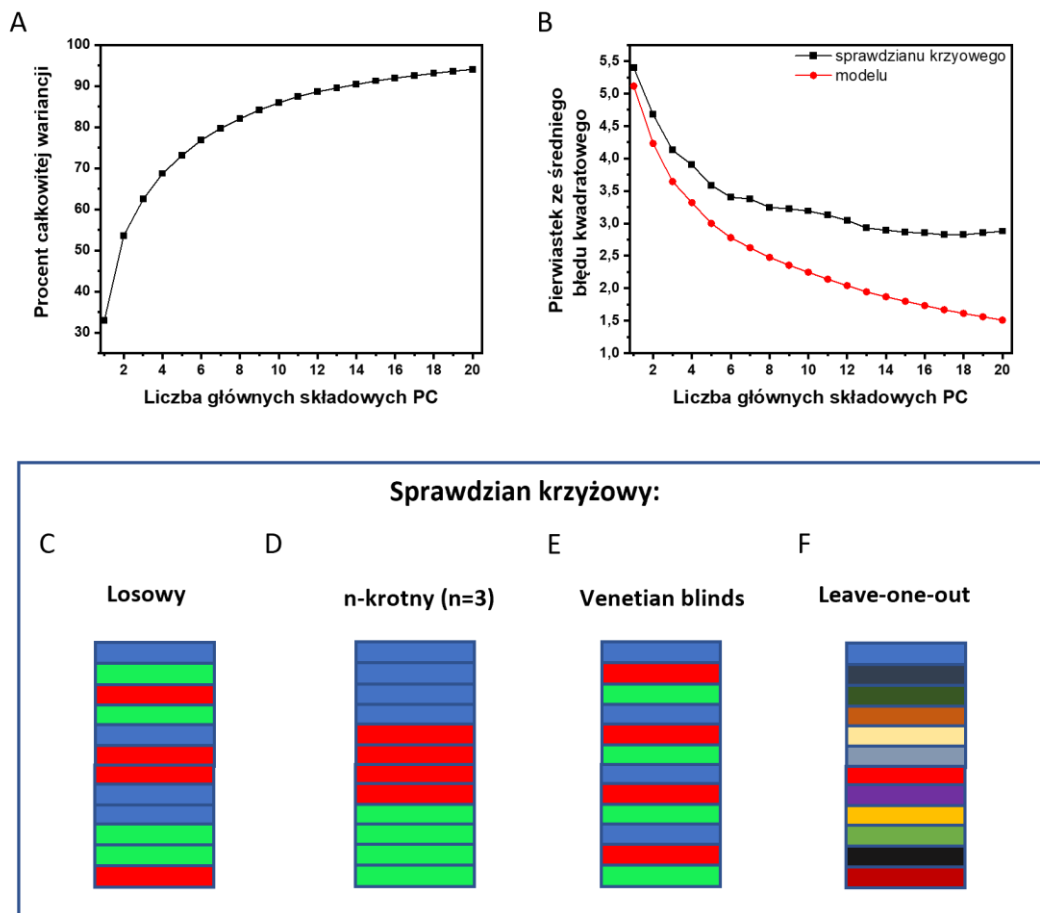
Rysunek 11 (A) Schematyczne przedstawienie PCA w postaci macierzowej. (B) Schemat SVD jako metody rozkładu macierzy.

Główne składowe nie są ze sobą skorelowane oraz wraz z kolejnymi głównymi składowymi (ang. *Principal Component*, PC) spada procent opisywanej przez nie zmienności danych oryginalnych. W PCA wybiera się taką ilość PC, aby suma opisywanej wariancji wynosiła około 95%, co przedstawia się graficznie w formie wykresu osypiska (**Rysunek 12 A**) [31–33]. Ilość głównych składowych można również określać na podstawie wartości własnych macierzy \mathbf{T} powyżej 1 lub testu Scree (**Rysunek 12 B**), gdzie sporządza się wykres wartości własnych lub pierwiastka z średniego błędu kwadratowego (ang. *Root Mean Square Error*, RMSE) od liczby składowych głównych. RMSE definiuje się jako pierwiastek z kwadratu różnicy między wartościami przewidywanymi przez model lub estymator \hat{y}_i , a wartościami obserwowanymi y_i (25)[31,32].

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (25)$$

Popularną metodą weryfikacji modeli w analizie PCA jest również prowadzenie sprawdzianu krzyżowego (walidacji krzyżowej, ang. *Cross-Validation*, CV), polegającego na usunięciu części danych z oryginalnej macierzy oraz obliczeniu nowego modelu PCA. Następnie usunięte dane są przewidywane za pomocą modelu PCA i wyliczany jest średni błąd kwadratowy dla wszystkich usuniętych obiektów [33]. Ilość istotnych PC wybierana jest

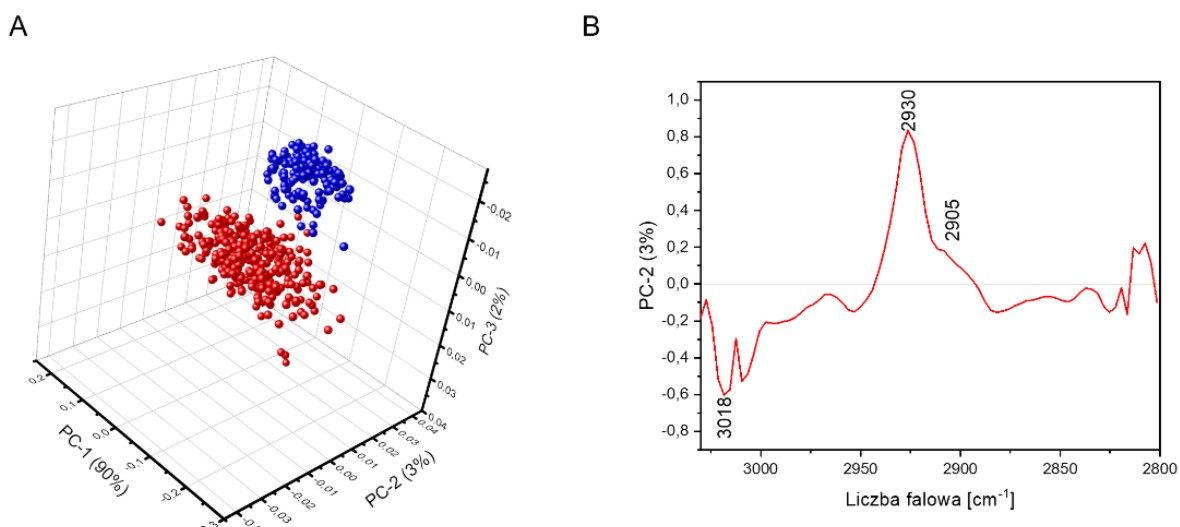
na podstawie najmniejszego pierwiastka ze średniego błędu kwadratowego sprawdzianu krzyżowego RMSE-CV i danych oryginalnych RMSE-Cal [32,49]. Podział danych na podzbiory w sprawdzianie krzyżowym prowadzi się w sposób przypadkowy wybierając losowe próbki (**Rysunek 12 C**), sprawdzianem k -krotnym dzielącym zestaw danych na k -podzbiorów (**Rysunek 12 D**), metodą *Venetian blinds* dzielącą zbiór danych na k podzbiorów o zdefiniowanej liczebności (**Rysunek 12 E**) lub jego modyfikacją *leave-one-out* o zbiorach jednoelementowych (**Rysunek 12 F**) [49].



Rysunek 12 Metody wyboru optymalnej liczby głównych składowych na podstawie (A) procentu całkowitej wariancji opisywanej przez kolejne główne składowe (B) testu Scree połączonego ze sprawdzianem krzyżowym (CV). Graficzne przedstawienie typów sprawdzianu krzyżowego: losowego, n-krotnego, Venetian blinds oraz leave-one-out.

Wyniki PCA można prezentować graficznie przedstawiając wykres przebiegu wartości czynników ang. *Scores plot*) z głównymi składowymi jako nowym układem współrzędnych ortogonalnych (**Rysunek 13 A**). Dodając kodowanie kolorystyczne badanych obiektów

(widm/próbek) można określić w jaki sposób są one grupowane, oraz wyznaczyć elipsę błędu średniego (ang. *Confidence Ellipse*).



Rysunek 13 Przykładowy wynik PCA: (A) wykres przebiegu wartości czynników trzech pierwszych głównych składowych oraz (B) wykres ładunków czynnikowych dla składowej PC2.

Co więcej, relacja między główną składową, a oryginalnymi zmiennymi jest przedstawiona wykresem ładunku czynnikowego (ang. *Loading*). Dla danych spektroskopowych jest to wykres zależności od przesunięcia ramanowskiego, natomiast intensywność bezwzględna oraz znak, dostarczają informacji w jakim stopniu liczba falowa jest charakterystyczna dla otrzymanego w modelu PCA grupowania (**Rysunek 13 B**) [50].

2.4. Metody uczenia nadzorowanego

Nadzorowane rozpoznawanie wzorców zakłada działanie na obiektach o znanej przynależności do grup, mające na celu klasyfikację (dyskryminację, predykcję) nowych obiektów na podstawie modelu otrzymanego z analizy zbioru uczącego i treningowego. Modele wykorzystywane do dyskryminacji, przeważnie występują w wariacie regresji. Przypisując klasom wartości 0 i 1 lub 1 i -1 możliwe jest wyznaczenie wartości progów przynależności do odpowiedniej klasy. W niniejszym rozdziale zostaną omówione dwie kluczowe metody uczenia nadzorowanego: metoda wektorów nośnych (ang. *Support Vector Machine, SVM*)

oraz analiza regresji i dyskryminacji metodą najmniejszych cząstkowych kwadratów (ang. *Partial Least Squares Regression*, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*, PLS-R oraz PLS-DA).

Model SVM opiera się na wyznaczeniu granicy (hiperpłaszczyzny decyzyjnej) dzielącej obiekty o różnej przynależności klasowej opisanej przez wektory wsparcia (najczęściej próbki stanowiące granice klasy zbioru uczącego). Podczas tworzenia modelu SVM z funkcja typu „*kernel*” (funkcja, która pozwala stworzyć nieliniową hiperpłaszczyznę) istotny jest parametr kary C służący do optymalizacji rozdziału punktów danych, poprzez identyfikację punktów, które nie zostały prawidłowo rozdzielone przez hiperpłaszczyznę klasyfikującą. Im wyższa jest wartość C (będąca w zakresie 0 do nieskończoności), tym bliższe jest dopasowanie do danych kalibracyjnych/treningowych i zwykle mniejsza szerokość marginesu między klasami. Alternatywą dla C jest parametr ν (w zakresie 0-1) oraz ϵ (tylko dla SVM-R w zakresie od 0 do nieskończoności). Kolejnym parametrem do optymalizacji jest parametr γ kontrolujący kształt hiperpłaszczyzny oraz wpływający na ilość wektorów wsparcia. SVM-DA (wariant dyskryminacyjny metody SVM) dostarcza informacji o klasyfikacji próbek, jednak nie wskazuje na zmienne istotne w procesie klasyfikacji. Taką informację można otrzymać z modeli PLS-DA i PLS-R [32].

W PLS-DA i PLS-R pojedyncze widma są prezentowane w odniesieniu do macierzy odpowiedzi \mathbf{Y} definiującej np.: przynależność obiektu do danej klasy, stężenia lub innego liniowo zmiennego parametru etc. W trakcie budowania modelu, otrzymywane są składowe (zmienne ukryte, ang. *Latent Variables*, LV) maksymalizujące kowariancje między blokiem danych \mathbf{X} i macierzą odpowiedzi \mathbf{Y} . Obliczana jest macierz wag \mathbf{W} dla zbioru \mathbf{X} pozwalająca zachować ortogonalność składowych ukrytych. Co więcej w interpretacji danych przydatny jest wektor regresji będący liniową kombinacją ważonych LV. Aby uniknąć przeuczenia modelu wybór odpowiedniej liczby LV odbywa się na podstawie średniego błędu klasyfikacji, lub w przypadku regresji o wartość pierwiastka ze średniego błędu kwadratowego kalibracji i walidacji krzyżowej (RMSEC i RMSECV) otrzymanego dla zbioru uczącego i walidacji krzyżowej [32,33,51]. Dobrą praktyką jest również zweryfikowanie modelu danymi z dodatkowego niezależnego eksperymentu jako predykcji.

2.5. Analiza wydajności modeli predykcyjnych

Wykorzystanie danych treningowych i testowych w modelach predykcyjnych pozwala otrzymać rzetelne modele, jednak poza znalezieniem optymalnych warunków zapobiegających przeuczeniu (odpowiednia liczba LV, wektorów wspierających etc.) należy również sprawdzić parametry wydajności modeli. W klasyfikacji binarnej efektywność modelu można przedstawić z użyciem macierzy błędów (tablicy pomyłek, ang. *Confusion Matrix*), wskazującej na liczbę próbek o przewidywanej przynależności klasowej względem przynależności rzeczywistej. Próbkę mogą być przewidziane prawdziwie pozytywnie (ang. *True Positive*, TP), prawdziwie negatywnie (ang. *True Negative*, TN), fałszywie pozytywnie (ang. *False Positive*, FP) oraz fałszywie negatywnie (ang. *False Negative*, FN). Podstawowymi miarami wydajności modelu są czułość (26) (ang. *Sensitivity*) definiowana jako odsetek prawidłowo przewidzianych przypadków oraz swoistość (27) (ang. *Specificity*) mówiąca o odsetku prawdziwie negatywnych przypadków [32,52].

$$\text{Czułość} = \frac{TP}{TP+FN} \quad (26)$$

$$\text{Swoistość} = \frac{TN}{TN+FP} \quad (27)$$

Graficznie efektywność modelu można przedstawić krzywą charakterystyki operacyjnej odbiornika (ang. *Receiver Operating Characteristic*, ROC) prezentującą zależność czułości od różnicy 1-swoistość. W klasyfikatorze idealnym krzywe ROC przechodzą przez punkt (0,1), a pole powierzchni pod krzywą (ang. *Receiver Operating Characteristic Area Under Curve*, ROC-AUC) jest równe 1. Im niższa wartość ROC-AUC tym niższa wydajność modelu, oraz większa szansa na losową klasyfikację próbek. Dodatkowo na podstawie ROC można wybrać model o optymalnej czułości i swoistości, wymaganej do jego zastosowania np. w diagnostyce medycznej itp.

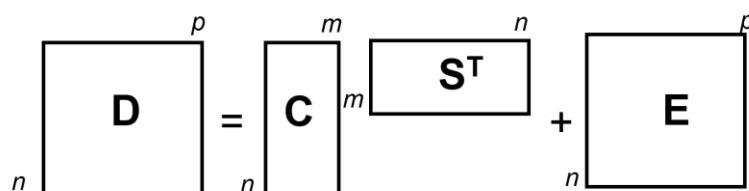
W przypadku badań medycznych, nie zawsze dostępne są próbki reprezentujące w podobnej ilości przypadek pozytywny i negatywny. Gdy zbiór danych jest nie zrównoważony (liczba próbek w jednej klasie jest znacznie większa niż liczba próbek w innych klasach), czułość i swoistość nie mogą być uznane za wiarygodną miarę efektywności modeli i mogą prowadzić do zbyt optymistycznej oceny wydajności modelu w nadreprezentowanej klasie. W takich przypadkach wydajną miarą jest współczynnik korelacji Matthews'a (ang. *Matthew Correlation Coefficient*, MCC) wykorzystujący wszystkie wartości z macierzy błędów (28).

Wysokie wartości MCC są otrzymywane tylko w przypadku poprawnego przewidywania większości pozytywnych i negatywnych badanych przypadków [52].

$$MCC = \frac{TP*TN-FP*FN}{\sqrt{(TP+FP)*(TP+FN)*(TN+FP)*(TN+FN)}} \quad (28)$$

2.6. Wieloparametrowa dekonwolucja sygnału z wykorzystaniem iteracyjnej metody najmniejszych kwadratów

Wieloparametrowa dekonwolucja sygnału (ang. *Multivariate Curve Resolution*, MCR) zakłada, że zestaw danych wejściowych **D** jest addytywnym modelem zbudowanym z widm/komponentów **S** (ang. *pure components*) składników mieszaniny o określonym stężeniu **C**.



Rysunek 14 Schemat działania MCR.

W przypadku, gdy nie jest dostępna informacja o **C** lub **S**, analizę rozpoczyna się od założenia, że najbardziej skrajne próbki/widma reprezentują czyste komponenty **S** i obliczenia **C**. Następnie prowadzona jest optymalizacja z wykorzystaniem iteracyjnej metody najmniejszych kwadratów (ang. *Alternating Least Squares*, ALS), aż do spełnienia kryterium zbieżności. W zależności od potrzeb, optymalizację można rozpocząć od znalezienia przybliżenia macierzy **C** lub **S**. Dodatkowo w MCR wymagane jest założenia o braku wartości ujemnych, wobec tego analiza widm drugich pochodnych wymaga szczególnej ostrożności [53–55].

Analiza metodą MCR ta jest niezwykle przydatna w monitorowaniu zmian w potencjalnie nieliniowych, ewolucyjnych i czasowych układach wieloskładnikowych, np. biologicznych podlegającym modelom analitycznym (w szczególności prawu Lamberta-Beera) [53–56].

3. Barwienia histochemiczne

Wraz z rozwojem mikroskopii optycznej wzrastało zainteresowanie wykorzystaniem jej do opisu morfologicznych cech charakterystycznych dla tkanek i komórek. Dodatkowe wybarwienie preparatów pozwala uzyskać lepszy kontrast uwypuklając istotne cechy badanego preparatu, co do dziś jest rutynowo wykorzystywane w diagnostyce medycznej.

Barwienia histochemiczne są oparte na fizykochemicznych właściwościach barwników oraz próbki włączając ich wzajemne powinowactwo względem siebie, typ oddziaływań barwnik-próbka, barwnik-barwnik, barwnik-rozpuszczalnik, lipofilowość i hydrofilowość, sposób odwodnienia i utrwalenia etc. [57]. Pośród wielu popularnych barwników histochemicznych najbardziej rozpoznawalne są hematoksylina zabarwiająca struktury o odczynie kwaśnym (głównie DNA, RNA, rybosomy) na kolor niebieski oraz eozyna; barwiąca struktury o odczynie zasadowym na różowo w wyniku reakcji zobojętnienia [58].

3.1. Barwienie May-Grunwald -Giemsa, MGG

Do barwień preparatów otrzymanych z krwi obwodowej oraz szpiku dedykowane są barwniki May-Grunwald i Giemsa pozwalające w około 20-30 minut otrzymać informacje dotyczące wielkości jądra komórkowego badanych komórek. Obecność metanolu w roztworach barwników ma służyć odwodnieniu i utrwaleniu preparatu. Co więcej barwnik May-Grunwald zawiera eozynę i błękit metylenowy, a barwnik Giemsa eozynę i błękit metylenowy oraz azur B. W powstającym kompleksie azuru B i eozyny dochodzi do przejść z przeniesieniem ładunku (ang. *Charge Transfer*, CT) nadając mu purpurowo-fioletowe zabarwienie i efekt polichromii zwane efektem Romanowskiego [57,59,60]. W **Tabela 3** zamieszczono zestawienie wyników barwienia MGG dla poszczególnych komórek i ich elementów morfotycznych.

Tabela 3 Opis kolorystyczny barwienia MGG w warunkach pH 7,2 [61]

Element morfotyczny/organelle	Kolor
Jądro komórkowe	Fioletowe
Cytoplazma limfocytów	Niebieskie

Cytoplazma monocytów	Szaro-niebieskie
Cytoplazma neutrofilna	Fioletowe
Cytoplazma eozynofilna	Czerwono-brązowe
Granule bazofilne	Ciemnofioletowe do czarnych
Trombocyty	Fioletowe
Erytrocyty	Czerwonawo-szare

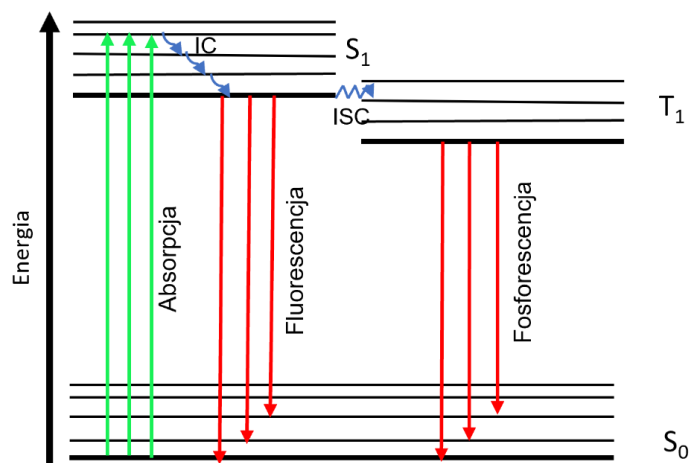
4. Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa stanowi narzędzie do wieloparametrowej analizy biofizycznych i biochemicznych właściwości komórek o zachowanej żywotności i integralności błony poprzez detekcję światła rozproszonego oraz intensywność fluorescencji. Promieniowanie rozproszone jest rejestrowane zgodnie z kierunkiem wiązki (ang. *forward scattering*, SC) oraz pod kątem 90° (ang. *side scattering*, SS) pozwalając określić odpowiednio wielkość oraz wewnętrzną ziarnistość komórek przepływających przez pomiarowy układ mikrokanałowy. Dodatkowo na podstawie szerokości i powierzchni sygnału fluorescencji można otrzymywać informację o np.: cyklu komórkowym (ilości chromosomów) lub ekspresji specyficznych grup związków [62,63].

Ze zjawiskiem fluorescencji związana jest absorpcja kwantu promieniowania powodująca wzbudzenie molekuly z podstawowego stanu singletowego S_0 do wzbudzonego poziomu S_1 o tej samej multipletowości. W większości przypadków molekula wraca do najniższego poziomu oscylacyjnego stanu S_1 w procesie nazywanym konwersją wewnętrzną (ang. *internal conversion*, IC) w ciągu 10^{-12} s, a następnie obserwowana jest emisja fluorescencji. Wzbudzone cząsteczki w stanie S_1 mogą również ulegać konwersji spinu do stanu trypletowego T_1 w procesie nazywanym przejściem międzysystemowym (ang. *intersystem crossing*, ISC). Powrót molekuly ze stanu T_1 do S_1 jest zabroniony spinowymi regułami wyboru, dlatego dochodzi do emisji fotonu i przejścia T_1 do S_0 , co jest określane mianem fosforescencji. Czas życia fluorescencji jest krótszy niż fosforescencji, która może być obserwowana przez długi czas po wzbudzeniu cząsteczek. Powyżej opisane procesy zostały przedstawione na diagramie Jabłońskiego na **Rysunek 15**.

W wyniku emisji elektronowej molekuly powracają do podstawowych poziomów elektronowych, ale do różnych poziomów oscylacyjnych, dlatego widma fluorescencji

i fosforescencji mają strukturę oscylacyjną. Dodatkowo pasmo emisji jest przesunięte do wyższych wartości długości fali względem pasma absorpcji, co jest nazywane przesunięciem stokesowskim [1,63].



Rysunek 15 Diagram Jabłońskiego ilustrujący proces fluorescencji i fosforescencji.

Cytometria przepływowa jest podstawowym narzędziem w diagnostyce medycznej. Wykorzystuje się ją przede wszystkim do identyfikacji chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, chorób płuc, wrodzonych i nabytych niedoborów immunologicznych czy chorób autoimmunologicznych na podstawie zmian ekspresji białek powierzchniowych lub obecności konkretnych molekuł [63,64]. Ich znakowanie często wymaga przeprowadzenia reakcji chemicznych przyłączających barwnik do specyficznych grup, co nie jest neutralne dla badanego układu.

Przykładem zastosowania znakowania są procesy szybkich reakcji typu *click-chemistry*, za rozwijanie których Carolyn R. Bertozzi, Morten Meldal i K. Barry Sharpless otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 2022 roku. Pierwsze znane reakcje typu *click-chemistry* wymagały toksycznego dla żywych organizmów katalizatora miedziowego, dopiero dalsze modyfikacje pozwalały na prowadzenie tych reakcji w warunkach neutralnych dla komórek [65]. Aktualnie jest dostępny szeroki panel barwników komercyjnych znakujących wybrane molekuły

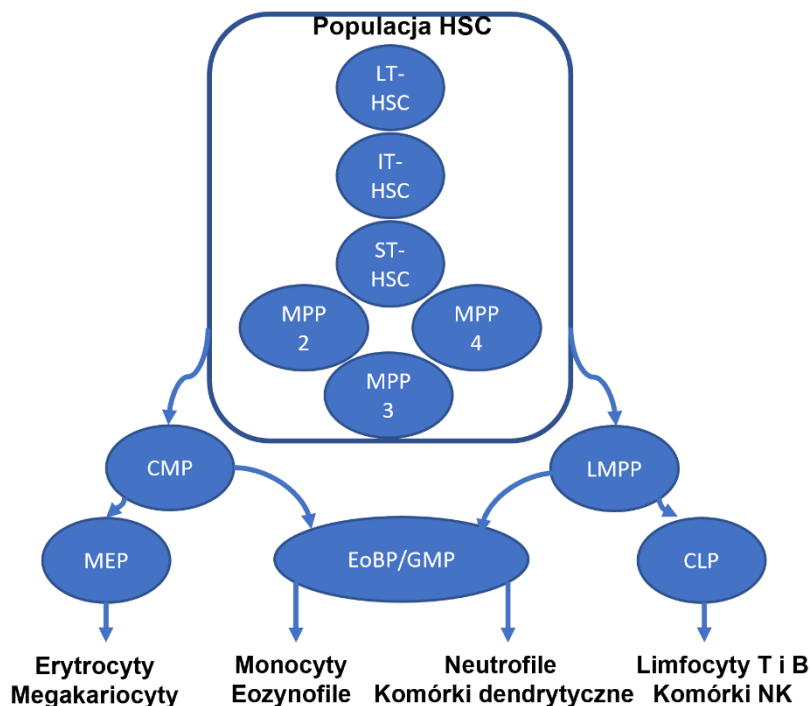
w komórkach, a także już gotowe zestawy ze znakowanymi przeciwciałami selektywnie i specyficznie łączącymi się z strukturami białkowymi w układach biologicznych. Wadą detekcji barwników fluorescencyjnych są szerokie pasma widm emisji, co nie pozwala

na jednoczesne wykorzystanie wielu fluoroforów lub wymaga wyposażenie cytometru w kilka kanałów detekcji rejestrujących promieniowanie z różnych zakresów spektralnych [66].

5. Białaczka-przyczyny epidemiologia i leczenie

5.1. Pochodzenie i podział elementów morfotycznych krwi

Zróżnicowane elementy morfotyczne krwi powstają w wyniku złożonego procesu zwanego hematopoezą, zachodzącego w szpiku kostnym. Jest on regulowany warunkami fizykochemicznymi prowadząc do transformacji pluripotencyjnych hematopetycznych komórek macierzystych (ang. *Hematopoietic Stem Cell*, HSC) o zdolnościach samoodnowy do w pełni dojrzałych i funkcjonalnych komórek krwi linii mieloidalnej (erytrocytów, megakariocytów, monocytów, neutrofilii eozynofili i bazofili) lub limfoidalnej (limfocytów B i T). Model różnicowania komórek w procesie hematopoezy obowiązujący w latach 2005-2015 (**Rysunek 16**) zakładał przemiany heterogenicznej populacji HSC i multipotentnych progenitorów (ang. *Multipotent Progenitor*, MPP) poprzez multipotentjalne progenitory limfoidalne (ang. *lymphoid-primed multipotential progenitor*, LMPP) lub progenitory linii mieloidalnej (ang. *granulocyte-monocyte progenitor*, GMP). Najnowsze badania oparte na transkryptomice pojedynczych komórek wskazują na większą złożoność hematopoezy i ciągłość różnicowania [67–70].



Rysunek 16 Hierarchiczny model hematopoezy. Skróty: LT-HSC długożyjące HSC (ang. long-term HSC), IT-HSC (ang. innate lymphoid HSC), ST-HSC krótkożyjące HSC (ang. short-term HSC), multipotencjalne komórki progenitorowe (ang. multipotent progenitors, MPP): erytrocytów i megakariocytów, linii mieloidalnej i limfoidalnej (ang. erythroid/megakaryocytic (MPP2), myeloid (MPP3), lymphoid lineages (MPP4)), CMP wspólne komórki progenitorowe linii mieloidalnej i granulocytarnej (ang. common myeloid progenitor), LMPP limfoidalne multipotencjalne komórki progenitorowe (ang. lymphoid-primed multipotential progenitor), progenitory MEP megakariocytów i erytrocytów (ang. megakaryocyte-erythroid progenitor), EoBP eozynofili i bazofili (ang. eosinophil-basophil progenitor), GMP granulocytów i monocytów (ang. granulocyte-monocyte progenitor), CLP wspólne komórki progenitorowe linii limfoidalnej (ang. common lymphoid progenitors). Schemat przygotowany na podstawie [67]

Pośród morfotycznych elementów krwi wyróżnia się erytrocyty, płytki krwi i leukocyty. Podstawowym podziałem leukocytów jest klasyfikacja na agranulocyty (limfocyty B i T, komórki NK oraz monocyty), których cytoplazma nie zawiera ziarnistości możliwych do zauważenia pod mikroskopem optycznym, oraz granulocyty (neutrofile, bazofile i eozynofile). Ziarnistości granulocytów obserwowane w ich cytoplazmie zawierają szereg substancji bakteriobójczych i enzymów które w czasie fagocytozy pozwalają na trawienie pochłoniętych patogenów. Ze względu na rodzaj pochłanianych barwników histochemicznych, co związane jest z pH, wyróżnia się granulocyty obojętnochłonne (neutrofile), kwasochłonne (eozynofile) i zasadochłonne (bazofile) [71].

5.2. Białaczka i jej klasyfikacja

Białaczka jest grupą nowotworów krwi wynikającą z klonalnego rozrostu i zaburzeń różnicowania komórek krwi prowadzącym do jej ilościowych i jakościowych zmian. Etiologia choroby nie jest do końca znana, ale istotne są czynniki ryzyka takich jak środowiskowe (promieniowanie jonizujące, narażenie na związki kancerogenne), genetyczne (np.: u dzieci z zespołem Downa). Ze względu na pochodzenie i stopień dojrzałości komórek ulegających klonalnemu rozrostowi oraz przebieg choroby, białaczki dzieli się je na ostre i przewlekłe oraz limfoblastyczne i mieloblastyczne. Białaczki o gwałtownym przebiegu to ostra białaczka limfoblastyczna (ang. *Acute Lymphoblastic Leukemia*, ALL) oraz ostra białaczka szpikowa (ang. *Acute Myeloid Leukemia*, AML) i dotyczą one odpowiednio prekursorów linii limfoidalnej lub mieloidalnej. Białaczki rozwijające się powoli, często w początkowych etapach w sposób bezobjawowy to przewlekła białaczka limfocytowa (ang. *Chronic Lymphocytic Leukemia*, CLL) oraz przewlekła białaczka szpikowa (ang. *Chronic Myeloid Leukemia*, CML) i dotyczą one ponownie nieprawidłowego i niekontrolowanego rozrostu komórki macierzystej limfocytów i mielocytów [72–75].

5.3. Podtypy ostrej białaczki limfoblastycznej

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) jest najczęstszym typem nowotworu u dzieci, ze znacznym szczytem występowania (>75%) między 2. a 5. rokiem życia [76]. ALL jest spowodowana klonalną ekspansją nieprawidłowych limfoblastów B lub T niosących liczne aberracje genetyczne, które przyczyniają się do rozwoju i progresji nowotworu. Najczęstszymi symptomami ALL są anemia, trombocytopenia, granulocytopenia przyczyniające się do np.: osłabienia, licznych krwawień w obrębie jamy ustnej, podatności na infekcje, a także obrzęk węzłów chłonnych, wątroby i śledziony, co jest spowodowane infiltracją limfocytów do tych narządów. Diagnostyka zakłada badanie populacji komórek w krwi obwodowej i/lub szpiku metodami cytogenetycznymi i immunohistofenotypowaniem. Oznaczane są markery komórek limfoidalnych T (CD3) i B (CD19, CD20 i CD22). Najczęstszymi zaburzeniami genetycznymi są obecność genu fuzyjnego *BCR-ABL-1* t(9;22), powielenie chromosomów zwane hiperdiploidią, czy translokacja t(12;21) *ETV6-RUNX1*. Do ważnych podtypów ALL zalicza się również rearanżacje genów *KMT2A* oraz t(1;19) *TCF-PBX1*, czy też t(5;14) *IL3-IGH* [77,78].

5.3.1. Rearanżacja genu KMT2A

Rearanżacje genu *Histone-lysine N-methyltransferase 2A* (*KMT2A*), znanego do niedawna jako gen *mixed-lineage leukemia* (*MLL*), są najczęstszymi zmianami genetycznymi w niemowlęcej B komórkowej ostrej białaczce limfoblastycznej (ang. *B-cell Precursor ALL*, BCP-ALL) i nierozzerwalnie wiążą się z niekorzystnym przebiegiem klinicznym choroby [79]. Rearanżacja *KMT2A* (*KMT2A-r*) dotyczy najczęściej dzieci poniżej 1. roku życia (>70%), ale może występować również u starszych dzieci (do 6%) i dorosłych pacjentów (10-15%) chorych na BCP-ALL [80–83]. *KMT2A* katalizuje transfer grupy metylowej z S-adenozynolometioniny na resztę lizyny znajdującą się w obrębie histonu H3. Zidentyfikowano różne zmiany genetyczne obejmujące *KMT2A* w ALL, najbardziej rozpowszechnione są translokacje chromosomów prowadzące do powstania genów fuzyjnych: *AF4* [t(4,11)], *AF9* [t(9,11)], *ENL* [t(11,19)(q23,p13.3)], *AF10* [t(10,11)], *ELL* [t(11,19)(q23,p13.1)], lub *AF6* [t(6,11)] [83,84] wpływające na zaburzenia ścieżek sygnałowych kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphatidyl inositol 3-kinase*) i Ras oraz deregulację czynników transkrypcyjnych [85]. Leczenie ALL z *KMT2A-r* opiera się na szeregu kombinacji leków przeciwnowotworowych. W protokołach leczenia ALL z *KMT2A-r* wykorzystuje się m.in. cyklofosamid, winkrystynę, doksorubicynę i deksametazon. Dodatkowo, proponowane jest również wykorzystanie bortezomibu oraz inhibitorów deacetylazy histonowej [86]. Warto również zauważyć, że BCP-ALL z *KMT2A-r* charakteryzuje się także specyficznymi modyfikacjami epigenetycznymi, które w istotny sposób wpływają na chemiowrażliwość komórek nowotworowych i przyczyniają się do ogólnie gorszych wyników leczenia.

5.3.2. Fuzja genów BCR-ABL1

Niekorzystnym przebiegiem klinicznym i ryzykiem wysokiego nawrotu w ALL obarczone są również białaczki z obecnością chromosomu *Philadelphía* występujące u około 20-30% dorosłych chorujących na ten nowotwór. U przypadku z CML chromosom *Philadelphía* występuje u większości pacjentów, jednak nie jest związany z tak wysokim ryzykiem jak w ALL [87–89]. Chromosom *Philadelphía* powstaje na skutek translokacji fragmentów chromosomów 9 (w regionie 34) związanych z genem *ABL1* i 22 (w regionie 11) z genem *BCR*,

które tworzą gen fuzyjny *BCR-ABL* t(9,22)(q34;q11). W warunkach prawidłowego funkcjonowania kinaza tyrozynowa ABL1 przenosi sygnały z receptorów do czynników wzrostu i adhezji na powierzchni komórki regulując cytoszkielet, natomiast funkcja BCR (ang. *Breakpoint Cluster Region protein*) nie jest w pełni poznana [88]. W wyniku fuzji genów *BCR-ABL* powstaje kinaza zdolna do fosforylacji wielu substratów pełniących istotne role w ścieżkach sygnałowych regulujących proliferację i apoptozę oraz obserwowana jest wzmożona aktywność, w szczególności części ABL [88]. W części BCR możliwe jest dokowanie z wysokim powinowactwem białka wiążącego receptor czynnika wzrostu (ang. *Growth factor receptor-bound protein 2*, GRB2), który z kolei wiąże się z kolejnymi białkami aktywującymi ścieżki sygnałowe RAS-MAPK oraz PIK3, jak również kinazy białkowej AKT, których zadaniem jest regulacja mechanizmu apoptozy. Co więcej, wskutek fuzji genów *BCR-ABL1* aktywowana jest również ścieżka STAT (opisana w podrozdziale 5.3.3), a w szczególności ekspresja białka STAT5 [87,88]. Leczenie białaczek z obecnością chromosomu *Philadelphia* zakłada użycie inhibitorów kinazy tyrozynowej BCR-ABL takich jak: imatinib, nilotinib, bosutinib czy ponatinib [89].

5.3.3. Mutacje punktowe kinaz janusowych

Do BCP-ALL spełniających kryterium wysokiego ryzyka zgodnie z protokołem badania AIEOP-BFM 2017 POLAND zaliczane są także białaczki podtypu *Philadelphia-like* (*Ph-like*) charakteryzujące się profilem ekspresji genów podobnym jak w białaczkach z obecnością chromosomu *Philadelphia*, pomimo braku obecności fuzji genów *BCR-ABL1* [90]. Częstość występowania podtypu *Ph-like* u pacjentów pediatrycznych z ALL wynosi ok. 10-20% i wrażliwość wraz z wiekiem do 25% u nastolatków i młodych dorosłych [91]. W trakcie diagnostyki molekularnej tych białaczek najczęściej wykrywana jest nadmierna aktywacja ścieżki sygnałowej transduktorów sygnału kinaz Janusowych (JAK) i aktywatorów transkrypcji JAK/STAT (ang. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) powodowana między innymi mutacjami punktowymi genów *EPOR*, *CRLF2*, *JAK1/2*, *ILR7A* oraz obecnością genów fuzyjnych takich jak: *IGH-CRLF2*, *CRLF2-P2RY8*, *JAK2* z różnymi genami partnerskimi, a także nadekspresją białka receptorowego cytokin CRLF2 (ang. *Cytokine receptor-like factor 2*) na powierzchni komórek białaczkowych [90,92,93].

Ścieżka sygnałowa JAK/STAT jest aktywowana cytokinami i czynnikami wzrostu rozpoznawanymi przez receptory prowadząc do regulacji ekspresji genów, wzrostu, proliferacji i różnicowania komórek układu immunologicznego. Znanych jest siedem białek STAT występujących w różnych typach komórek: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, oraz STAT6. Poszczególne typy białek STAT aktywowane są zwykle przez kilka różnych cytokin, które wykorzystują preferencyjnie wybrany układ przekaźnikowy ścieżki JAK/STAT. Dimery białka STAT po związaniu z cytoplazmatycznymi białkami z rodziny kinaz Janusowych są następnie transportowane do jądra komórkowego, gdzie wiążą się z DNA i wpływają na wzrost tempa transkrypcji genów [93,94].

W leczeniu białaczek BCP-ALL *Ph-like* prowadzone są badania kliniczne wykorzystujące inhibitory kinaz tyrozynowych blokujące kieszeń wiążącą ATP takie jak ruksolitynib [90,91].

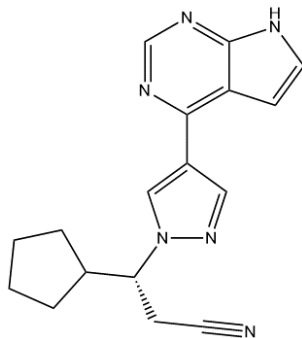
5.4. Terapie celowane z wykorzystaniem inhibitorów kinaz

Kinazy tyrozynowe regulują szereg ścieżek sygnałowych odpowiadających za kluczowe procesy związane z apoptozą, zdolnościami migracyjnymi i proliferacją komórek, których zaburzenia są cechą charakterystyczną w nowotworach. Wzmoczone badania nad dokładnym poznaniem mechanizmu działania kinaz tyrozynowych pozwoliły projektować związki o potencjale do blokowania ich aktywności. Wysoko selektywne i swoiste blokowanie kinaz tyrozynowych jest zaliczane do terapii celowanych mających na celu efektywne leczenie białaczek przy jednoczesnym zmniejszeniu negatywnego wpływu leków na inne procesy oraz zdrowe komórki prowadząc do ograniczenia negatywnych skutków ubocznych terapii przeciwnowotworowej.

5.4.1. Ruksolitynib

Ruksolitynib (ang. ruxolitinib, RUX) jest selektywnym inhibitorem kinaz JAK1 i JAK2 łączącym się z kieszenią wiążącą ATP. Został dopuszczony przez FDA i EMA w 2012 roku do leczenia pierwotnego zwłóknienia szpiku (ang. *Primary Myelofibrosis*, PMF), a w późniejszych latach do terapii czerwienicy prawdziwej (ang. *Polycythemia Vera*, PV)

oraz odpornej na steroidy chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *Graft-Versus-Host Disease*, GVHD) [95,96].

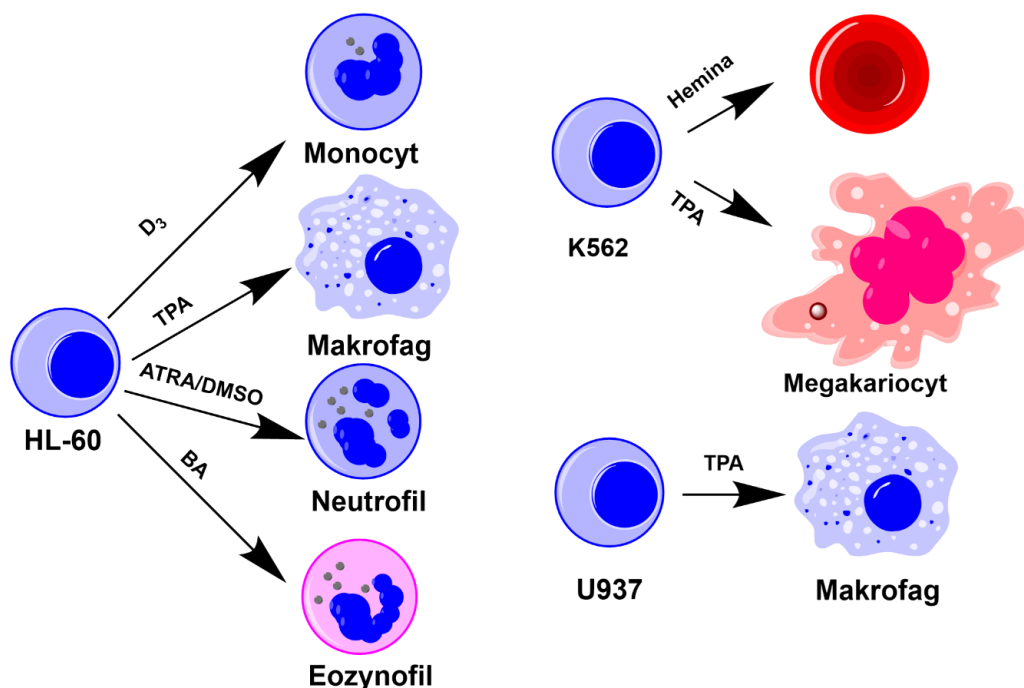


Rysunek 17 Struktura ruksolitynibu.

Ruksolitynib oddziałuje z JAK1/2 wpływając na ich aktywność, zarówno w przypadku obecności mutacji punktowych, jak i oraz na formę natywną kinaz Janusowych (ang. *Wild-type*). RUX oddziałuje dziesięcio- i stukrotnie słabiej z odpowiednio TYK2 i JAK3, co wpływa na odczuwanie przez pacjentów szeregu skutków ubocznych. W rezultacie w wyniku działania RUX w komórce obniżony jest poziom aktywnych białek STAT3/5 [93,95,96]. Średni okres półtrwania RUX wynosi około 3 h [95].

6. Różnicowanie komórek hematopoetycznych w modelach *in vitro*

Jedną z cech białaczek jest również obserwowany brak odpowiedzi komórek na występujące w środowisku szpiku kostnego czynniki fizykochemiczne pozwalające na ich różnicowanie. Skutkiem tego jest zablokowanie dojrzewania prekursorów wynikające z obecności mutacji genetycznych. Dodatkowo stopień dojrzałości komórek jest odwrotnie proporcjonalny do złośliwości nowotworu, dlatego wyindukowane procesu dojrzewania substancjami egzogennymi pozwala na aktywowanie dotychczas zablokowanych mechanizmów apoptozy. Szeroko zakrojone badania potencjalnych związków indukujących różnicowanie komórek uni- i multipotencjalnych, w tym mechanizmów ich działania umożliwiło powstanie linii komórkowych m. in. HL-60, K562, U937 zdolnych do różnicowania w kierunku komórek o fenotypie neutrofili eozynofili, monocytów, makrofagów, erytrocytów oraz megakariocytów (**Rysunek 18**) [97].



Rysunek 18 Schemat różnicowania komórek linii komórkowych HL-60, K562 i U937 wybranymi związkami chemicznymi: D₃-witamina D₃, TPA- 12-O-tetradekanoilforbol-13-octan, ATRA - kwas retinowy, DMSO-dimetylosulfotlenek, BA-kwas butyrowy.

Neutrofile, zwane inaczej granulocytami obojętnochłonnymi lub leukocytami polimorfonuklearnymi (ang. *polymorphonuclear leukocytes*, PMN) pozyskane *ex vivo* z krwi stanowią populację komórek ostatecznie zróżnicowanych o czasie półtrwania szacowanym od 6 do 10 godzin. Są najlicniejszą subpopulacją komórek układu odpornościowego krążących we krwi i stanowią aż 50–70% wszystkich leukocytów. Proces tworzenia leukocytów (granulocytopenia) odbywa się w szpiku kostnym, gdzie neutrofile powstają z multipotencjalnych komórek macierzystych. Ze szpiku kostnego PMN dostają się do układu krążenia, w którym żyją kilka godzin, po czym umierają przeważnie na drodze apoptozy [98,99]. Ponieważ pierwotne neutrofile obecne w krwiobiegu są komórkami krótko żyjącymi, ostatecznie zróżnicowanymi i nie są zdolne do namnażania się to wszelkie badania nad metabolizmem, ścieżkami sygnalizacyjnymi oraz mechanizmami patofizjologicznymi są niezwykle trudne. Indukowane różnicowanie promielocytów HL-60 kwasem retinowym (ang. *all-trans-retinoic acid*, ATRA) do komórek o fenotypie neutrofilii (ATRA-dHL-60) mimo ograniczeń wynikających z różnic między hodowlą komórkową a pierwotnymi neutrofilami (zawartość granuli itp.) jest powszechnie wykorzystywane.

HL-60 jest linią ostrej białaczki promielocytowej (ang. *Acute Promyelocytic Leukemia*, APL) z translokacją t(15;17)(q22;q12-21) prowadzącą do fuzji genu białaczki promielocytowej (ang. *Promyelocytic Leukemia*, PML) i receptora kwasu retinowego alfa (ang. *Retinoic Acid Receptor alpha*, RAR α) występującą w 80-90% przypadków APL. RAR α aktywowany niewielkim stężeniem ATRA tworzy dimer z receptorem retinoidowym X (RXR) prowadząc do aktywacji czynników transkrypcyjnych ścieżki sygnałowej MAPK i PI3K/Akt, natomiast produkt genu PML jest odpowiedzialny za regulację cyklu komórkowego, programowanej śmierci komórkowej i stabilności genowej. W przypadku fuzji PML-RAR α białko fuzyjne pośrednio prowadzi do deacetylacji histonów uniemożliwiając wiązanie się czynników transkrypcyjnych do DNA.

W mechanizmie różnicowania zależnego od receptorów, ATRA w stężeniu 0,1-1 μ M pozwala również na wiązanie się do RAR α na PML-RAR α , powodując jego degradację i uaktywnienie transkrypcji. Proces ten jest również związany ze wzrostem ekspresji markerów powierzchniowych CD11b, zmianami morfologicznymi takimi jak segmentacja jądra, zatrzymanie cyklu w fazie G₀/G₁. [97,100]. Niekontrolowany wzrost i blokada różnicowania w komórkach HL-60 jest w dużej mierze zależna od mechanizmu niezależnego od receptorów retinoidowych, czyli od genu c-Myc.45 będącym czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym różnicowanie komórek, proliferację i apoptozę. Podczas gdy ekspresja c-Myc jest wysoka we wszystkich proliferujących komórkach, jest ona gwałtownie obniżana podczas terminalnego różnicowania. Sugeruje się, że zdolność do spontanicznego różnicowania części populacji HL-60 jest związana mechanizmem niezależnym od receptora. Traktowanie HL-60 1,25% DMSO (v/v) również prowadzi do zmian fenotypu komórek przypominającego neutrofile, jednak mechanizmy tego procesu nie są jasne. Profil ekspresji genów znacznie różni się od tego podczas różnicowania z wykorzystaniem ATRA [98,101].

Badanie mechanizmów różnicowania do komórek o fenotypie neutrofilii może być również prowadzone z wykorzystaniem linii komórkowych NB4 (PML-RAR α) i Kasumi-1 oraz indukowanych komórek macierzystych. Warto jednak pamiętać, że niezależnie od linii komórkowej proces indukowanego różnicowania zachodzi poprzez inne mechanizmy i ścieżki, a terminalne komórki o fenotypie neutrofilii wykazują nieco inne właściwości niż komórki pierwotne [98].

7. Wykorzystanie spektroskopii ramanowskiej w diagnostyce i monitorowaniu procesu leczenia białaczek

Pierwszym etapem diagnostyki BCP-ALL opartej na spektroskopii ramanowskiej jest identyfikacja i klasyfikacja prawidłowych limfocytów B oraz komórek białaczkowych. Dotychczas odnotowano wykorzystanie spektroskopii ramanowskiej wspartej metodami chemometrycznymi w klasyfikacji limfocytów B pozyskanych od zdrowych dawców względem limfoblastów pochodzących zarówno z modeli *in vitro*, jak i komórek pierwotnych izolowanych od pacjentów (*ex vivo*) zdiagnozowanych w kierunku BCP-ALL.

Jako markery spektroskopowe limfocytów B na podstawie opracowanych modeli nadzorowanych i nienadzorowanych wskazano głównie kwasy nukleinowe (1578, 1337 oraz 780 cm^{-1}) [10,102–104], co wynika z obserwowanego w nich wyższego stosunku powierzchni jądra do cytoplazmy względem komórek zmienionych chorobowo oraz gęstsze upakowanie chromatyny [105]. Natomiast limfoblasty wykazują znacznie wyższą heterogenność wynikającą z obecnych aberracji genetycznych, co świadczy o ich stanie biochemicznym i metabolicznym znajdującym odzwierciedlenie w odpowiadającym im profilom spektroskopowym.

S. Manago i in. wykazali, że różnice oparte na spektroskopii ramanowskiej pomiędzy widmami prawidłowych komórek B i komórek białaczkowych są widoczne również dla linii komórkowych reprezentujących BCP-ALL na różnych etapach dojrzewania (RS4;11, REH, MN-60) [105,106]. Zauważyli oni także, że niskie dawki metotreksatu i 6-merkaptopuryny stosowane w terapii BCP-ALL oraz kwas *trans*-retinowy stosowany w różnych typach białaczek wskazują, że spektroskopia ramanowska może być skutecznie wykorzystana jako narzędzie monitorujące postępy i efektywność chemioterapii [105].

Podobne wnioski wyciągnięto w innej pracy autorstwa *S.K. Paidi i in.* [107]. W tej pracy podjęto się spektroskopowej charakterystyki linii komórkowych BCP-ALL na różnych etapach dojrzewania (REH, RS4,11, BALL-1, MN-60) oraz klasyfikacji widm ramanowskich przy użyciu drzew decyzyjnych (ang. *random forest*) uzyskując wyniki wykazujące wysoką czułość i swoistość [107]. Skuteczne rozróżnienie komórek prawidłowych i limfoblastów różnych podtypów molekularnych BCP-ALL w oparciu o ich profil widm ramanowskich wykazano w badaniach opartych na analizie widm blast z obecnymi aberracjami genetycznymi *BCR-ABL1*, *TEL-AML1* i *TCF-PBX1* [10].

Spektroskopowa ocena interakcji chemoterapeutyków z komórkami stanowi istotny przedmiot badań mający pozwolić nie tylko na monitorowanie efektywności terapii, ale również na badanie mechanizmów działania leków oraz typowania nowych potencjalnych związków terapeutycznych.

Promielocyty HL-60 traktowane DMSO (1,3% v/v) ulegają przekształceniu do komórek o fenotypie neutrofilii, a zmiany biochemiczne obserwowano z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej zależność od inkubacji z DMSO [108]. Istotne różnice między komórkami nieróżnicowanymi oraz traktowanymi DMSO przez 6 dni obserwowane były szczególnie w intensywności pasm 1660, 1581, 1127 oraz 750 cm^{-1} oraz w spadku intensywności pasma charakterystycznego dla kwasów nukleinowych przy 785 cm^{-1} . Otrzymana charakterystyka wskazuje tym samym na podniesiony poziom zawartości struktur lipidowych oraz hemowych z jednoczesnym spadkiem zawartości kwasów nukleinowych. Co więcej, przygotowane modele SVM umożliwiły skuteczną klasyfikację promielocytów HL-60 względem komórek traktowanych DMSO przez 1-6 dni [108].

W badaniach opisanych przez *Nandakumar i in.*, prowadzonych z wykorzystaniem obrazowania SRS zróżnicowanych komórek HL-60, na podstawie analizy obrazów dystrybucji pasma pochodzącego od drgań wiązanie C=C (1659 cm^{-1}) zauważono, że komórki HL-60 traktowane DMSO wykazywały wysoką zawartość lipidów nienasyconych tworzących manifestującą się przez liczne krople lipidowe w całej cytoplazmie w przeciwieństwie do komórek kontrolnych. [109].

Przykładem badań wykorzystujących spektroskopię ramanowską do monitorowania przebiegu leczenia oraz odpowiedzi komórki na działanie leków przeciwnowotworowych są prace opisujące metody detekcji imatinibu w osoczu [110] oraz jego uwalniania z nanocząstek złota [111] z wykorzystaniem powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii ramanowskiej (SERS). Detekcję imatinibu na poziomie subkomórkowym przeprowadzono skutecznie stosując technikę SRS w badaniu modelu *in vitro* komórek z fuzją genów *BCR-ABL1* modyfikowanych wektorem BAF3 [112]. Analizując widma SRS w zakresie 1236-1497 cm^{-1} zaobserwowano, że imatinib akumuluje się poza jądrem, w szczególności w lizosomach. Monitorowano wychwyty leku w różnych punktach czasowych (1, 2, 4, 8 h), a także analizowano interakcje lek-lek w komórkach w przypadku jednoczesnej stymulacji chlorochiną [112]. Co więcej, podjęto się również charakterystyki linii komórkowej CML K562 oraz wyprowadzonej K562R linii odpornej na imatinib. Analiza ramanowskich widm średnich,

jak i PCA nie wskazały wyraźnych markerów pozwalających na rozróżnienie między tymi grupami, natomiast MCR pozwolił scharakteryzować komponenty bogate w lipidy, kwasy nukleinowe, białka cytoplazmatyczne oraz komponenty ze znacznie dominującym udziałem pasm markerowych cytochromu oraz białek. Procentowa zawartość komponentów z intensywnymi pasmami kwasów nukleinowych i lipidów była istotnie wyższa w grupie komórek opornych natomiast spadała dla komponentów o charakterystyce białkowej i cytochromu [113]. Dystrybucja nanomolowych stężeń ponatinibu była badana techniką SRS po 1, 6, 24 i 48 h. Porównanie lokalnego stężenia ponatinibu wykazało 1,9-krotny wzrost zawartości leku w modelu oporności komórek K562 na ponatinib [114].

Ruksolitynib ze względu na obecność w swojej strukturze grupy funkcyjnej $-C\equiv N$ daje łatwe do śledzenia technikami nieliniowymi pasmo przy 2250 cm^{-1} . Ze względu na fakt, że jest on dopuszczony w leczeniu atopowego zapalenia skóry i bielactwa nabytego w postaci maści, dostępne są badania dotyczące migracji leku przez skórę i jego akumulacji [115].

Obrazowanie SRS sygnału pochodzącego od drgań rozciągających C-D obserwowanego przy 2125 cm^{-1} wykorzystano do śledzenia przez okres 37 h wychwytu deuterowanego kwasu D_{31} -palmitynowego przez makrofagi linii THP-1 wskazując na heterogeniczną kinetykę badanego wychwytu. Część komórek utraciło zdolność magazynowania deuterowanego kwasu w ciągu pierwszych 17 h, podczas gdy dla znacznej większości dalej obserwowano jego wychwyt i akumulację [116].

Zalety SRS połączonej z detekcją w przepływie laminarnym pozwoliło na rejestrację obrazów dystrybucji sygnałów przy liczbach falowych 3040, 2937, 2910 i 2860 cm^{-1} dla komórek pełnej krwi: erytrocytów, komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs) i komórek nowotworowych. Linia komórkowa raka jelita grubego HT29 i chłoniaka T (linia Jurkat) zostały wykorzystane jako model odpowiednio krążących komórek nowotworowych (ang. *Circulating Tumor Cells*, CTC) i nowotworu krwi. Stosując konwolucyjne sieci neuronowe (ang. *Convolutional Neural Network*, CNN) możliwa była identyfikacja i klasyfikacja obrazów SRS tych typów komórek wykazano czułość klasyfikacji wynoszącą $>98\%$ dla komórek krwi pełnej, $>98\%$ dla PBMCs, $>94\%$ dla komórek Jurkat oraz $>93\%$ dla komórek HT29 [117].

II. Hipoteza badawcza

Biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy, dostępne metody rozpoznawania białaczki, jak i zachodzący gwałtowny rozwój technik optycznych opartych na śledzeniu zjawiska rozpraszaniu jako metod wspierających proces diagnostyczny, w przedstawionej rozprawie doktorskiej poruszono tematykę związaną z rozróżnianiem molekularnych podtypów białaczki z wykorzystaniem technik spektroskopii ramanowskiej. Dodatkowo podczas realizacji badań opisanych w niniejszej pracy podjęta została próba oceny i monitorowania wpływu wybranych leków przeciwnowotworowych na stan biochemiczny pojedynczych komórek w modelach *in vitro* białaczki.

Podjmując się badań opisanych w niniejszej rozprawie postawiono następujące hipotezy badawcze:

- Istnieją markery spektroskopowe pozwalające odróżnić widma ramanowskie komórek białaczkowych przynależących do różnych podtypów molekularne BCP-ALL.
- Profil spektralny dwóch podtypów BCP-ALL o niekorzystnych pod kątem rokowania mutacjach genetycznych tj. blasty z rearanżacją *KMT2A* oraz blasty z obecnością chromosomu *Philadelphia* (fuzja genów *BCR-ABL1*), cechuje odmienny profil spektralny wynikający z różnic molekularnych i metabolicznych, który można z powodzeniem identyfikować metodami spektroskopii ramanowskiej.
- Interakcje inhibitorów kinaz tyrozynowych (na przykładzie ruksolitynibu) z komórkami w modelowych układach *in vitro* z mutacjami punktowymi *JAK2* zmieniają stan biochemiczny i metaboliczny traktowanych komórek umożliwiając tym samym ich śledzenie metodą obrazowania ramanowskiego.
- Różnicowanie linii komórkowej ostrej białaczki promieloblastycznej HL-60 do komórek o fenotypie neutrofilii kwasem *trans*-retinowym jest związane ze znacznymi zmianami morfologicznymi, molekularnymi i metabolicznymi na poziomie pojedynczych komórek, które można śledzić technikami obrazowania ramanowskiego.
- Reporter ramanowski MitoBADY pozwala na klasyfikację z wysoką czułością i swoistością promieloblastów HL-60 oraz komórek o fenotypie neutrofilii.

III. Cel Pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była:

- Charakterystyka spektroskopowa modeli *in vitro* białaczek BCP-ALL w celu zdefiniowania ich markerów ramanowskich
- Identyfikacja markerów zdolnych do rozróżnienia komórek BCP-ALL z rearanżacją *KMT2A* oraz fuzją genów *BCR-ABL1* wykorzystując dostępne modele *in vitro* linii komórkowych SEM oraz RS4;11 (*KMT2A-r*) oraz BV-173, SD-1 i SUP-B15 (*BCR-ABL1*). Zastosowanie jednocześnie wielu modeli komórkowych reprezentujących dany podtyp molekularny białaczki ma na celu uwypuklenia różnic wynikających z obecności wymienionych aberracji chromosomowych i wyeliminowanie przypisania cech charakterystycznych dla konkretnej linii komórkowej.
- Spektroskopowa ocena interakcji ruksolitynib-komórka w modelach *in vitro* BCP-ALL o podtypie *Ph-like* MHH-CALL-4 oraz MUTZ-5 z mutacjami punktowymi kinazy JAK2 odpowiednio I682F oraz R683G. Ocenie poddano zmiany biochemiczne obserwowane w odpowiedzi na krótkofalowe oraz długofalowe oddziaływania lek-komórka (odpowiednio po 0,5 h oraz 48 h).
- Opracowanie metodologii przyżyciowego obrazowania komórek nieadherentnych HL-60 oraz komórek inkubowanych z reporterami ramanowskimi.
- Spektroskopowa charakterystyka zmian biochemicznych i metabolicznych promieloblastów w modelu *in vitro* indukowanego różnicowania HL-60 kwasem *trans*-retinowym do komórek o fenotypie neutrofilii w odniesieniu do metod referencyjnych takich jak cytometria przepływowa.
- Opracowanie modelu/metody klasyfikacji komórek HL-60 o fenotypie promieloblastów i neutrofilii z wykorzystaniem reportera ramanowskiego MitoBADY.

Jako technikę wiodącą w badaniach omawianych w niniejszej rozprawie wykorzystano obrazowanie ramanowskie oraz SRS zarówno utrwalonego, jak i żywego materiału komórkowego. Poprzez połączenie metod spektroskopii ramanowskiej z metodami chemometrycznymi jako dodatkowy cel pracy przyjęto opracowanie klasyfikatorów o wysokiej czułości i swoistości.

IV. Cześć eksperymentalna

1. Spektroskopowa charakterystyka blast BCP-ALL z rearanżacją *KMT2A* oraz fuzją genów *BCR-ABL1*

1.1. Opis stosowanych metod.

Przygotowanie materiału biologicznego.

Wszystkie modelowe układy *in vitro* zakupiono w DSMZ (Braunschweig, Niemcy). Linie komórkowe RS4;11 i SEM cechuje rearanżacja w zakresie genu *KMT2A-AFF1* (t(4;11)(q21;q23)), dzięki czemu komórki te zostały wykorzystane jako model *in vitro* BCP-ALL z rearanżacją *KMT2A*. Natomiast, linie komórkowe SD-1, SUP-B15 i BV-173 posiadające chromosom *Philadelphia* (mutacja *BCR-ABL1*, t(9;22)(q34.1;q11.2)) reprezentują BCP-ALL z fuzją genów *BCR-ABL1*.

Linie komórkowe SD-1 i BV-173 hodowano w pożywce RPMI-1600 (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo) z dodatkiem odpowiednio 10% i 10-20% (v/v) bydlęcej surowicy płodowej (ang. *Foetal Bovine Serum*, FBS) (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo). Komórki SUP-B15 i SEM były hodowane w pożywce IMDM (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo); jednakże linia komórkowa SUP-B15 była dodatkowo suplementowana 20% (v/v) FBS i 0,05 mM merkaptoetanołem, podczas gdy linia komórkowa SEM była uzupełniona 10% (v/v) FBS. Linia komórkowa RS4;11 była hodowana w pożywce α -MEM (z rybo- i dezoksyrybonukleozydami) (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo) z 10% (v/v) FBS. Wszystkie pożywki uzupełniono 100 U / ml penicyliny i 100 μ g / ml streptomycyny (Merck, Darmstadt, Niemcy). Linie komórkowe utrzymywano w atmosferze zawierającej 5% CO₂ oraz w temperaturze 37 °C.

Limfocyty B izolowane z krwi obwodowej zdrowych dawców otrzymano za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/270/19/KE (rozszerzenie KE/30/21) z dnia 14 maja 2019 roku od ochotników po uzyskaniu świadomej zgody. Komórki wyizolowano z wykorzystaniem zestawu do selekcji negatywnej limfocytów B w oparciu o system kolumnowej magnetycznej separacji komórek (EasySep™ Direct Human B Cell Isolation Kit, STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, CA, USA). Do oceny przeżywalności wyizolowanych komórek zastosowano metodę wykluczenia błękitu trypanu

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), natomiast czystość oceniano za pomocą cytometrii przepływowej po wyznakowaniu przeciwciałami: CD45-PerCP-Cy5.5 (klon 2D1) i CD19-APC (klon SJ25C1) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

W celu utrwalenia preparatów komórkowych, zawiesinę komórek wirowano przez 5 minut z siłą obrotową 300 G w celu usunięcia pożywki (nadsącz). Otrzymany osad komórek zawieszono w roztworze PBS (bez Ca^{2+} i Mg^{2+}), a następnie zwirowano i traktowano przez 10 minut 0,5% roztworem glutaraldehydu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w temperaturze pokojowej. Kolejno, aby dokładnie usunąć środek utrwalający zawiesinę komórek 3-krotnie wirowano i płukano roztworem PBS. Tak przygotowane komórki przechowywano w 4° C aż do pomiarów ramanowskich.

Hodowla komórkowa, izolacja limfocytów B i utrwalanie komórek były prowadzone przez dr Justynę Jakubowską i dr Martę Ząbczyńską z Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Obrazowanie ramanowskie

200-500 μl zawiesiny komórek otrzymanej z Łódzkiego Uniwersytetu Medycznego nakrapiano na szkiełko z fluorku wapnia (Crystran LTD, Poole, Zjednoczone Królestwo) i przechowywano w 4°C do momentu grawitacyjnego opadnięcia komórek na powierzchnię CaF_2 . Następnie próbkę delikatnie umieszczano na stoliku piezoelektrycznym mikroskopu ramanowskiego Witec Alpha 300 (Oxford Instruments, Abingdon, Zjednoczone Królestwo) wyposażonego w laser o długości promieniowania 532 nm i mocy około 30 mW oraz w kamerę CCD (Andor Technology Ltd., Belfast, Irlandia Północna). Obrazowanie konfokalne prowadzono z wykorzystaniem wodnego obiektywu zanurzeniowego Zeiss W Plan-Apochromat (Oberkochen, Niemcy) o powiększeniu 63x i aperturze numerycznej $\text{NA} = 1$ z gęstością próbkowania 1 μm i czasem zbierania widma 0,5 s. Na podstawie obrazu mikroskopowego wybierano około 50 owalnych komórek bez widocznych uszkodzeń lub zniekształceń.

Analiza danych spektroskopowych

Przygotowanie zarejestrowanych danych hiperspektralnych do docelowych analiz chemometrycznych przeprowadzono w programie Project FIVE 5.3 Plus (Oxford Instruments, Abingdon, Zjednoczone Królestwo), wykorzystując funkcję usuwania promieniowania kosmicznego (CRR) i linii podstawy wielomianem 3 rzędu. Następnie obrazy ramanowskie

pojedynczych komórek poddano analizie niehierarchicznej metodą K-średnich w celu otrzymania widm średnich pojedynczych komórek, a także charakterystycznych dla nich podstawowych kompartmentów subkomórkowych takich jak jądro, cytoplazma, struktury lipidowe, struktury o wysokiej zawartości białek hemowych.

Widma średnie klasy struktur lipidowych wszystkich komórek danej grupy zostały przygotowane w programie OPUS 7.1 (Bruker Optics, Billerica, MA, USA) wykorzystując wygładzanie algorytmem Savitzky-Golay, usuwanie linii podstawy (metoda Rubberband z 64 punktami podparcia) oraz normalizację wektorową w zakresie spektralnym 3030-500 cm^{-1} .

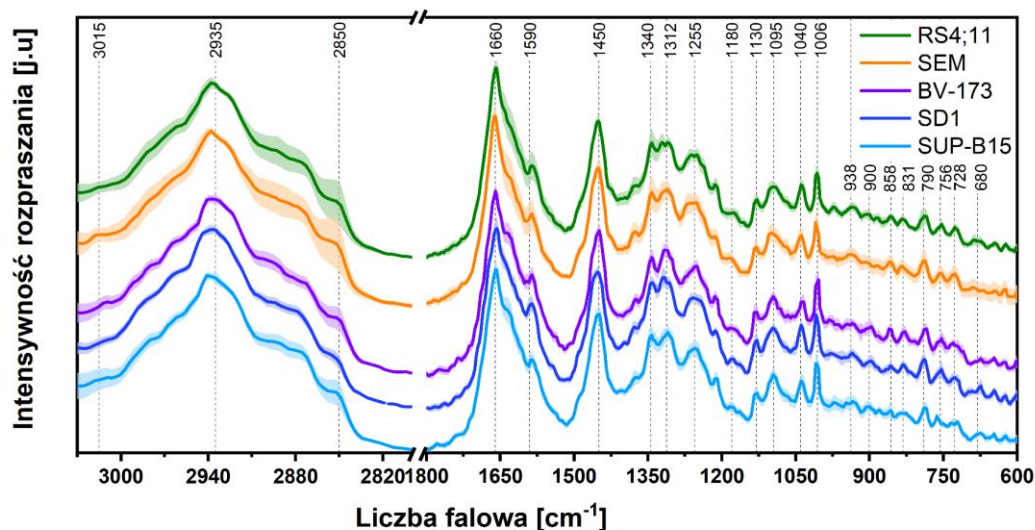
Integralna intensywność pasm ramanowskich przy 1660, 1445, 1305, 1265 cm^{-1} została obliczona przy użyciu programu OPUS 7.1 względem punktu podparcia 1800 cm^{-1} (metoda D). Analizę statystyczną i wizualizację danych przeprowadzono za pomocą programu Origin 2021 Pro (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Wielowymiarowa analiza danych spektralnych otrzymanych w 4 niezależnych powtórzeniach biologicznych została poprzedzona ujednocnieniem wartości przesunięcia ramanowskiego w programie OPUS 7.1. Kolejno modele otrzymane metodą analizy głównych składowych (PCA), analizy dyskryminacyjnej PLS-DA oraz metodą wektorów nośnych SVM przygotowano wykorzystując program Solo+Mia9.1 (Eigenvector Research, USA). Modele zostały zbudowane z wykorzystaniem informacji spektroskopowych dostępnych w zakresie 1800-600 cm^{-1} oraz trenowane przy użyciu zestawów danych pochodzących z trzech niezależnych eksperymentów biologicznych. Do walidacji modeli wykorzystano widma ramanowskie pochodzące z dodatkowego niezależnego zestawu danych, który nie był włączony do uczenia modelu. Dodatkowo, widma poddano wygładzeniu metodą Savitzky'ego-Golaya (wielomian 3, 15 punktów), usunięciu przesunięcia linii bazowej z jednoczesną normalizacją Multiplikatywną Korekcję Rozpraszania (MSC) z widmami średnimi jako referencyjnymi. Podczas budowy niemal każdego modelu zastosowano centrowanie średnie danych, oraz walidację sprawdzianem krzyżowym (*Venetian blinds*, 10 podzbiorów włączających po 20 widm), wartości odstające typowano na podstawie wartości reszt Q i Hottelina T². Modele PCA zostały przygotowane przy użyciu algorytmu rozkładu według wartości osobliwych (SVD). Ponadto, opracowane modele PLS zostały weryfikowane poprzez permutację przypisania klas i testy Wilcozona dla pojedynczej próby oraz test t-studenta.

1.2. Wyniki i dyskusja

Wyniki badań prezentowane w niniejszym rozdziale dotyczą rozróżnienia linii komórkowych reprezentujących określone podtypy molekularne BCP-ALL będące białaczkami wysokiego ryzyka (*BCR-ABL1* i *KMT2A-r*) za pomocą spektroskopii ramanowskiej. Przeprowadzone analizy oraz otrzymane wyniki umożliwiły wskazanie charakterystycznego profilu spektralnego odzwierciedlającego stan biochemiczny i metaboliczny badanych komórek. Nowością względem dotychczas dostępnych prac o podobnej tematyce jest identyfikacja specyficznych dla wybranych podtypu markerów spektroskopowych w oparciu o jednoczesne wykorzystanie kilku dostępnych modeli *in vitro* dla każdego podtypu białaczki. Ponadto dokonano oceny opracowanych modeli chemometrycznych poprzez porównanie różnych parametrów wydajności. Podtyp *KMT2A-r* jest reprezentowany przez dwie linie komórkowe RS4;11 i SEM, natomiast podtyp *BCR-ABL1* scharakteryzowano z wykorzystaniem trzech linii komórkowych SUP-B15, SD-1 i BV-173.

W celu szczegółowej charakterystyki profili spektroskopowych komórek prawidłowych i białaczkowych, przygotowano widma średnie pięciu wyżej wymienianych linii komórkowych (**Rysunek 19**). Subtelne różnice między widmami komórek linii RS4;11 i SD-1 lub BV-173 zauważono w zakresie pasm 1660, 1590, 1336 i 756 cm^{-1} . Większa intensywność pasm 1590, 1312 i 756 cm^{-1} na widmach SD-1 i BV-173 wskazuje na wyższą zawartości hemoprotein (ze szczególnym wskazaniem na cytochrom c) względem linii komórkowych SEM, RS4;11 i SUP-B15. Dodatkowo, pasmo przy 1336 cm^{-1} przypisywane kwasom nukleinowym, jest bardziej intensywne w widmach komórek linii SD-1 i BV-173, podczas gdy dla innych linii komórkowych pasmo to było przesunięte w kierunku wyższych liczb falowych do 1340 cm^{-1} . Zmiany w intensywności pasm charakterystycznych dla hemoprotein zostały wcześniej opisane jako charakterystyczne dla widm komórek pierwotnych z mutacją *BCR-ABL1* [10]. Zatem charakterystyka modeli *in vitro* białaczek z fuzją genów *BCR-ABL1* prezentuje spójny profil spektroskopowy z komórkami pierwotnymi.



Rysunek 19 Widma średnie wraz z odchyleniem standardowym obszaru całej komórki linii dla linii RS4;11 ($N = 263$), SEM ($N = 206$), SUP-B15 ($N = 191$) oraz BV-173 ($N = 198$). Widma średnie pochodzą z komórek zmierzonych w 4 niezależnych powtórzeniach biologicznych, gdzie N stanowi sumę komórek uwzględnionych w analizie.

Tabela 4 Interpretacja pasm ramanowskich obserwowanych na widmach komórek wraz z referencjami.

Położenie pasma / cm ⁻¹	Opis	Referencja
674	Drgania deformacyjne C=C-O-C w lipidach	[43]
680	Drgania oddychające pierścienia G	[118]
702	Cholesterol	[43]
718, 725	Drgania grupy N ⁺ (CH ₃) ₃ obecnej w fosfo- i sfingolipidach	[43]
730	A	[118]
745	Tryptofan	[119]
756	Drgania oddychające pierścienia porfiryny w hemoproteinach	[44,45]
790	Drgania oddychające pierścieni U, T, C w łańcuchach DNA i RNA	[46]
820	fosfo-L-seryna	Rysunek 25
825	o-fosfo-L tyrozyna	Rysunek 25
828	Drgania rozciągające O-P-O w DNA, fosfodiestrach oraz oddychające drgania pierścienia tyrozyny poza płaszczyznę	[10,44]
842	Drgania rozciągające C-C glukozy	[120]

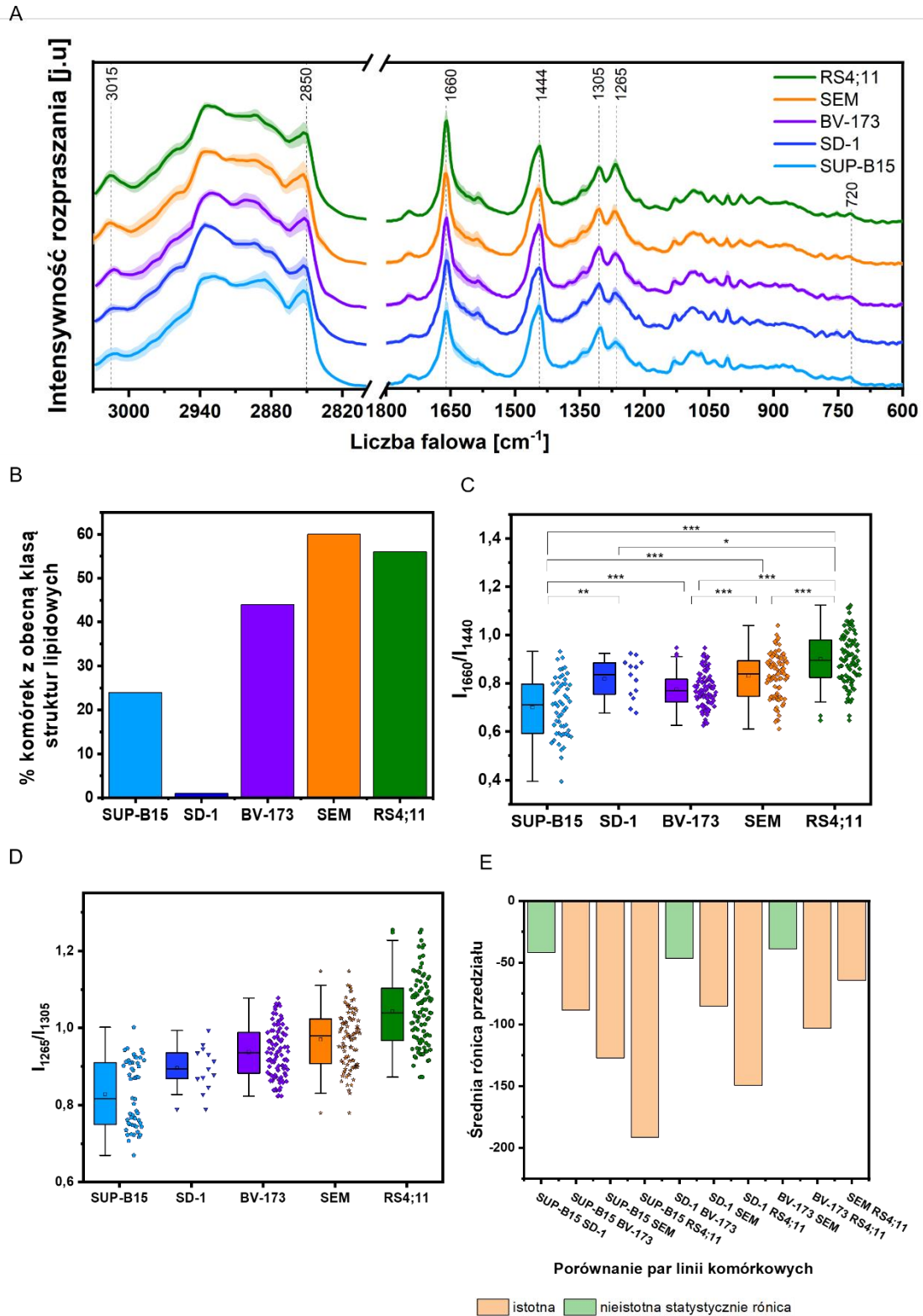
833, 851	Dublet tyrozynowy	[44], Fig. S1
856	L-seryna	Rysunek
833, 860	Dublet tryptofanu	[44]
867, 915 and 970	RNA	[46]
860, 890	Drgania szkieletowe C-O-O	[43]
875	Asymetryczne drgania rozciągające N ⁺ (CH ₃) ₃ fosfatydylocholiny	[43]
938	Drgania rozciągające C-C α-helisy w białkach	[44]
950, 955	Drgania N-C _α -C białek	[44]
955	Walina, tryptofan	[44]
1006	Drgania oddychające pierścienia fenyloalaniny	[10,47]
1024	Drgania rozciągające C-N białek, drgania oddychające pierścienia fenyloalaniny	[46]
1076	Drgania rozciągające C-C kwasów tłuszczowych	[43]
1080-1095	Drgania rozciągające O-P-O kwasów nukleinowych i fosfolipidów	[44,46]
1130	Drgania rozciągające C-C, C-O I C-N białek, kwasów tłuszczowych i hemoprotein	[10,43,44]
1143	Drgania rozciągające C-N białek oraz oksydazy glukozowej	[44]
1168	Drgania rozciągające C-C kwasów tłuszczowych	[43]
1180	C, G	[121]
1242-1227	Amid III, β-kartka	[44,118]
1250-1240	Amid III, nieuporządkowane struktury drugorzędowe	
1272-1264	Amid III, α-helisa	
1260	Drgania deformacyjne C=C-H nienasyconych kwasów tłuszczowych	[10,43]
1304	Drgania skręcające (CH) ₂ lipidów	[10,43,48]
1312	Drgania oddychające pierścienia tryptofanu	[44]
1336	Drgania oddychające pierścienia A i G w DNA	[10,46,118]
1345	A	[118]
1340, 1360	Dublet tryptofanu	[44]
1368	G	[118]
1379	T, A, G	[46,118]
1440-1455	Drgania deformacyjne CH ₂ lipidów i białek	[10,44,46,48]

1492	Drgania oddychające pierścienia A i G w DNA	[10]
1580-1590	Drgania pierścienia pirymidyny, zginające C=C fenyloalaniny, kwasów nukleinowych	[10,44,48,118]
1645-1657	Amid I, α -helisa	[44,118]
1660-1665	Amid I, nieuporządkowane struktury trzeciorzędowe	
1660	Amid I, drganie rozciągające C=C w lipidach	[10,43,48]
1665-1680	Amid I, β -kartka	[44,118]
<i>A-adenina, C-cytosyna, G-guanina, T-tymina, U-uracyl</i>		

Zmiany w intensywności drgań C=C przy 1660 cm⁻¹ obserwowane pomiędzy średnimi widmami pojedynczych komórek (**Rysunek 19**) wskazywały na zmienną zawartość wielonienasyconych lipidów i mogą być traktowane jako wskaźnik stanu metabolicznego tych komórek. W celu dokładniejszego uchwycenia różnic jakościowych w składzie lipidów, dla każdej linii komórkowej porównano średnie widma klasy o wysokiej zawartości lipidów wydzielonej z obszaru komórkowego podczas KMCA. Widma klasy lipidowej obu linii komórkowych z *KMT2A-r* wykazały wysoki udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (**Rysunek 20 A**). Procent komórek danej linii, dla których w KMCA wydzielono klasę struktur lipidowych podczas analizy KMC wynosi około 56% dla RS4;11 i 60% dla komórek SEM. W odniesieniu do linii komórkowych reprezentujących podtyp *BCR-ABL1* było to odpowiednio 44%, 24% i mniej niż 1% dla zmierzonych komórek linii BV-173, SUP-B15 i SD-1 (**Rysunek 20 B**). Stosunkowo niską lipidowość komórek z fuzją genów *BCR-ABL1* wykazano również w komórkach pierwotnych pacjentów (odsetek komórek z obszarem bogatym w lipidy wynosił około 3%)[10].

Jednocześnie w oparciu o widma klasy lipidowej badanych komórek przeprowadzono ocenę stopnia nienasycenia lipidów pomiędzy liniami komórkowymi *KMT2A-r*, a komórkami reprezentującymi model z fuzją genów *BCR-ABL1*. Stopień nienasycenia oszacowano na podstawie stosunków intensywności integralnej pasm przypisywanych do drgań rozciągających wiązań C=C oraz drgań deformacyjnych CH₂ (**Tabela 4**). Analiza wartości stosunku pasm 1660 względem 1440 cm⁻¹ (**Rysunek 20 C**) wskazała na wyższy udział lipidów nienasyconych w profilu lipidowym komórek SEM, oraz RS4;11, względem komórek linii SUP-B15, BV-173. Analiza wariacji ANOVA potwierdziła, że obserwowane różnice dla I_{1660}/I_{1440} są istotne statystycznie. Analogiczny trend zaobserwowano dla stosunku intensywności pasm 1265 cm⁻¹ i 1305 cm⁻¹. Jednak ze względu na brak rozkładu normalnego

otrzymanych wartości I_{1265}/I_{1305} do oceny istotnych statystycznie różnic między badanymi parami linii komórkowych wybrano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa (**Rysunek 20 E**).

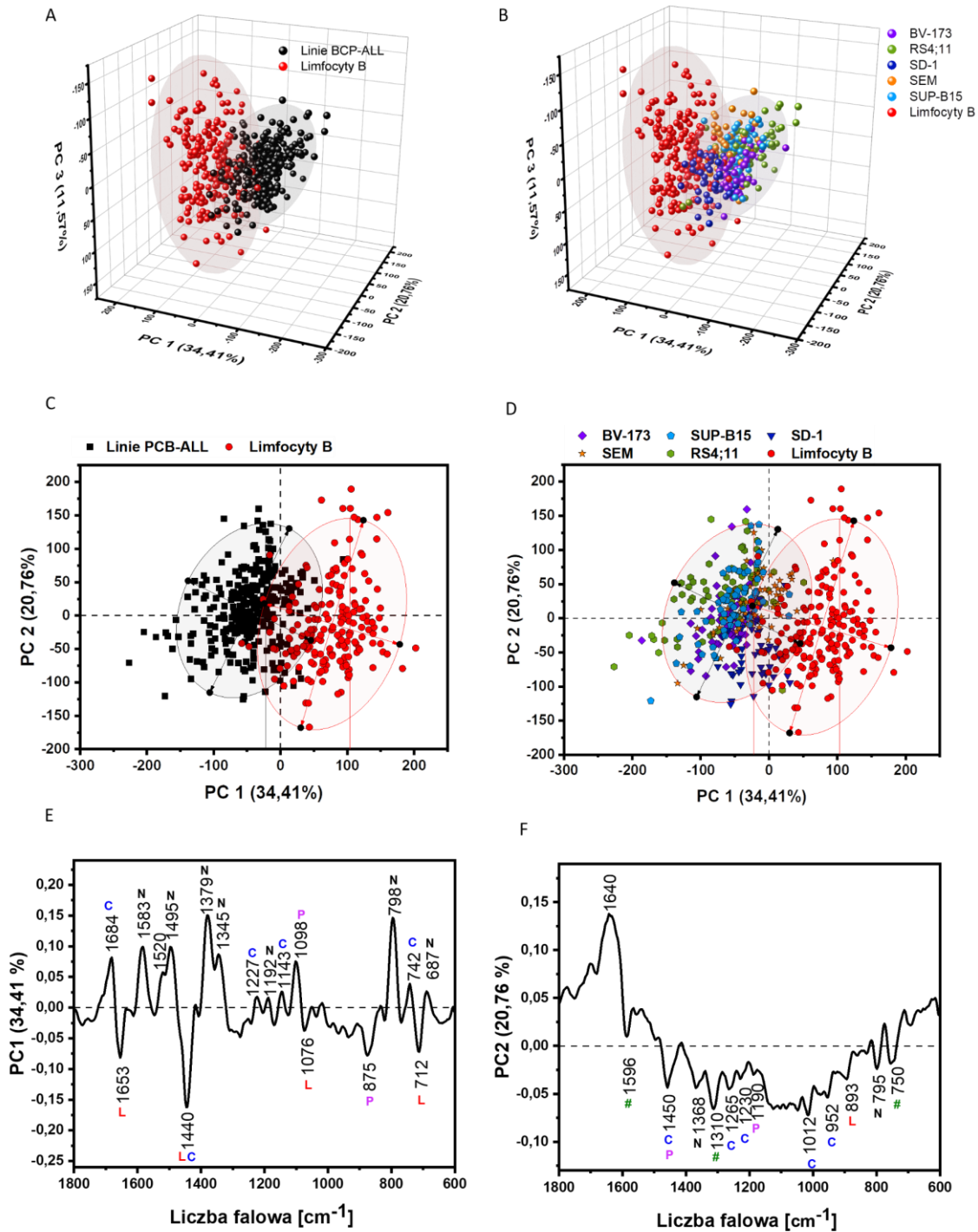


Rysunek 20 Charakterystyka spektroskopowa struktur lipidowych w badanych liniach komórkowych BCP-ALL. (A) Widma średnie z odchyleniem standardowym klasy struktur lipidowych. (B) Wykres procentowej zawartości

komórek z wyodrębniona klasą lipidów. (C) Stosunek intensywności integralnej pasm 1660 i 1440 cm^{-1} oraz (D) 1305 i 1265 cm^{-1} widm klasy struktur lipidowych w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyła. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazują wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartyłowego (ang. Inter Quartile Range, IQR). (E) Porównanie par badanych linii komórkowych w oparciu o wyniki nieparametrycznej analizy wariancji Kruskala-Wallis. Wyniki otrzymano dla 4 niezależnych eksperymentów biologicznych.

Pierwszym etapem diagnostyki chorób nowotworowych jest identyfikacja komórek nowotworowych poprzez rozróżnienie zmienionych chorobowo komórek od zdrowych, dlatego też dokładna identyfikacja subtelných różnic molekularnych manifestujących się na widmach ramanowskich komórek prawidłowych i białaczkowych, jak i ich klasyfikacja została przeprowadzona z wykorzystaniem nienadzorowanych (PCA) i nadzorowanych (PLS-DA, SVM-DA) metod chemometrycznych. Wykorzystano w tym celu 182 widma średnie pojedynczych komórek limfocytów B oraz 302 widma pojedynczych komórek z badanych linii komórkowych BCP-ALL. Zbiór widm komórek BCP-ALL składał się z widm linii komórkowych RS4;11, SEM, BV-173, SUP-B15 i SD-1 odpowiednio w proporcji: 23% 19%, 20%, 21% i 17%.

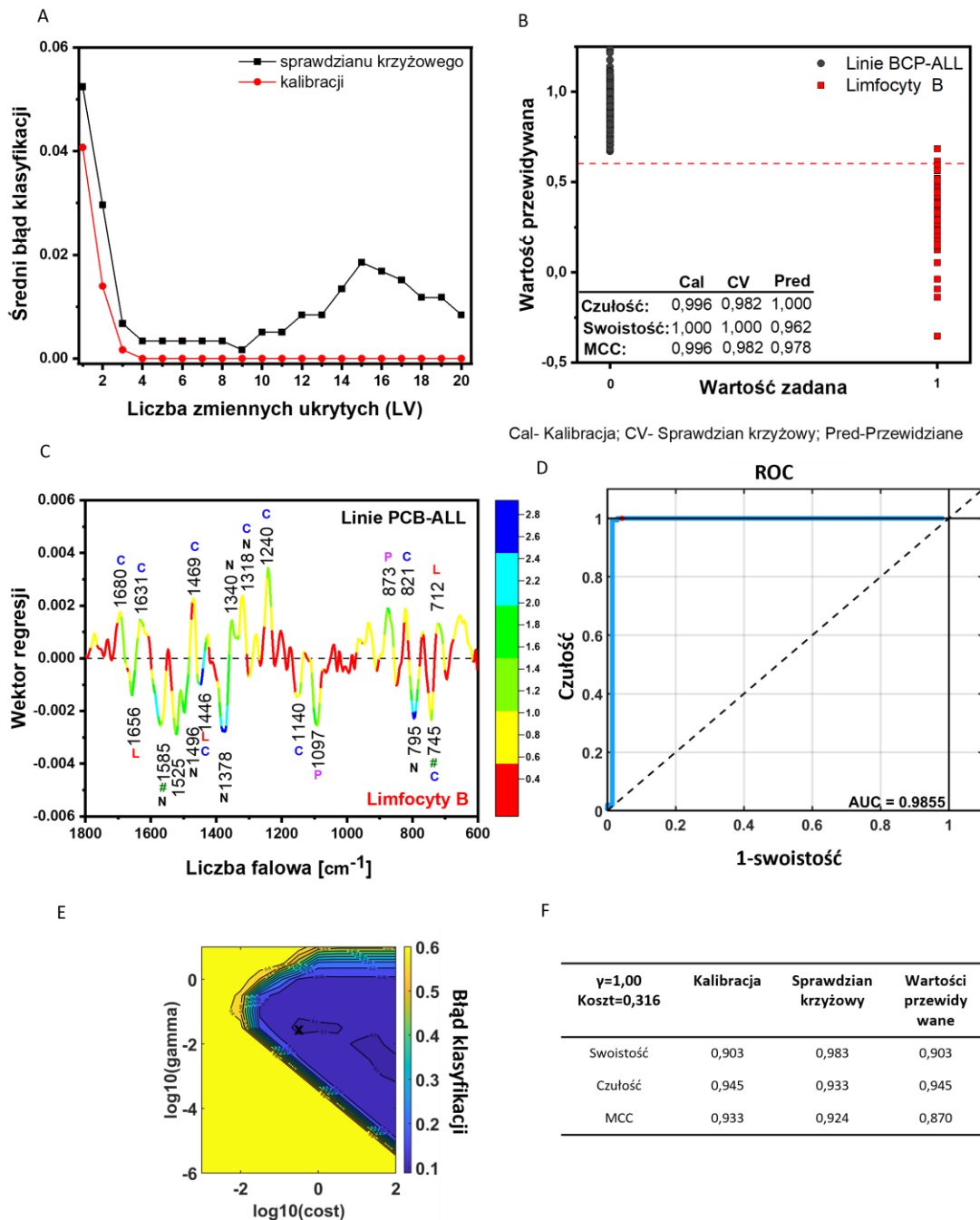
Otrzymane wyniki PCA wykazały, że 67% zmienności w obrębie danych może być opisane trzema głównymi składowymi (PC) (**Rysunek 21 A, C**). Zauważono jednorodny rozkład widm linii komórkowych BCP-ALL wzdłuż PC-1 względem widm komórek B (**Rysunek 21 B, D**). Szczegółowa analiza cech spektroskopowych przedstawionych na wykresach wartości czynnikowych PC1 i PC2 pozwala na identyfikację różnic molekularnych pomiędzy tymi dwoma grupami komórek. Dodatkowo wartości PC1 charakteryzujące widma limfocytów B przypisano głównie kwasom nukleinowym na podstawie obecności i wkładu pasm przy 1583, 1495, 1345, 798, 687 cm^{-1} oraz drganiom szkieletowym grupy PO_2^{2-} przy 1096 cm^{-1} . Z kolei jako charakterystyczne dla widm komórek BCP-ALL wskazane zostały na wykresie wartości czynnikowych PC1 pasma lipidów i białek (1653, 1440 cm^{-1}) oraz pasma wskazujące na większą zawartość choliny w układach lipidowych oraz na znaczny udział fosfolipidów (1076, 875 i 712 cm^{-1}) (**Rysunek 21 E**). Natomiast PC2 wskazuje na udział białek hemowych (750, 1310, 1596 cm^{-1} oraz charakterystyczne tło rezonansowe hemu), a także zawartości wody w cytozolu (1640 cm^{-1}) jako źródła zmienności pomiędzy widmami odpowiednio komórek białaczkowych i zdrowych (**Rysunek 21 F**). Ładunek PC może być również skorelowany ze stosunkiem powierzchni jądra do cytoplazmy, który w komórkach limfocytów B jest stosunkowo wysoki [122].



Rysunek 21 Wyniki analizy PCA widm średnich linii komórkowych reprezentujących BCP-ALL oraz widm komórek prawidłowych - limfocytów B. Wykresy 3D (A) i 2D (C) dla PC1 vs PC2 i PC3 z 95% elipsą ufności dla limfocytów B (N=182, 37,6%) i linii komórkowych BCP-ALL (N=302, 62,4%) oraz odpowiednio (B) (D) z kodowaniem kolorystycznym linii komórkowych zebranych w 3 różnych eksperymentach biologicznych. Wykres wartości czynnikowych PC1 (E) i PC2 (F) z przypisaniem do biokomponentów (L-lipidy, #-hemoproteiny, C-białka, P-fosforany, N-DNA w tym pojedyncze kwasy nukleinowe).

PCA dobrze sprawdza się jako metoda redukcji danych oraz oceny wariancji. Natomiast wykorzystanie otrzymanych modeli klasyfikacyjnych pozwala otrzymać bezpośrednią informację o stanie molekularnym badanych komórek, co jest to niezbędne, jeśli rozważa się zastosowanie metody analitycznej opartej na spektroskopii ramanowskiej w diagnostyce chorób i monitorowaniu wyników leczenia. PCA jako nienadzorowana metoda analizy poprzez analizę danych w czasie rzeczywistym jest jednak dość wymagająca i potrzebna przy jej stosowaniu jest wiedza doświadczenia operatora w analizie i interpretacji wyników. Zaletą metod nadzorowanych jest łatwa interpretacja wizualna wyników otrzymanych z odpowiednio opracowanych modeli predykcyjnych. Budowa modeli w analizie nadzorowanej opiera się na zdefiniowaniu prawidłowej odpowiedzi na podstawie zestawu danych wejściowych i wyjściowych. Poniżej przedstawiono kilka nadzorowanych podejść dyskryminacyjnych, takich jak PLS-DA i SVM-DA, które okazały się najbardziej efektywne w rozróżnianiu widm ramanowskich komórek prawidłowych i komórek BCP-ALL.

Model PLS-DA o pożądanym poziomie wartościach średniego błędów klasyfikacji kalibracji i walidacji uzyskano dla 4 zmiennych ukrytych (**Rysunek 22 A**). Do identyfikacji zmiennych o największym wkładzie w dyskryminację wykorzystano metodę zmiennych istotnych dla projekcji (ang. *Variance Important in Projection*, VIP). Wynik VIP wyższy niż 1 wskazuje na istotność zmiennej i został użyty jako marker w skali kolorystycznej a następnie przypisany do linii komórkowych B dla wartości ujemnych wektora regresji lub BCP-ALL dla wartości dodatnich (**Rysunek 22 C**).



Rysunek 22 Model PLS-DA dla 4 zmiennych ukrytych (A-D) oraz SVM-DA (E, F). (A) Zależność średniego błędu klasyfikacji kalibracji i sprawdzianu krzyżowego od ilości zmiennych ukrytych. (B) Wynik predykcji, przerywaną linią zaznaczono wartość progu klasyfikacji. (C) Wektor regresji z kodowaniem kolorystycznym zależnym od wartości VIP. Pasma ramanowskie o wartości VIP większej od 1 zostały wskazane jako istotne dla dyskryminacji i przypisane do biokomponentów (L-lipidy, #-hemoproteiny, C-białka, P-fosforany, N- DNA w tym kwasy nukleinowe). (D) krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika z obliczonym polem powierzchni (AUC). (E) Sumaryczny wykres błędu klasyfikacji względem parametrów SVM kosztu i γ . (F) Wyniki klasyfikacji dla wybranych wartości γ i kosztu użytych do wytrenowania optymalnego modelu SVM.

Minima wektora regresji (zmienne przy liczbach falowych 1585, 1496, 1378, 1097, 795 cm^{-1}) zostały w modelu PLS-DA wskazane jako specyficzne dla komórek B,

i jak wspomniano wyżej mogą być przypisane drganiom oscylacyjnym kwasów nukleinowych. Jako istotne zmienne spektralne dla widm linii komórkowe BCP-ALL zidentyfikowano pasma przypisane białkom (amid I ($1680, 1631\text{ cm}^{-1}$), amid III (1240 cm^{-1})) oraz antysymetrycznemu rozciąganiu markera $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ w fosfatydylocholinie obecnej w błonie komórkowej (873 i 712 cm^{-1}) (**Rysunek 22 C**). Obrazowanie z większą gęstością próbkowania umożliwiłoby analizę morfologiczną wskazującą, czy nagromadzenie fosfolipidów jest spowodowane rozmiarem kropli lipidowych, czy jest skutkiem powiększonego retikulum endoplazmatycznego. Powyższe zmiany spektroskopowe można skorelować ze zwiększoną aktywnością komórkową komórek białaczkowych spowodowaną zmianą źródła energii metabolicznej oraz nadekspresją niektórych białek w wyniku zaburzonych ścieżek sygnalizacyjnych. Ponadto, ze względu na nasiloną produkcję białek, których synteza i fałdowanie realizuje się w obszarze ER, którego błony wykazują dużą zawartość lipidów, sfingomieliny i fosfatydylocholiny.

Użyteczność opracowanego modelu PLS-DA została dodatkowo zweryfikowana przez predykcję zestawu widm z niezależnego powtórzenia biologicznego, którego dane spektralne nie zostały włączone do na etapie uczenia i walidowania modelu. Wydajność modelu o progu dyskryminacji 0,6 wykazuje wysokie wartości czułości i swoistości dla predykcji obu typów komórek zarówno podczas kalibracji (0,996, 1,000), sprawdzianu krzyżowego (0,986, 1,00), jak i predykcji modelu PLS-DA (1,00, 0,962) (**Rysunek 22 B**). Obszar pod krzywą charakterystyki operacyjnej (ROC AUC) był równy 0,986, co również potwierdza wysoką skuteczność opracowanego modelu (**Rysunek 22 D**). Drugim parametrem, który pozwala ocenić wydajność modelu, jest wartość współczynnika korelacji Matthews'a (MCC), który lepiej opisuje modele ze zbiorami danych o różnej wielkości. Dla uzyskanego modelu wartość MCC była równa: 0,996, 0,982 i 0,978, odpowiednio dla kalibracji, sprawdzianu krzyżowego i testowania modelu. Wartości swoistości i czułości obliczone dla MCC różnią się od tych obliczonych powyżej, jednak wszystkie przekraczają wartość 0,85, którą uznaje się za zadowalającą.

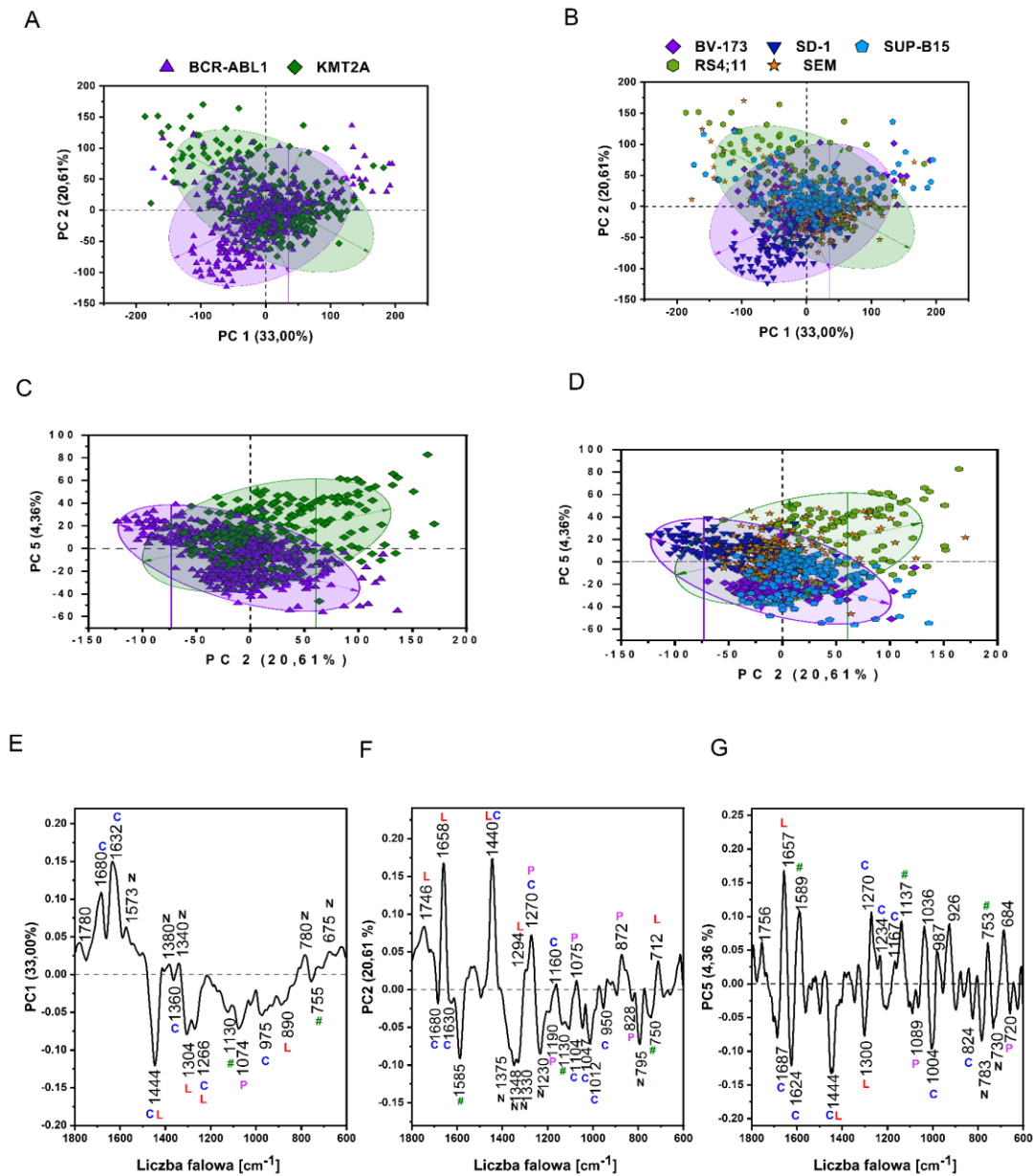
Główną zaletą PLS-DA jest dostęp do informacji o zmiennych istotnych dla efektywnej dyskryminacji próbek. Informacja ta jest kluczowa dla zrozumienia biologicznych podstaw obserwowanych zmian i metabolomiki komórkowej. Jednak ze względu na pewne ograniczenia PLS (np. założenie liniowości zmian w modelu regresji) w przypadku pomiarów próbek biologicznych należy rozważyć zastosowanie innych podejść uczenia maszynowego,

które opierają się na algorytmach optymalizacyjnych. Do takich należy metoda wektorów nośnych (SVM-DA), w której do wyznaczenia klas poszukuje się wektorów wsparcia wyznaczających hiperpłaszczyznę. Parametry kosztu i γ są optymalizowane dla liczby wektorów wsparcia. Najlepszy model o 175 wektorach wsparcia otrzymano dla zestawu danych zrekonstruowanego z 3 głównych składowych (**Rysunek 22 E, F**). Do optymalizacji modelu zastosowano radialną funkcję jądra. Wydajność modelu SVM-DA w porównaniu z modelem PLS-DA uległa zmniejszeniu (kalibracja, sprawdzian krzyżowy i predykcja) (**Rysunek 22 F**) w zakresie swoistości, czułości i MCC. Przedstawiony model SVM-DA został wybrany jako optymalny kompromis pomiędzy wartościami γ i kosztu względem parametrów wydajności modelu.

BCP-ALL z *KMT2A-r* i fuzją *BCR-ABL1* stanowią grupę białaczek wysokiego ryzyka, a ich szybka identyfikacja jest istotna dla efektywności wdrażanego leczenia u pacjentów z ALL. W niniejszej pracy podjęto się wyznaczenia markerów spektroskopowych potencjalnie pomocnych w identyfikacji blast BCP-ALL z *KMT2A-r* i fuzją *BCR-ABL1* oraz ich rozróżnienia na podstawie różnic molekularnych. Pierwszą zastosowaną w tym celu metodą było PCA, wykonane na średnich widmach pojedynczych komórek. Analiza głównych składowych nie wykazała znacznych różnic pomiędzy widmami tych dwóch badanych grup komórek. Na wykresie zależności PC1 vs. PC2 (**Rysunek 23 A, C**) zaobserwowano nieznaczne grupowanie i rozdzielanie części widm ramanowskich komórek reprezentujących podtypy *BCR-ABL1* i *KMT2A-r* wzdłuż PC2, opisującej 20,61% wariancji danych. Gdy poszczególne linie komórkowe analizuje się na wykresie ładunków czynnikowych indywidualnie (**Rysunek 23 B, D**), można zauważyć, że widma linii komórkowej SD-1 różnią się najbardziej, a korelacja ich dystrybucji w przestrzeni PCA z ujemnymi wartościami wykresu ładunków czynnikowych PC2 pozwala wskazać odpowiadające im pasma markerowe przypisywane głównie kwasom nukleinowym (1375, 1330, 1230, 795 cm^{-1}) oraz hemoproteinom (1585, 750 cm^{-1}) (**Rysunek 23 E, F**). Część widm komórek RS4;11 wykazywała istotność pasm lipidowych w ich spektralnej charakterystyce (1658, 1300 cm^{-1}), w tym estrów (1764 cm^{-1}) i fosfolipidów zawierających cholinę (1075, 872 cm^{-1}). Podobne wnioski można wyciągnąć analizując profil spektralny PC5, która z kolei wyraża już tylko 4,36% zmienności danych (**Rysunek 23 C, D**). Komórki linii komórkowej SD-1, część komórek z linii komórkowych RS4;11 i SEM, charakteryzowały się pasmami 1589, 1137 i 753 cm^{-1} specyficznymi dla hemoprotein, 1660 cm^{-1} przypisanymi lipidom nienasyconym (drgania C = C) i białkom. Natomiast wartości 1687, 1624, 1004, 824 cm^{-1} odnoszące się do drgań komponentów białek

oraz 1444 cm^{-1} z 1304 cm^{-1} odpowiednio drgań deformacyjnych i skręcających CH_2 obserwowano głównie w lipidach nasyconych. Ujemne wartości PC5, korelowały również z widmami komórek z obecnością chromosomu *Philadelphia* (BV-173 i SUP-B15) oraz częścią widm ramanowskich linii komórkowych RS4;11 i SEM (**Rysunek 23 G**). Uzyskany wynik pokazuje zatem, że linie komórkowe w obrębie tego samego podtypu genetycznego białaczki różnią się od siebie molekularnie, co odzwierciedla ich różnice w profilu spektralnym. Obserwacja ta prowadzi do wniosku, że markery chorobowe zidentyfikowane za pomocą analizy PCA pojedynczych linii komórkowych mogą nie być reprezentatywne ze względu na dużą heterogenność różnych modeli linii komórkowych reprezentujących dany podtyp nowotworu. Niemniej jednak podwyższona zawartość hemoprotein identyfikowana przez pasma przy 1131 , 1130 , 753 cm^{-1} była również obserwowana w próbkach klinicznych z fuzją *BCR-ABL1* pobranych od pacjenta cierpiących na BCP-ALL [10], co jest spójne z grupowaniem widm większości komórek z obecnym chromosomem *Philadelphia* po ujemnej stronie czynnika PC2.

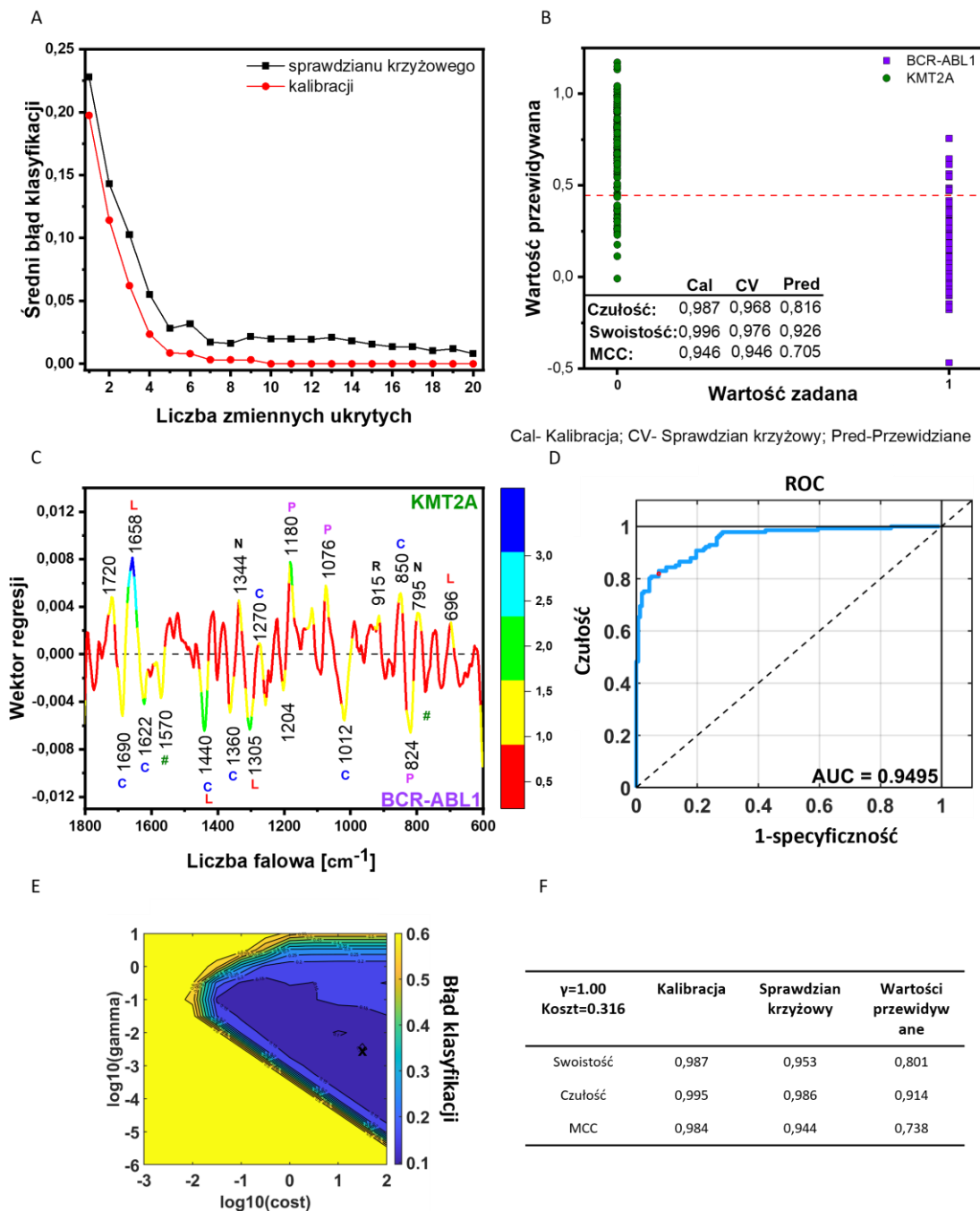
Zatem podsumowując, na podstawie uzyskanych metodą PCA wyników oraz opublikowanych wyników dla próbek pierwotnych [10] można wnioskować, że pasma 1585 , 1130 i 753 cm^{-1} mogą być istotnymi markerami mutacji genetycznej *BCR-ABL1*, natomiast sygnały przy 1764 , 1658 , 1300 i 1075 , 872 cm^{-1} wskazujące zwiększoną zawartość lipidów i fosfolipidów dla *KMT2A-r*.



Rysunek 23. Analiza PCA 449 widm (58,4%) komórek z mutacją BCR-ABL1 i 320 widm (41,65%) komórek z grupy KMT2A-r. Udział poszczególnych linii komórkowych był w następujący: RS4;11 21,1%, SEM 19,5% (KMT2A), BV-173 18,6%, SUP-B15 22,4%, SD-1 17,4% (BCR-ABL1). Wykres PC1 vs. PC2 z zaznaczoną elipsą ufności (A) dla BCP-ALL z fuzją genów BCR-ABL1 i KMT2A-r (B) a także z kodowaniem kolorystycznym poszczególnych badanych linii komórkowych. Wykres ładunków czynnikowych PC1 (E), PC2 (F) i PC5 (G) z przypisaniem do biokomponentów (L-lipidy, #-hemoproteiny, C-białka, P-fosforany, N-DNA w tym pojedyncze kwasy nukleinowe).

Podjęcie analizy danych z wykorzystaniem nienadzorowanego nauczania przy dużej zmienności w obrębie klas okazało się być mało efektywne w klasyfikacji widm różnych podtypów BCP-ALL. Dlatego, podobnie jak poprzednio, zastosowano metody nadzorowane

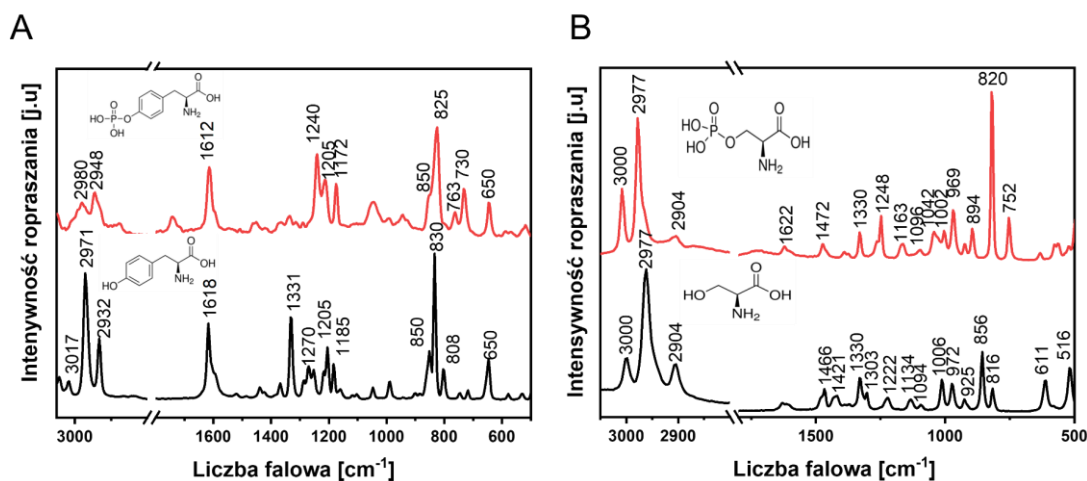
do opracowania modelu klasyfikacyjnego widm ramanowskich linii komórkowych reprezentujących mutację *BCR-ABL1* i *KMT2A-r* (Rysunek 24). Model PLS-DA o najniższym błędzie klasyfikacji uzyskano dla 5 LV (Rysunek 24 A).



Rysunek 24 Modele klasyfikacyjne komórek z obecnością *BCR-ABL1* i *KMT2A-r* przy użyciu dwóch algorytmów, tj. modelu PLS-DA dla 5 zmiennych ukrytych (A-D) oraz SVM-DA (E, F). (A) Średni błąd klasyfikacji względem liczby zmiennych ukrytych LV (B) Wyniki predykcji. Czerwona linia wskazuje próg użyty do klasyfikacji. (C) Wektor regresji z kodowaniem kolorystycznym względem wartości VIP. Ekstrema wektora regresji o wartościach VIP większych od 1 zostały wskazane jako istotne dla klasyfikacji i przypisane do biokomponentów (L-lipidy, # hemoproteiny, C-białka, P-fosforany, N- DNA w tym kwasy nukleinowe). (D) Krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika (ROC) z obliczonym AUC. (E) Wykres błędu klasyfikacji

względem parametrów SVM kosztu i γ . (F) Wartości parametrów wydajności modelu dla wybranych wartości γ i kosztu użytych do wytrenowania optymalnego modelu SVM.

Wektor regresji (**Rysunek 24 C**) podobnie jak na **Rysunku 22 C** kodowany jest kolorystycznie zgodnie z wartościami VIP. Analiza PLS-DA podobnie do PCA, wskazuje, że w grupie komórek *KMT2A-r* obserwuje się większą zawartość lipidów nienasyconych. Jednak nie wszystkie pasma związane z lipidami zostały wskazane na wykresie VIP czy na wektorze regresji, co może wynikać z faktu, że nie wszystkie zmienne ramanowskie zostały wybrane jako istotne w klasyfikacji. Widma komórek *KMT2A-r* o przypisanej wartości 1 (**Rysunek 24 B**) w modelu PLS-DA charakteryzują się większym udziałem pasm 1658 cm^{-1} (lipidy nienasycone), 1180, 1076 cm^{-1} (fosfolipidy). Sygnatury wektora regresji charakteryzujące widma komórek *BCR-ABL1* przypisane są głównie białkom: 1690 i 1622 cm^{-1} (amid I), 1360 cm^{-1} (amid III) oraz 1012 cm^{-1} (fenyloalanina). Ponadto pasma przy 1444 i 1305 cm^{-1} pozwalają wysnuć wniosek, że zawartość lipidów jest również różna dla tych komórek, przy czym lipidy nasycone są bardziej wyraźne w komórkach *BCR-ABL1*. Ponadto dla *BCR-ABL* występuje pasmo o-fosfo-L-tyrozyny przy 825 cm^{-1} (**Rysunek 25 A**) oraz o-fosfo-L-seryny (**Rysunek 25**) przy 819 cm^{-1} . Cechą charakterystyczną komórek z obecnością kinazy *BCR-ABL1* jest silny wzór fosforylacji białek.



Rysunek 25 Widmo ramanowskie ciała stałego (A) *L*-tyrozyny i *o*-fosfo-*L*-tyrozyny oraz (B) seryny i fosfo-*L*-seryny.

Wartości VIP nie wskazywały jako charakterystycznych dla komórek z obecnością chromosomu *Philadelphia* pasm cytochromowych wskazanych w PCA. Potwierdzono klasyfikację widm komórek z fuzją genów *BCR-ABL1* na podstawie pasm markerowych białek

i hemoprotein, a widm komórek *KMT2A-r* o zwiększonej zawartości lipidów, co jest zgodne z wcześniej opublikowanymi badaniami ramanowskimi na limfoblastach [10,105]. Jednak wzrost nienasycenia lipidów dla komórek z *KMT2A-r* w porównaniu z komórkami z fuzją genu *BCR-ABL1* nie została dotychczas odnotowana.

Parametry wydajności modelu PLS-DA zweryfikowano za pomocą miar czułości i swoistości oraz współczynnika korelacji Matthew dla każdego etapu: kalibracji (0,987, 0,996, 0,946), sprawdzianu krzyżowego (0,968, 0,976, 0,946) i predykcji (0,816, 0,926, 0,705). Podczas etapu predykcji stwierdzono, że wszystkie miary skuteczności modelu uległy zmniejszeniu, jednak najsilniejszy efekt zaobserwowano dla MCC, co potwierdza, że swoistość i czułość są zbyt optymistyczne w bardziej złożonych przypadkach [52].

W przypadku opracowany modelu SVM-DA (**Rysunek 24 E**) dla zachowania równowagi pomiędzy γ i kosztem przy najkorzystniejszych parametrach wydajności został wybrany model klasyfikacji SVM na danych skompresowanych metodą PLS (z 5 LV). Klasyfikację przeprowadzono w oparciu o 66 SV z optymalizacją parametrów kosztu i γ wynoszących odpowiednio 31,6 i 0,003. Zaobserwowano niższą wydajność niż modelu PLS-DA, szczególnie na etapie predykcji, gdzie MCC kalibracji i walidacji zmniejszył się odpowiednio z 0,984 i 0,944 do 0,738. Również swoistość zmniejszyła się do 0,914, podczas, gdy czułość wyniosła tylko 0,810. Porównując ten model z klasyfikacją widm ramanowskich komórek B i BCP-ALL opartą na SVM, zmiana parametrów wydajności modelu jest bardziej zauważalna.

1.3. Wnioski

W ramach pierwszej części pracy wykonano charakterystykę ramanowską modeli *in vitro* dwóch podtypów molekularnych białaczki BCP-ALL reprezentowanych przez kilka modeli komórkowych: *KMT2A-r* (linie komórkowe RS4;11 SEM) oraz *BCR-ABL1* (linie komórkowe BV-173, SUP-B15 i SD-1). Dane ramanowskie były analizowane przy użyciu metod opartych na uczeniu maszynowym w celu dyskryminacji dwóch podtypów i identyfikacji ich markerów molekularnych. Zarówno PCA, jak i PLS-DA wskazały na istotne różnice w składzie chemicznym zarówno prawidłowych komórek B, jak i komórek białaczki BCP-ALL. Największe różnice dotyczyły zawartości kwasów nukleinowych, białek i lipidów.

Wykresy ładunków czynnikowych w PCA wskazały na zwiększoną intensywność pasm związanych z lipidami dla linii komórkowych BCP-ALL, natomiast model PLS-DA wykazał również udział białek, które mogą być skorelowane z aktywnością metaboliczną komórek *KMT2A-r*. Opracowane modele klasyfikacyjne PLS-DA i SVM-DA wykazują wysokie wartości czułości i swoistości (powyżej 0,900) dla etapów kalibracji, sprawdzianu krzyżowego i predykcji. Również MC był bardzo zadowolający z wartościami powyżej 0,870 dla obu modeli.

Badane modele *in vitro* podtypów białaczki komórkowej, pomimo obecności tych samych mutacji, różnią się od siebie na poziomie morfologicznym, molekularnym i metabolicznym. Jest to bardzo istotne z punktu widzenia badań naśladujących warunki *in vivo*, takich jak badania interakcji lek-komórka czy ocena chemiowrażliwości komórek białaczkowych. Pomimo obserwowania cech specyficznych dla linii komórkowych, możliwe było znalezienie pasm charakterystycznych dla BCP-ALL z ekspresją białka fuzyjnego BCR-ABL1, które zostały porównane z wcześniej opublikowanymi wynikami otrzymanymi dla próbek klinicznych. Wykazano, że badane tu modele *in vitro* z fuzją genów *BCR-ABL1* miały zwiększoną intensywność pasm związanych z hemoproteinami, DNA i tyrozyną. Ponadto stwierdzono, że zawartość nienasyconych lipidów była wyższa w komórkach z *KMT2A-r* niż w komórkach z obecnością chromosomu *Philadelphia*.

Rozróżnienie linii komórkowych z *KMT2A-r* i z fuzją *BCR-ABL1* za pomocą PCA nie jest wystarczające i wskazuje na specyficzne cechy linii komórkowych, takie jak np. zwiększona zawartość hemoprotein w przypadku SD-1 (*BCR-ABL1*) lub podwyższona zawartość lipidów w przypadku RS4;11 (*KMT2A-r*). Widma ramanowskie BV-173 i SUP-B15 (*BCR-ABL1*) wykazywały pasma przypisywane lipidom nasyconym, których nie obserwowano w przypadku linii komórkowych RS4;11, SEM (*KMT2A-r*) i SD-1 (*BCR-ABL1*) bogatszych w lipidy nienasycone. W podejściu nadzorowanym metodą PLS-DA wykazano różnicę pomiędzy komórkami *KMT2A-r* i *BCR-ABL1*, związaną odpowiednio z zawartością lipidów nienasyconych i nasyconych. W grupie widm komórek z *BCR-ABL1* jako istotne zidentyfikowane były pasma charakterystyczne białek oraz ufosforylowanych aminokwasów (seryny i tyrozyny), co jest zgodne z molekularnym mechanizmem działania kinazy BCR-ABL1 w komórkach białaczkowych. Ponadto, pomimo wysokiej czułości i swoistości w modelach PLS-DA i SVM-DA, MCC wykazał niższe wartości obu tych parametrów, co wskazuje, że ta miara wydajności opracowanych modeli jest bardziej rzetelna. W ten sposób

udowodniano, że MCC jest bardziej wiarygodnym parametrem do weryfikacji wydajności modelu w tak trudnych przypadkach jak klasyfikacja podtypów białaczki na podstawie subtelnych różnic w zbiorze danych, gdy dodatkowo obserwuje się dużą zmienność w zbiorze każdej z podgrup.

2. Spektroskopowa charakterystyka interakcji ruksolitynibu w modelach *in vitro Ph-like* BCP-ALL z mutacją punktową kinazy JAK2

2.1. Opis stosowanych metod.

Przygotowanie materiału biologicznego.

Hodowla komórkowa, jak i stymulacje farmakologiczne omawiane w tej części pracy realizowane były w Klinice Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w grupie badawczej prof. dr hab. N. med. Wojciecha Młynarskiego. Preparaty komórkowe przygotowywane były przez dr Justynę Jakubowską i dr Martę Ząbczyńską. Do badań nad identyfikacją zmian biochemicznych i metabolicznych w komórkach *Ph-like* z mutacją punktową kinazy JAK2 wybrano dwie linie komórkowe MHH-CALL-4 oraz MUTZ-5.

Linie komórkowe MHH-CALL-4 (DSMZ, Braunschweig, Germany) hodowano w pożywce komórkowej RPMI 1640 (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo) suplementowanych 10% FBS (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo). Natomiast komórki MUTZ-5 hodowano w pożywce komórkowej McCoy (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo) suplementowanej 20% FBS. Wszystkie pożywki uzupełniono 100 U/ml penicyliny i 100 µg /ml streptomycyny (Merck, Darmstadt, Niemcy). Linie komórkowe utrzymywano w atmosferze zawierającej 5% CO₂ w temperaturze 37 °C.

Do badań ramanowskich komórki obu linii traktowano ruksolitynibem (RUX) (SelectChem, Huston, TX, USA) o stężeniu 10µM przez 0,5 i 48 h. Zarówno stężenie leku, jak i czas inkubacji wybrane zostały na podstawie oceny przeżywalności komórek oraz analizy fosforylacji białka STAT5. Badanie te wykonał zespół badawczy prof. Wojciecha Młynarskiego. Maksymalne stężenie DMSO (rozpuszczalnik dla RUX) w próbkach traktowanych lekiem oraz kontrolnych nie przekracza 0.1% DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Zestaw komórek kontrolnych każdorazowo był przygotowany dla każdego czasu inkubacji. Spadek fosforylacji białek potwierdzono cytometrycznie jak również metodą Western Blot oznaczając ekspresję kinazy STAT5 w formie nieufosforylowanej i ufosforylowanej. Oznaczenia wykonały dr Justyna Jakubowska oraz dr Marta Ząbczyńska.

Komórki przygotowane do badań ramanowskich zostały po zadanym czasie inkubacji przepłukane trzykrotnie roztworem soli fizjologicznej i utrwalone 0,5% glutaraldehydem zgodnie z protokołem opisanym w sekcji **IV.1.1**.

Obrazowanie ramanowskie

Pomiary obrazowania ramanowskiego przeprowadzono według ustalonego protokołu w celu ograniczenia wpływu czynników pomiarowych na tzw. efekt serii (ang. *batch effect*) podczas wielowymiarowej analizy danych. Minimalizacja efektów wynikających z nieznacznych różnic technicznych między eksperymentami umożliwiła łączną analizę zestawów danych oraz zapewniła powtarzalność otrzymywanych wyników. Szczegóły dotyczące pomiarów ramanowskich opisano w sekcji **IV. 1.1 Części eksperymentalnej**

Analiza danych spektroskopowych

Przygotowanie danych spektralnych do analiz chemometrycznych przeprowadzono w programie Project FIVE 5.3 Plus (Oxford Instruments, Abingdon, UK), wykorzystując funkcję usuwania promieniowania kosmicznego (CRR) oraz korektę linii podstawy wielomianem 3 rzędu. Następnie hiperspektralne obrazy ramanowskie pojedynczych komórek eksportowano i z wykorzystaniem programu napisanego w języku Python przez dr Annę Nowakowską opartego na współczynniku korelacji Pearsona przygotowano widma średnie całej komórki oraz struktur lipidowych.

Widma średnie przygotowano w programie OPUS 7.1 (Bruker Optics, Billerica, USA), uprzednio dokonując wygładzania metodą Savitzky'ego-Golaya (9 punktów) dodatkowo usuwając linię podstawy algorytmem Rubberband o 64 punktach wsparcia, jak również dokonując normalizacji wektorowej w zakresie $3030-500\text{ cm}^{-1}$. Tak przygotowane widma posłużyły również do obliczenia intensywności integralnych (pól powierzchni) wybranych pasm.

Widma średnie pojedynczych komórek zostały poddane analizie wielowymiarowej w programie PLS-Toolbox 9.2 (Eigenvector Research, USA). Widma analizowano w zakresie daktyloskopowym $1800-500\text{ cm}^{-1}$, po uprzednim wygładzeniu metodą Savitzky'ego-Golaya (wielomian 3 rzędu, 15 punktów) oraz zastosowaniu Rozszerzonej Multiplikatywnej Korekty Sygnału EMSC opartej na 5 członów będących wielomianami o rosnącym stopniu. Kolejno widma poddano dodatkowej normalizacji metodą SNV. Dodatkowo przed przystąpieniem do analiz wielowymiarowych widma poddano centrowaniu względem centroidu wszystkich klas [123].

Jako wiodącą metodę wielowymiarowej analizy danych umożliwiającą opracowanie algorytmów predykcyjnych wykorzystano ortogonalną analizę cząstkowych najmniejszych kwadratów (O-PLS-DA). W przygotowanych modelach 65% dostępnych danych, stanowiących wyniki eksperymentalne z dwóch powtórzeń biologicznych, wykorzystano w etapie kalibracji i sprawdzianu krzyżowego metodą *Venetian Blinds* (10-15 podziałów na podgrupy liczące 10-15 widm), podczas gdy 35% dostępnych danych wykorzystano do predykcji. Dodatkowo, opracowane modele O-PLS-DA o ilość zmiennych ukrytych wybranych na podstawie najniższych wartości średniego błędu kalibracji i sprawdzianu krzyżowego zostały weryfikowane poprzez permutację przypisania klas oraz testy Wilcoxa dla pojedynczej próby oraz test t-studenta.

2.2. Wyniki i dyskusja

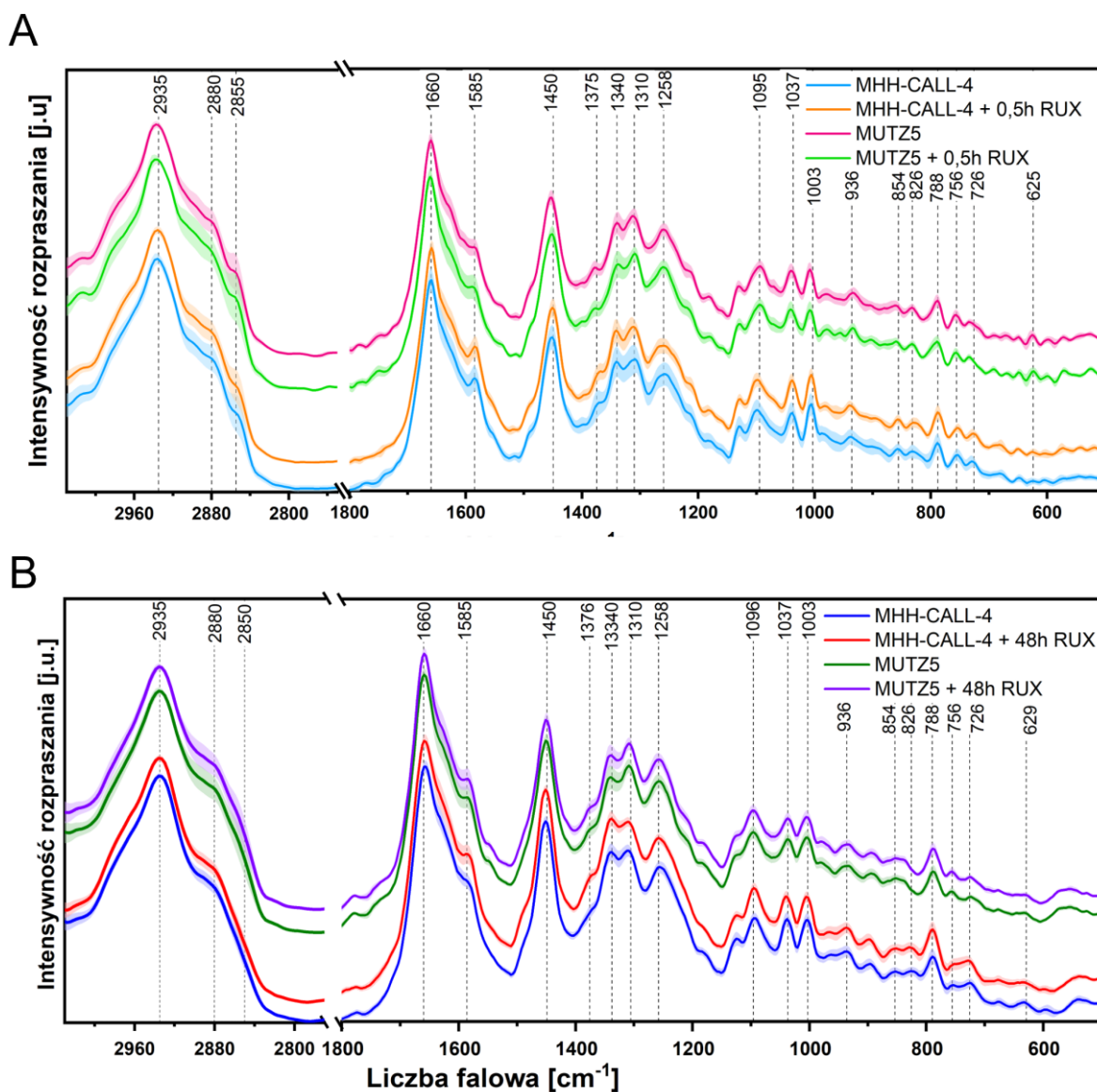
W niniejszej części pracy przedstawiono wstępne wyniki spektroskopowej charakterystyki krótko (0,5 h) i długotrwałego (48 h) oddziaływania ruksolitynibu inhibitora kinazy tyrozynowej JAK2 w modelach *in vitro* reprezentujących BCP-ALL z mutacją punktową JAK2. Komórki MHH-CALL-4 posiadają mutację punktowa kinazy JAK2 I682F, podczas gdy komórki linii MUTZ5 cechuje mutacja punktowa R638G, co wpływa na aktywność kinazy JAK2 i skutkuje wzrostem poziomu fosforylacji i aktywności czynników transkrypcyjnych STAT5 [92]. Ruksolitynib (RUX) na obniżenie aktywności kinazy JAK2 pośrednio powodując spadek odsetka ufosforylowanych białek STAT5.

Podobnie jak w sekcji IV.1. Części eksperymentalnej dysertacji, w celu weryfikacji hipotezy badawczej wybrano kilka modeli *in vitro*. Wyniki badań przedstawionych poniżej miały na celu spektroskopową ocenę zmian molekularnych i metabolicznych komórek białaczkowych stymulowanych RUX, które następnie umożliwiłyby identyfikację mechanizmów molekularnych indukowanych przez RUX w komórkach białaczkowych oraz wyznaczenie markerów spektroskopowych interakcji ruksolitynibu z komórkami BCP-ALL z mutacją punktową JAK2. Zastosowanie dwóch różnych modeli komórkowych miało na celu wyeliminowanie możliwości identyfikacji pasm diagnostycznych błędnie identyfikowanych jako marker specyficzny dla interakcji komórka z mutacją punktową JAK2 - RUX, a będących w rzeczywistości cechą spektroskopową specyficzną tylko dla danej linii

komórkowej. Analiza odpowiedzi komórkowej w dwóch różnych modelach pozwala dodatkowo na ocenę wpływu miejsca mutacji na siłę oddziaływania RUX z JAK2 [124].

Poniżej prezentowane są wyniki badań dla danych spektroskopowych zarejestrowanych w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych, dla których cytometrycznie potwierdzono wywołanych inkubacją z RUX spadek poziomu ufosforylowanego białka STAT5 (pSTAT5) względem całościowej zawartości białka STAT5. Dla populacji komórek MHH-CALL-4 poddawanych działaniu 10 μ M RUX poziom fosforylacji białek STAT5 wynosił około 55% oraz 23% względem kontroli po odpowiednio 0,5 h i 48 h. Natomiast w modelu MUTZ5 RUX wywołuje spadek fosforylacji do około 40% oraz 23% względem grupy kontrolnej po odpowiednio 0,5 h i 48 h inkubacji, wskazując tym samym na znacznie większe zahamowanie fosforylacji białka STAT5 po 48 h.

Do badań z wykorzystaniem mikroskopii ramanowskiej przygotowano preparaty utrwalonych komórek obu linii uprzednio inkubowanych RUX w dawce skutkującej przeżywalnością powyżej 80% względem kontroli. Średnie widma ramanowskie pojedynczych komórek reprezentujące każdą badaną grupę komórek, zaprezentowano na **Rysunek 26**.



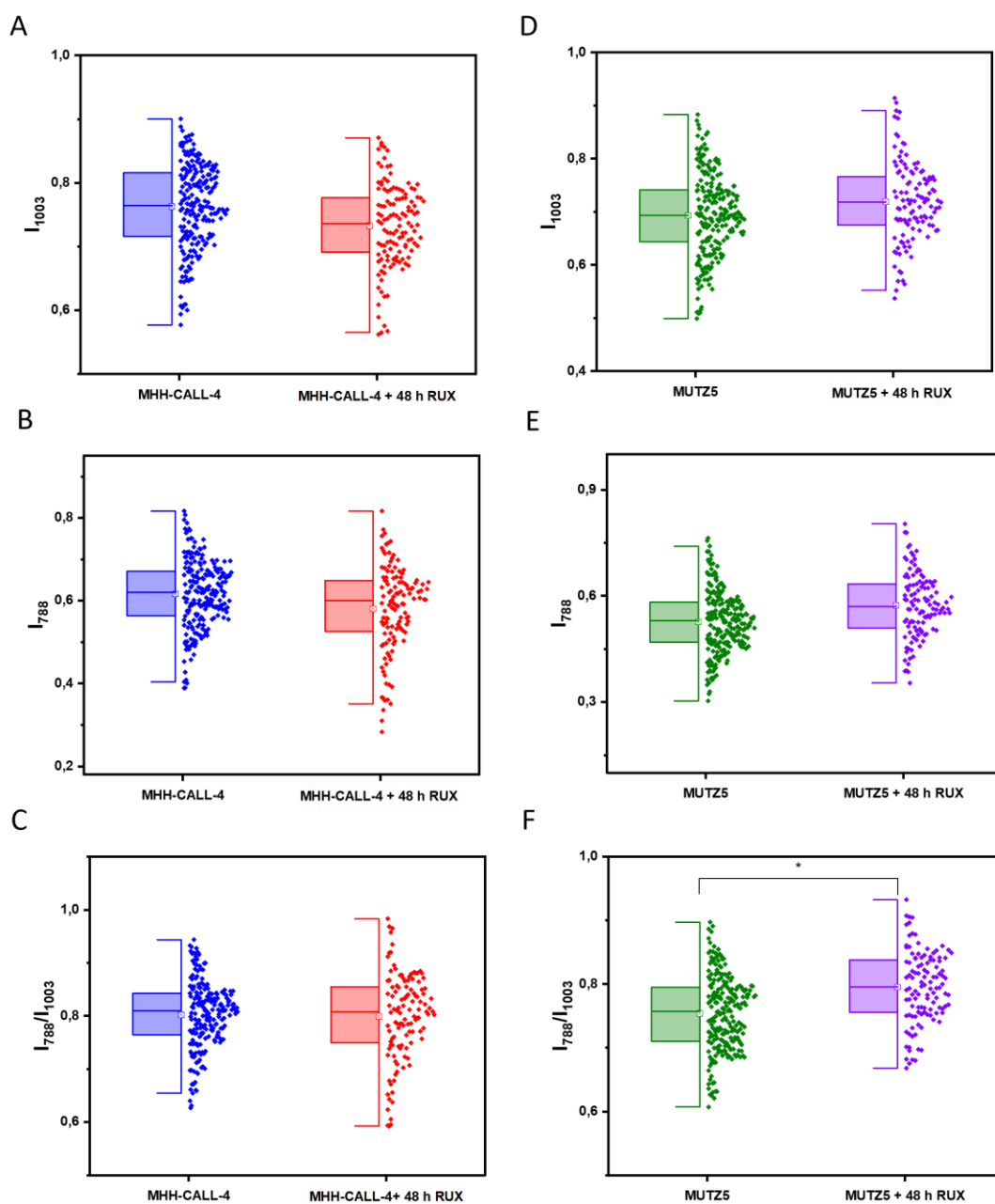
Rysunek 26 Widma średnie z odchyleniem standardowym komórek MHH-CALL-4 i MUTZ5 kontrolnych i traktowanych $10 \mu\text{M}$ ruksolitynibu przez (A) 0,5 h i (B) 48 h

Jak można zauważyć w oparciu o analizę widm na **Rysunek 26** profil spektralny obu linii komórkowych niezależnie od czasu trwania stymulacji z lekiem jest różny. Szczególnie różnice w profilu spektralnym obu linii są widoczne na podstawie względnych intensywności pasm 1340 cm^{-1} (drżania A, G w DNA) oraz 1310 cm^{-1} (drżania CH_2). Widma komórek linii MUTZ5 cechuje niższa intensywność pasma przy 1340 cm^{-1} oraz wartość stosunku intensywności integralnych pasm I_{1340}/I_{1310} . Widma średnie komórek linii MUTZ5 manifestują się również niższą intensywnością pasm związanych z drżaniami kwasów nukleinowych (788 cm^{-1}) czy łańcuchów bocznych DNA PO_2^{2-} (1096 cm^{-1}). Co więcej, pasmo przy 1450 cm^{-1} jest mniej

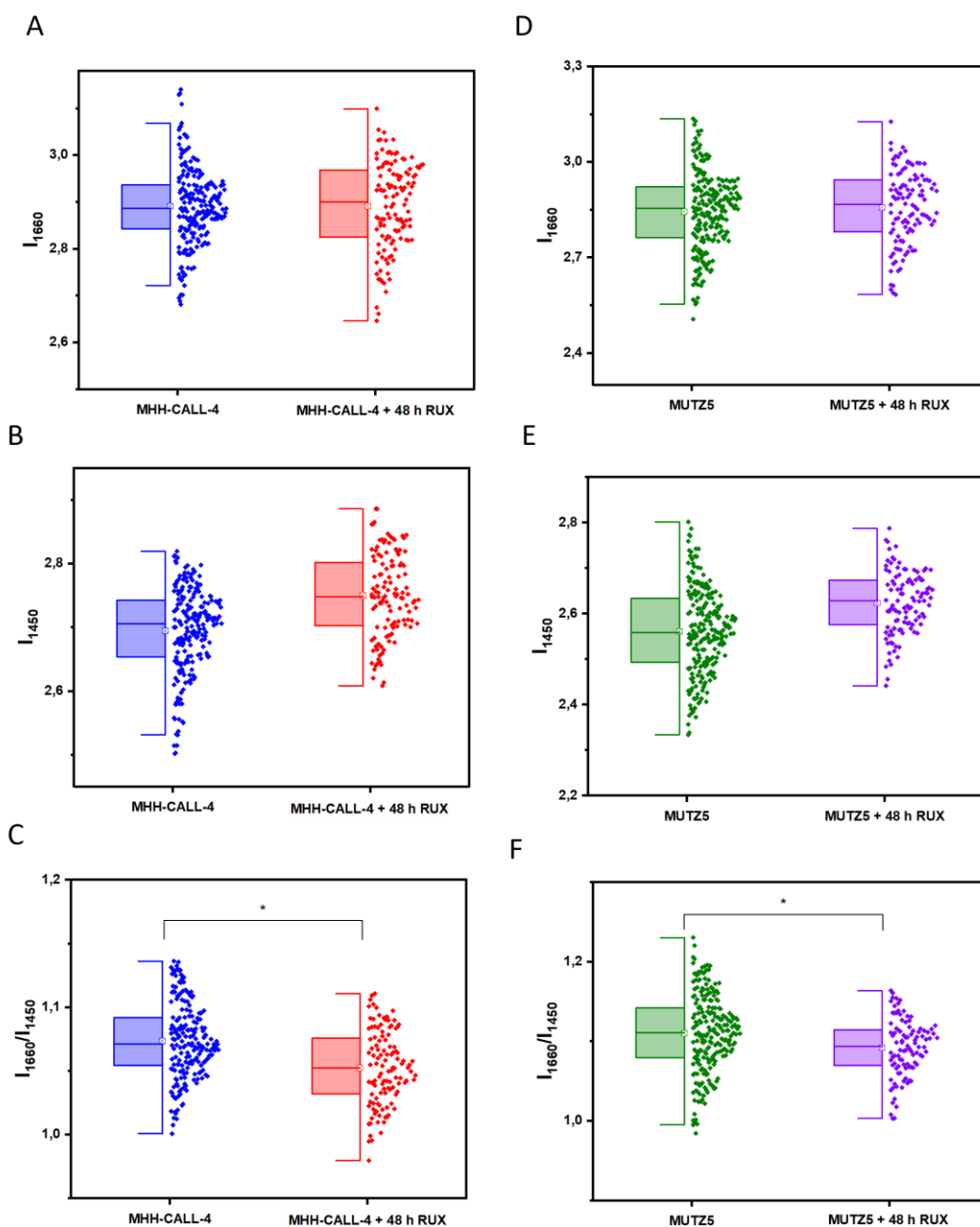
intensywne na widmach komórek MUTZ5 względem pasma 1660 cm^{-1} (amid I oraz drgania C=C w tłuszczach nienasyconych). Pomimo różnic w profilach spektroskopowych badanych modeli komórkowych, zauważalne są spójne zmiany wynikające z interakcji RUX z komórkami obserwowane względem widm komórek z grupy kontrolnej. Dla obu modeli komórkowych zauważono, że RUX wpływa na wzrost intensywności pasm 1376 , 1340 oraz 788 cm^{-1} związanych z drganiami oscylacyjnymi DNA. [10]

W kolejnym kroku analizy podjęto się szczegółowej charakterystyki spektralnej interakcji RUX w modelu BCP-ALL z mutacjami punktowym JAK2, obliczając dla każdego widma średniego pojedynczej inkubowanej z RUX przez 48 h wartości intensywności integralnej pasm 1660 , 1449 , 1003 i 790 cm^{-1} . Dodatkowo obliczono także stosunki intensywności pasm I_{788}/I_{1003} (DNA/feniloalanina) oraz I_{1660}/I_{1450} (amid I; $\nu_{C=C} / \delta_{CH_2}$ białek i lipidów). Otrzymane wyniki względem widm grupy kontrolnej wraz z analizą istotności statystycznej obserwowanych różnic przedstawiono na **Rysunek 27** i **Rysunek 28**. Istotny statystycznie wzrost stosunku intensywności integralnych I_{788}/I_{1003} zaobserwowano tylko dla widm

w modelu MUTZ5 (**Rysunek 27 F**). Natomiast widma komórek obu badanych modeli *in vitro* poddawane 48 h działaniu RUX prezentują istotny statystycznie (na poziomie ufności $p=0,05$) spadek stosunku I_{1660}/I_{1450} , wynikający głównie ze zmiany intensywności pasma przy 1450 cm^{-1} (**Rysunek 28 B-F**). Biorąc pod uwagę fakt, że zarówno profil widm średnich komórek, jak i położenie pasma drgań deformacyjnych CH_2 (δ_{CH_2}), wskazują na białkowy charakter obserwowanych zmian (brak na widmach wyraźnych zmian w obrębie pasm 2855 i 2880 cm^{-1}). Zatem można przyjąć, że różnica w intensywności pasma 1449 cm^{-1} na widmach komórek kontrolnych i inkubowanych z RUX wynika głównie ze zmian na poziomie składu białek. Drgania deformacyjne CH_2 białek obserwowane są zwykle przy wyższych wartościach liczb falowych, z kolei drgania deformacyjne CH_2 lipidów manifestują się pasmem przy ok. 1440 cm^{-1} .



Rysunek 27 Wartości intensywności integralnych pasm (A, D) 1003, (B, E) 788 oraz stosunków intensywności integralnych (C, F) I_{788}/I_{1003} obliczonych dla widm linii komórkowej MHH-CALL-4 i MUTZ5 stanowiących grupę kontrolną oraz komórek traktowanych $10 \mu\text{M}$ ruxolitynibu przez 48 h. Wykres pudełkowy reprezentuje zakres 1 i 3 kwartyła. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartyłowego (ang. Inter Quartile Range, IQR).

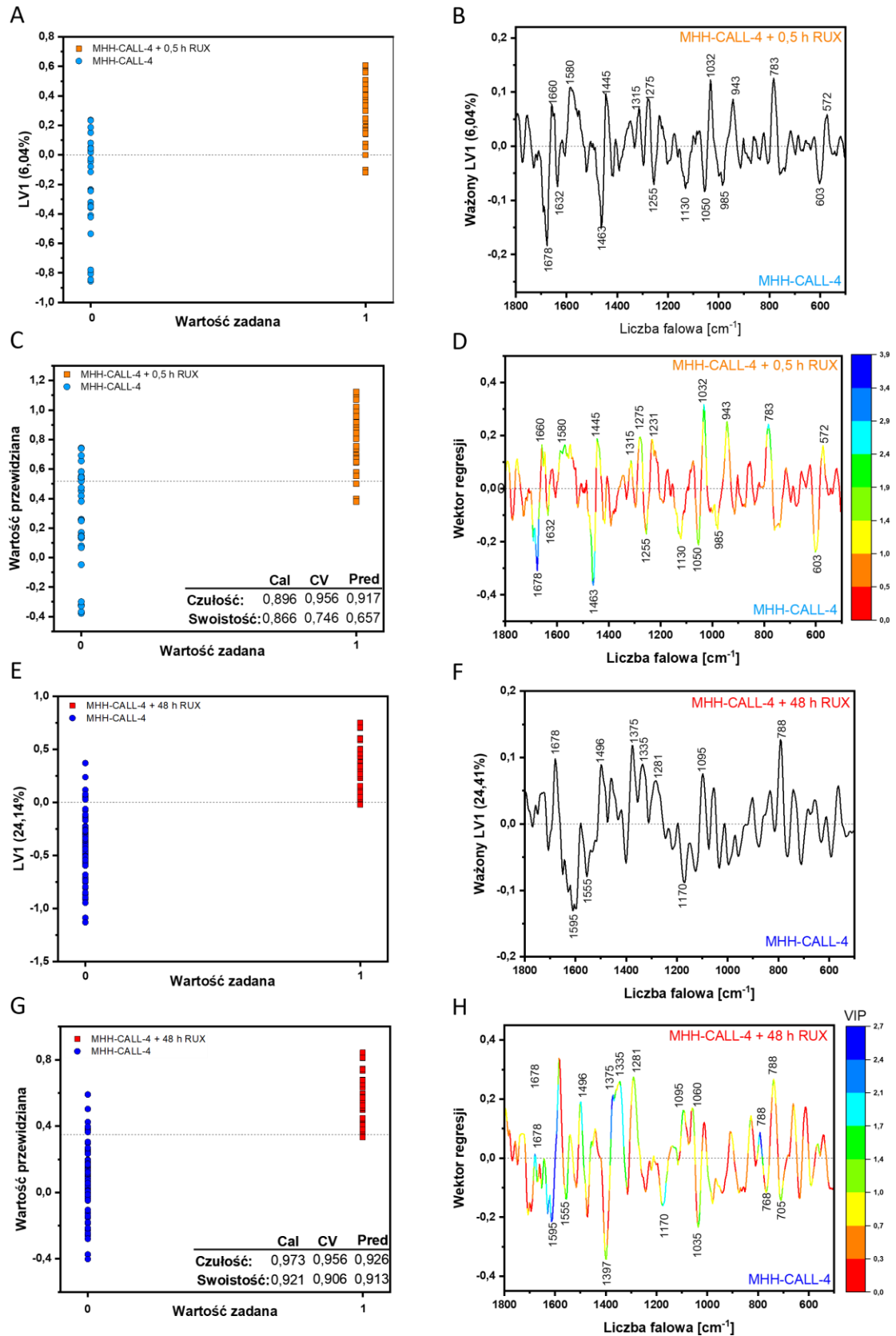


Rysunek 28 Wartości intensywności integralnych pasm (A, D) 1660, (B, E) 1450 cm^{-1} oraz stosunków intensywności integralnych (C, F) I_{1660}/I_{1450} cm^{-1} obliczonych dla widm linii komórkowej MHH-CALL-4 i MUTZ5 stanowiących grupę kontrolną oraz komórek traktowanych 10 μM ruksolitynibu przez 48 h. Wykres pudełkowy reprezentuje zakres 1 i 3 kwartyli. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartylowego (ang. Inter Quartile Range, IQR).

Analogiczne analizy przeprowadzono dla widm komórek grupy kontrolnej i poddawanej działaniu RUX przez 0,5 h, jednak otrzymane wyniki nie wykazały różnic istotnych statystycznie w zakresie porównywanych grup.

Wyznaczenie markerów spektroskopowych oraz przygotowanie modeli predykcyjnych dla widm komórek BCP-ALL oraz tych poddanych skutecznemu działaniu terapii celowanych z użyciem RUX jest istotne w kontekście monitorowania postępu chemioterapii. W celu opracowania modeli identyfikujących odpowiedź komórek BCP-ALL z mutacją punktową JAK na działanie RUX, wykorzystano dyskryminację ortogonalną metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów O-PLS-DA, w której pierwszy czynnik LV1 służy jako predyktor, natomiast kolejne opisują zmienność ortogonalną względem LV1. Parametry predykcji nie odbiegają od tych otrzymanych w PLS-DA, jednak zawarcie predykcji w pierwszym LV ułatwia interpretację różnic molekularnych pomiędzy klasami, jak i ich zmienności [125,126].

Klasyfikacja widm komórek MHH-CALL-4 poddanych krótkotrwałemu działaniu 10 μ M RUX (0,5 h) była możliwa na podstawie modelu O-PLS-DA opartego na 3 zmiennych ukrytych LV reprezentujących łącznie 62% zmienności danych spektroskopowych i 61% zmienności w bloku Y odpowiadającym wartościom przypisanym klasom (MHH-CALL-4 oraz MHH-CALL-4 + 0,5 h RUX). Wykres wartości LV1 oraz ładunku ważonego LV1 (**Rysunek 29 A, B**) będącego głównym czynnikiem odpowiedzialnym za predykcje reprezentuje około 6% zmienności i umożliwia wskazanie zmian biochemicznych zachodzących w komórkach już po 0,5 h inkubacji z RUX. Wykres wartości LV1 jako charakterystyczne dla grupy komórek traktowanych pasma związane z drganiami struktur wchodzących w skład jądra, takich jak kwasy nukleinowe (1580, 783 cm^{-1}), białka w konformacji α -helisy oraz aminokwasy (1660, 1315, 1032, 1275 cm^{-1}), natomiast dla komórek BCP-ALL jako charakterystyczne wykres LV1 wskazuje pasma białek w konformacji β -kartki oraz struktur nieuporządkowanych (1678, 1463, 1330, 1255, 1130, 1050 cm^{-1}). Przypisania dla odpowiednio wymienianych powyżej pasm wraz z odniesieniem literaturowym zostały przedstawione w **Tabela 4** w sekcji **IV.1.2 Części eksperymentalnej** pracy. Wykres wektora regresji (**Rysunek 29D**) będącego sumą ważonych LV przedstawiono w kodowaniu kolorystycznym uwzględniającym zmienne VIP. Pasma ramanowskie o wartości VIP większej od 1 zostały wskazane jako istotne dla dyskryminacji



Rysunek 29 Modele O-PLS-DA dla 3 zmiennych ukrytych LV: (A-D) klasyfikujący komórki MHH-CALL-4 traktowane przez 0,5 h 10 μM ruksolitynybu (MHH-CALL-4 + 0,5 h RUX) oraz kontrolne (MHH-CALL-4)

oraz (E-H) klasyfikujący komórki MHH-CALL-4 traktowane przez 48 h 10 μ M ruksolitynibu (MHH-CALL-4 + 48 h RUX) oraz kontrolne (MHH-CALL-4). (A, E) Wykres przebiegu wartości zmiennej ukrytej LV1 dla badanych klas. (B, F) Wykres ładunków ważonego LV1. (C, G) Wynik predykcji, przerywaną linią zaznaczono wartość progu klasyfikacji. W tabeli podano parametry wydajności modelu dla etapu kalibracji (Cal), sprawdzianu krzyżowego (Val) i predykcji (Pred) (D, H) Wektor regresji z kodowaniem kolorystycznym zależnym od wartości VIP.

Analiza wartości VIP potwierdziła istotność wyżej omawianych pasm, jednak jako najbardziej istotne zmienne w predykcji komórek traktowanych lekiem wykres VIP wskazuje przede wszystkim pasma 1032, 943 i 783 cm^{-1} . Widma komórek BCP-ALL, które stanowią widma grupy kontrolnej MHH-CALL-4, mogą być identyfikowane głównie poprzez analizę intensywności pasm 1678 i 1463 cm^{-1} . Czułość modelu O-PLS-DA dla odpowiednio etapów kalibracji, sprawdzianu krzyżowego i predykcji wynosiła odpowiednio 0,896, 0,731, 0,919 (Cal, Val, Pred), z kolei otrzymane wartości swoistości wynosiły 0,866, 0,746 i 0,657 (**Rysunek 29 F**).

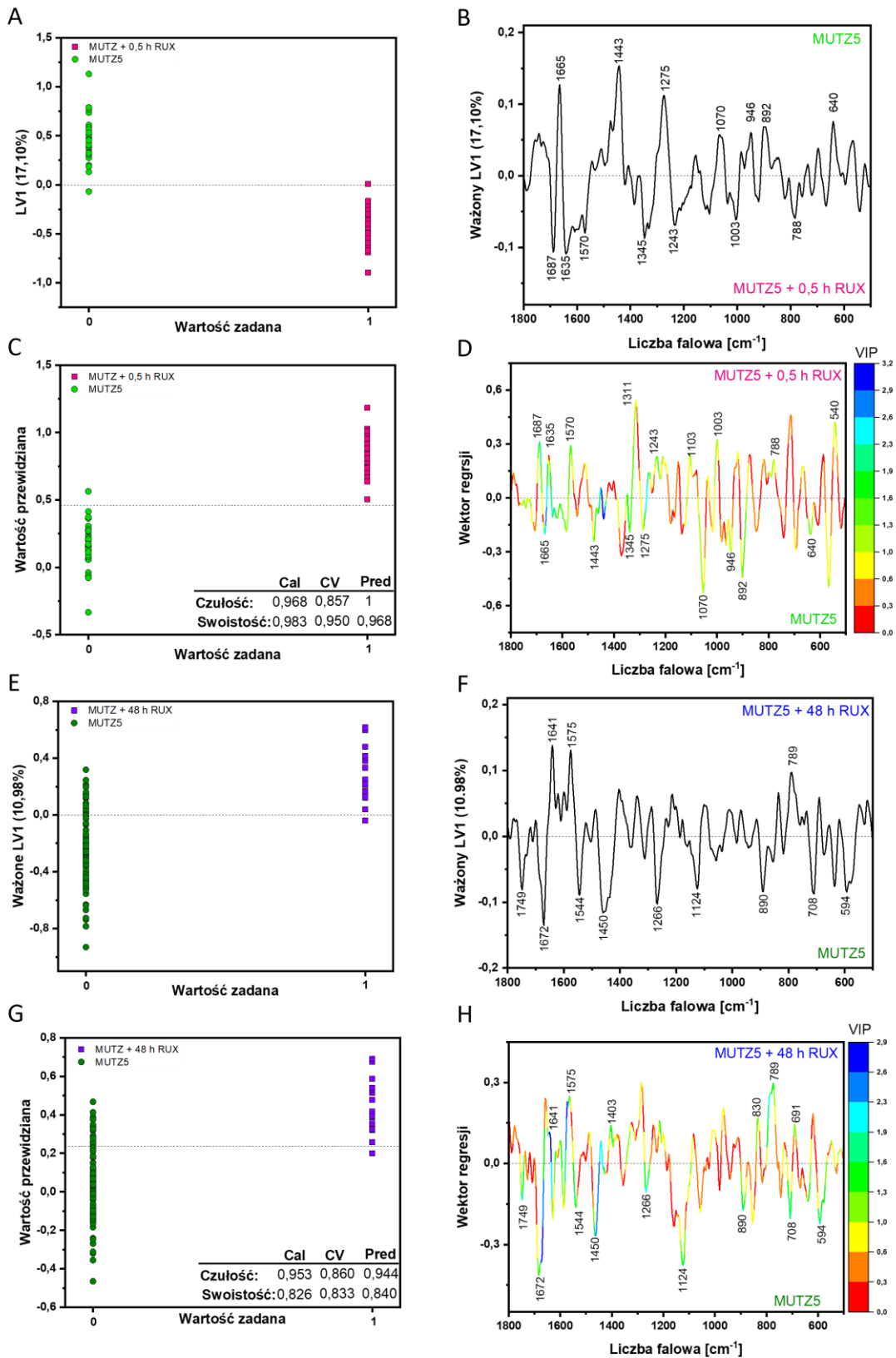
Ze względu na fakt, że interakcje leków z komórkami w modelach biologicznych podlegają różnej kinetyce oraz z powodu braku przesłanek o liniowości zmian zachodzących w komórkach z mutacją JAK2 wskutek krótko- i długotrwałego działania RUX nie podjęto się opracowywania modelu regresji zmian w zależności od czasu inkubacji (0,5 h i 48 h). Do oceny zmian molekularnych w komórkach MHH-CALL-4 poddanych 48 h działaniu RUX przygotowano dodatkowy model O-PLS-DA opartego na 3 zmiennych ukrytych (LV). Opracowany model predykcyjny dla widm komórek MHH-CALL-4 z grupy kontrolnej oraz inkubowanych z 10 μ M przez 48 h opisuje 64% zmienności danych oraz 61% zmienności w bloku Y odpowiadającym wartościom przypisanym klasom (MHH-CALL-4 oraz MHH-CALL-4 + 48 h RUX). Na podstawie wykresu ładunku ważonego LV1 (24,41%) (**Rysunek 29 F**) dla komórek poddanych 48 h działaniu 10 μ M RUX jako charakterystyczne określono pasma 1335 i 788 cm^{-1} które można przyporządkować drganiom kwasów nukleinowych oraz 1095 cm^{-1} drganiom rozciągającym O-P-O kwasów nukleinowych i fosfolipidów, a także pasma charakterystyczne białek i aminokwasów 1678, 1375, 1281 cm^{-1} . Z kolei dla widm grupy kontrolnej komórek MHH-CALL-4 jako znaczące wykres LV1 wskazał pasma przy ok. 1595, 1555 i 1170 cm^{-1} . Analiza otrzymanego wektora regresji (**Rysunek 29 H**) z uwzględnieniem kodowania kolorystycznego wartości VIP w grupie widm komórek BCP-ALL MHH-CALL-4 dodatkowo jako istotne wskazała pasma 1397, 1070, 768 i 705 cm^{-1} . Dla modelu predykcyjnego opartego na widmach komórek poddanych 48 h inkubacji odnotowano wyższe wartości czułości: 0,953, 0,860, 944 (Cal, Val, Pred)

niż dla modelu opracowanego dla krótszego (0,5 h) czasu inkubacji. Swoistość modelu wynosiła natomiast 0,826, 0,833, 0,840 (Cal, Val, Pred) (**Rysunek 29 G**).

Porównując wykresy ważonych LV1 dla modelu RUX 0,5 h i RUX 48 h. jako cechę wspólną widm komórek poddanych działaniu RUX można wskazać pasmo drgań kwasów nukleinowych przy ok. 788 cm^{-1} . W obu modelach nie zostały zaobserwowane zmiany w zakresie pasm bezpośrednio świadczących o obecności tyrozyny (Tyr) w formie ufosforylowanej (825 cm^{-1}) czy też nieufosforylowanej ($833, 851\text{ cm}^{-1}$) [127]. Interpretacja zmian wzmiankowanego w literaturze pasma 1585 cm^{-1} , jako diagnostycznego dla procesu fosforylacji, bez obserwacji na widmach zmian dla wymienionych wcześniej pasm Tyr może prowadzić do błędnych wniosków, gdyż w zakresie pasma $1580\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$, obserwowane są również drgania grup P-O obecnych w DNA, czy drgania hemoprotein [10]. Dodatkowo warto zwrócić uwagę również na fakt, że jedna cząsteczka białka JAK2 zawiera na poziomie struktury pierwszorzędowej tylko 2 reszty tyrozyny, które ulegają fosforylacji [92]. Niski odsetek tyrozyny względem pozostałych aminokwasów cząsteczki JAK2 czy innych kinaz ulegających fosforylacji może stanowić trudność w ramanowskiej detekcji sygnału. Spektroskopia ramanowska umożliwiła jednak detekcję zmian w zakresie białek, gdyż na wykresach LV1 jako znaczące dla widm komórek grup kontrolnych wskazywane były przeważnie pasma związane z drganiami struktur białkowych. Co więcej, na podstawie analizy widm komórek inkubowanych przez 30 min z RUX zidentyfikowano przewagę drugorzędowych struktur nieuporządkowanych oraz β -kartki

Analogicznie w oparciu o widma ramanowskie komórek modelu *in vitro* z mutacją JAK2 R638G (linia MUTZ5) zidentyfikowano spektroskopowe markery zmian molekularnych wywołanych działaniem $10\text{ }\mu\text{M}$ RUX po 0,5 h i 48 h. W przypadku krótszego czasu inkubacji z RUX opracowano model O-PLS-DA oparty na 4 LV. Model ten opisywał 85% zmienności danych spektroskopowych. Natomiast 77% zmienności w bloku Y jest opisane względem LV1 (17,10%). Interpretując wykres przebiegu LV1 oraz jego ładunku (**Rysunek 30 A, B**) możliwa jest charakterystyka spektroskopowa profilu widm komórek z grupy traktowanej lekiem (ujemne wartości wykresu przebiegu LV1), które dotyczą głównie pasm związanych z drganiami struktur kwasów nukleinowych i DNA ($1570, 1345, 788\text{ cm}^{-1}$), białek o drugorzędowej strukturze nieuporządkowanej oraz β -kartki ($1667, 1243\text{ cm}^{-1}$) oraz aminokwasów (fenyloalaniny 1003 cm^{-1} , czy tyrozyny i fosfotyrozyny 640 cm^{-1}). Natomiast maksima wartości LV1 ($1665, 1663, 1275, 945\text{ cm}^{-1}$) świadczą o znaczącym udziale

w profilu komórek BCP-ALL struktur białkowych o przewadze α -helisy. Dodatkowo po dodatniej stronie LV1 obserwowane jest pasmo 1070 cm^{-1} , odpowiadające drganiom C-C w łańcuchach kwasów tłuszczowych.



Rysunek 30 Modele O-PLS-DA dla 4 zmiennych ukrytych LV (A-D) klasyfikujący komórki MUTZ5 traktowane przez 0,5h 10 μ M ruksolitynibu (MUTZ5 + 0.5h RUX) oraz dla 3 zmiennych ukrytych LV klasyfikujący komórki MUTZ5 (MHH-CALL-4) oraz (E-H) klasyfikujący komórki MUTZ5 traktowane przez 48h 10 μ M ruksolitynibu

(MUTZ5 + 48h RUX) oraz kontrolne (MUTZ5). (A, E) Wykres przebiegu wartości zmiennej ukrytej LV1 dla badanych klas. (B, F) Wykres ładunków ważonego LV1. (C, G) Wynik predykcji, przerywaną linią zaznaczono wartość progu klasyfikacji. W tabeli podano parametry wydajności modelu dla etapu kalibracji (Cal), sprawdzianu krzyżowego (Val) i predykcji (Pred) (D, H) Wektor regresji z kodowaniem kolorystycznym zależnym od wartości VIP. Pasma ramanowskie o wartości VIP większej od 1 zostały wskazane jako istotne dla dyskryminacji.

Wykres wektora regresji (**Rysunek 30 D**) interpretowany wspólnie z wartościami VIP wskazuje większą ilość pasm istotnych w predykcji odpowiedzi komórek na 0,5 h działanie RUX: 1311, 1103, 540 cm^{-1} dla klasy traktowanej lekiem, związane z odpowiednio drganiami: tryptofanu, C-N i cysteiny [44]. Warto zaznaczyć, że na wektorze regresji spadł bezwzględny wkład pasm 788, 1243, mimo, że są obserwowane jako istotne na wykresie ładunków LV1, co może świadczyć o wysokiej wariancji wewnątrz klas [126]. W przypadku widm komórek kontrolnych linii MUTZ5 minima wektora regresji wskazują te same pasma co wykres LV1, jednak tak samo jak dla komórek inkubowanych z lekiem ich intensywność różni się względem LV1. Mimo to otrzymany model cechuje wysoka czułość (0,968, 0,957, 1,00) i swoistość (0,983, 0,950 0,968) dla odpowiednio etapu kalibracji, sprawdzianu krzyżowego i predykcji (**Rysunek 30 C**).

Model O-PLS-DA oparty na widmach komórek linii MUTZ5 poddanych dłuższej, 48 h, inkubacji z 10 μM RUX opisuje 80% zmienności danych spektroskopowych oraz około 40 % zmienności w przypisaniu klas. Ponownie wykres przebiegu wartości LV1 (10,98%) wraz z wykresem ładunków (**Rysunek 30 E, F**) dla widm komórek traktowanych RUX wskazuje na zmiany w zakresie pasm związanych kwasami nukleinowymi (1575 oraz 789 cm^{-1}). Natomiast wykres przebiegu wartości LV1 dla grupy widm komórek kontrolnych wskazuje jako istotne pasma drgań białek i aminokwasów: 1672, 1450, 1266, 1124, 594 cm^{-1} [44], jak również lipidów i estrów kwasów tłuszczowych: 1749, 1124, 890 cm^{-1} [43]. Powyższe profile spektralne potwierdzone zostały także poprzez wykres wektora regresji (**Rysunek 30 H**) kodowanego kolorystycznie względem wartości VIP. Parametry wydajności opracowanego modelu przedstawiają się następująco: czułość 0,953, 0,860, 0,944 i swoistość 0,826, 0,833 0,840 dla odpowiednio etapu kalibracji, sprawdzianu krzyżowego i predykcji (**Rysunek 30 G**).

Ponownie zestawiając wyniki modeli klasyfikacyjnych krótkiej i długotrwałej inkubacji komórek z mutacją punktową JAK2 z inhibitorem JAK2 jako pasma charakterystyczne dla odpowiedzi komórkowej na działanie leku wskazywane jest pasmo 789 cm^{-1} co pozwala wnioskować, że na widmach ramanowskich działanie RUX manifestuje się przede wszystkim

zmianami obejmującymi kwasy nukleinowe. Widma grupy kontrolnej komórek z mutacją JAK2 opisywane są głównie przez pasma związane z drganiami białek. 0,5 h inkubacja z RUX dodatkowo wskazuje na zmiany konformacji drugorzędowej białek i wzrost udziału struktur β -kardki i nieuporządkowanych, czego jednak nie obserwuje się po 48 h.

Wykorzystując metody uczenia maszynowego oraz klasyfikacji O-PLS-DA dla wybranych modeli *in vitro* BCP-ALL z mutacją punktową kinazy JAK2 I682F i R638G, reprezentowanymi odpowiednio przez linie komórkowe MHH-CALL-4 i MUTZ5, poddanych inkubacji z 10 μ M inhibitorem JAK2 zauważono cechy wspólne wynikające z oddziaływania leku. Przede wszystkim zidentyfikowano jako istotne dla klasyfikacji widm komórek poddanych działaniu RUX pasmo 788 cm^{-1} opisujące drgania oddychające pierścieni U, T, C w łańcuchach DNA i RNA. Inne metody takie jak analiza widm średnich oraz ocena intensywności integralnych pasm również wskazywała trend związany ze wzrostem intensywności tego pasma wśród widm komórek stymulowanych oraz stosunku I_{788}/I_{1007} jednak istotność statystyczna dotyczyła jedynie widm komórek MUTZ5 poddanych 48 h inkubacji z lekiem. Pozostałe pasma markerowe kwasów nukleinowych, takie jak 1376, 1345 czy 1580 cm^{-1} nie były spójnie obserwowane w obu badanych modelach. Może to wynikać z faktu, że w podanym zakresie spektralnym współwystępują również drgania innych biologicznie istotnych struktur molekularnych wynikających z różnic w profilu spektroskopowym obu linii (m.in. omawiana na początku paragrafu różnica w stosunku intensywności integralnych pas I_{1340}/I_{1310} obserwowana na widmach komórek kontrolnych linii MHH-CALL-4 i MUTZ5).

2.3. Wnioski

Przedstawione w niniejszym paragrafie wyniki badań oparte zostały na danych spektroskopowych uzyskanych dla dwóch niezależnych modeli farmakologicznych BCP-ALL mutacją punktową JAK2 I682F (MHH-CALL-4) i R638G (MUTZ5). Zastosowanie dwóch modeli komórkowych umożliwiło spektroskopową charakterystyką interakcji komórka-RUX oraz ocenę skuteczności działania RUX, inhibitora kinazy tyrozynowej JAK2, w terapii celowanej białaczek. Otrzymane wyniki potwierdziły postawioną hipotezę badawczą, że spektroskopia ramanowska jest techniką analityczną umożliwiającą badanie odpowiedzi komórkowej na stymulację farmakologiczną poprzez dostarczenie informacji o subtelnych zmianach na poziomie składu biochemicznego komórek. Analiza widm średnich

oraz intensywności integralnych pasm charakterystycznych wskazały, że najsilniejsze w profilu spektralnym są zmiany dotyczące pasm związanych z drganiami łańcucha DNA oraz wartości I_{790}/I_{1003} (**Rysunek 26 i Rysunek 27**). Ze względu na stosowane w badaniach stężenie RUX w celu dogłębnej analizy różnic na widmach ramanowskich komórek poddanych działaniu RUX, świadczących o zmianach molekularnych i metabolicznych w komórkach w odpowiedzi na stymulację farmakologiczną, konieczne było wykorzystanie algorytmów uczenia maszynowego takich jak O-PLS-DA. Podejście to umożliwiło wskazanie pasm charakterystycznych w grupie widm komórek kontrolnych i traktowanych lekiem, w zależności od czasu inkubacji, w obrębie których dochodzi do zmian w odpowiedzi na RUX.

Wykazano m.in., że interakcja 10 μM RUX w obu modelach *in vitro*, które już na poziomie charakterystyki samych linii komórkowych różnią się profilem spektroskopowym i składem biochemicznym (**Rysunek 26**), niezależnie od czasu inkubacji (0,5 h lub 48 h) jest identyfikowana zmiana dla pasma drgań kwasów nukleinowych przy 788 cm^{-1} , co jest zgodnie z mechanizmem oddziaływania leku. RUX wpływa na aktywność kinazy JAK2, która następnie reguluje czynniki transkrypcyjne STAT5, a spadek pSTAT5 objawia się zahamowaniem proliferacji [128]. Wyższa intensywność pasma 788 cm^{-1} może być powodowana zmniejszeniem rozmiaru jądra na skutek kondensacji chromatyny w jądrze komórki, która nie ulega podziałowi i nie wymaga transkrypcji oraz związanej z nią rozluźnienia chromatyny [128]. Dodatkowo, zauważono, że w przypadku obu badanych linii komórkowych 0,5 h inkubacji z lekiem prowadzi do manifestujących się na wykresach współczynników regresji zmian w zakresie sygnatur spektroskopowych białek. Obserwowane różnice wskazują na zmiany w obrębie struktury drugorzędowej białek z przewagą struktur nieuporządkowanych i z β -karką ($1678, 1243\text{ cm}^{-1}$) dla komórek poddanych działaniu RUX. Jednocześnie dla widm tych komórek nie zaobserwowano zmian związanych z obecnością tyrozyny oraz jej fosforylowanej formy. Otrzymane modele O-PLS-DA wykazują wysoką czułość i swoistość dla każdego etapu budowania modelu predykcyjnego.

Otrzymane wyniki badań są rozwojowe i ze względu na niewielką liczbę niezależnych eksperymentów biologicznych otrzymanych dla każdej linii komórkowej ($n=2$) niezbędne jest dalsze rozbudowanie badań i zwiększenie bazy widm o kolejne niezależnie przygotowane próbki, co pozwoli nie tylko na lepszą weryfikację skuteczności opracowanego modelu predykcyjnego, jak również zastosowanie innych metod nauczania maszynowego, np. wykorzystującego sieci neuronowe.

3. Charakterystyka spektroskopowa modelu *in vitro* indukowanego różnicowania modelu promielocytów z wykorzystaniem znaczników ramanowskich

3.1. Opis stosowanych metod

Przygotowanie materiału biologicznego

Linie komórkową HL-60 (ECACC 98070106) hodowano w pożywce RPMI 1640 (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo) uzupełnionym 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo) i glutaMAX (Gibco, Inchinnan, Zjednoczone Królestwo). Komórki podczas hodowli utrzymywano w temperaturze 37°C, 5% CO₂ w inkubatorze do hodowli komórek, z gęstością zawiesiny w zakresie (0,3-1,0) x 10⁶ komórek/ml. Kwas *trans*-retinowy ATRA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) był dodawany do pożywki na 48 i 72 h w stężeniu 1 μM, łączna zawartość DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) użytego do rozpuszczania ATRA wynosiła 0,001%. Hodowlę jak i stymulację komórek prowadziłam osobiście korzystając z wyposażenia laboratorium biologicznego Zespołu Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej Wydziału Chemii UJ kierowanego przez dr hab. Małgorzatę Brindell prof. UJ.

Ocena różnicowania metodami referencyjnymi- cytometria przepływowa

Ocenę różnicowania komórek, a tym samym walidację wyników otrzymanych metodą spektroskopii ramanowskiej, wykonano w oparciu o analizę ekspresji białka powierzchniowego CD11b z użyciem PE-CyTM7 Mouse Anti-Human CD11b (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) metodą cytometrii przepływowej. W celu weryfikacji wyników przeprowadzono również ocenę w oparciu o kontrolę izotypową mysimi przeciwciałami PE-CyTM7 Mouse IgG1 κ BD (Biosciences, San Jose, CA, USA).

Z zawiesiny komórek uprzednio poddanych działaniu ATRA pobrano ok. 100 tysięcy komórek, które zwirowano i przepłukano ciepłym PBS z 2% FBS. Osad zawieszono w 100 μl PBS z 2% FBS i dodano 5 μl PE-CyTM7 Mouse Anti-Human CD11b o stężeniu 100 μg/ml lub 10 μl PE-CyTM7 Mouse IgG1 κ o stężeniu 50 μg/ml i inkubowano 20 min w temperaturze pokojowej. Ponownie odpłukano nadsącz, a komórki zawieszano w 200 μl PBS z 2% FBS. Próbkę umieszczono na lodzie i analizowano jak najszybciej cytometrem przepływowym BD FACSVersé (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Dodatkowo dla komórek poddanych działaniu ATRA oceniano cykl komórkowy w czasie indukowanego procesu różnicowania (12, 24, 48, 72 h) z użyciem buforu zawierającego jodek propidyny (PI) wraz z rybonukleazami (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). W tym celu po określonym czasie komórki utrwalono w zimnym 80% etanolu (około 500 000 komórek) i przechowywano w -20°C aż do dnia oznaczenia. Przygotowanie komórek do oznaczenia polegało na trzykrotnym przemywaniu komórek 500 μl PBS (wirowanie w warunkach 300 G, 5 min, 4°C). Następnie inkubowano w ciemności komórki wraz z 300 μl buforu PI/RNase (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) w temperaturze pokojowej przez 30 min. Intensywność fluorescencji oceniano cytometrem przepływowym. Procent komórek w fazie cyklu komórkowego obliczono z użyciem programu FCS Epress7 software (De Novo Software, Pasadena, USA)

Zmianę potencjału błonowego mitochondrium oceniono z użyciem estru etylowego tetrametylorodaminy TMRE (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA). W tym celu pobrano 200 tysięcy komórek, które przepłukano i zawieszono w świeżo przygotowanym buforze HEPES. Kontrolę pozytywną traktowano 30 μM FCCP (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA) przez 10 min. Wszystkie próbki inkubowano przez 30 min w ciemności w temperaturze pokojowej z 25 nM roztworem TMRE w HEPES. Po tym czasie komórki zwirowano i zawieszono w 25 nM roztworze TMRE, a fiołki umieszczono na lodzie i analizowano cytometrem przepływowym.

Populację komórek apoptotycznych i nekrotycznych oceniano na podstawie odpowiednio ekspresji aneksyny V i wnikażącego do nekrotycznych komórek jodku propidyny (PI). W tym celu pobrano 500 tysięcy komórek i zwirowano w celu przemycia zimnym PBS oraz zawieszenia komórek w 100 μL buforu wiążącego do oznaczenia ekspresji aneksyny V (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I) oraz w PBS do oznaczenia PI (oba zestawy do oznaczeń zakupione w BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Dodano 5 μl odpowiedniego odczynnika i inkubowano komórki przez 15 min w ciemności w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodano odpowiednio 300 μl buforu wiążącego lub PBS i analizowano w ciągu 1 h. Jako kontrolę pozytywną nekrozy wykorzystano komórki inkubowane z etanolem, natomiast wczesnej apoptozy z kamptotecyną (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Powyższe procedury przeprowadzono na Wydziale Chemii UJ we współpracy z dr Anną Nowakowską z Zespołu Obrazowania Ramanowskiego Wydziału Chemii UJ oraz dr Justyną Jakubowską z Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu

Medycznego w Łodzi. Dodatkowo za użyczenie i obsługę cytometru odpowiadała dr Olga Mazuryk z Zespołu Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej Wydziału Chemii UJ.

Ocena różnicowania metodami referencyjnymi- obrazowanie fluorescencyjne

Komórki różnicowane w kierunku neutrofilii charakteryzują się m.in. zmianą w kształcie jądra komórkowego. Aby uwidocznić morfologię jądra, badane komórki wybarwiono za pomocą Hoechst33342 (Invitrogen, Waltham, MA, USA), podczas gdy dystrybucję mitochondriów śledzono za pomocą MitoTracker™Orange CM-H2TMRos (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Dodatkowo, do oceny wpływu MitoBADY na przeżywalność komórek wykorzystano barwienie PI i aneksyną V.

Do wzbudzenia fluorescencji użyto źródła światła U-LGPS o wysokiej jasności z zestawem filtrów wzbudzających dostosowanych do wybranych barwników: Hoechst 33342 (361 nm-497 nm) i MitoTracker™Orange CM-H2TMRos (554 nm-576 nm) wszystkie firmy Thermo Scientific oraz i PI (535 nm-615 nm) i FITC-Annexin V (496 nm-576 nm) firmy BD Biosciences.

Sygnal fluorescencji rejestrowano za pomocą optycznego mikroskopu odwróconego (Olympus CKX53, Olympus DP74, Tokio, Japonia) wyposażonego w kontrast fazowy (Olympus LCach N Phase Contrast), obiektywy 40x (NA=0,55) i 20x (NA=0,4) (Olympus, Tokio, Japonia) oraz kolorową kamerę DP74 o wysokiej rozdzielczości (Olympus DP74, Tokio, Japonia). Rejestrację i analizę obrazu przeprowadzono w oprogramowaniu CellSens (Olympus, Tokio, Japonia).

Przygotowanie komórek do obrazowania ramanowskiego

Wysterylizowane szkiełka CaF₂ pokryto roztworem poli-L-Lizyny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) o stężeniu 0,001% i inkubowano w 37°C przez 30 min. Po tym czasie usunięto roztwór i przepłukano szkiełka dwukrotnie wodą destylowaną.

1-0,5 ml zawiesiny komórek HL-60 pobierano wirowano 150 G przez 5 min, usuwano nadsącz i dodawano świeżą porcję ciepłej pożywki hodowlanej. Następnie tak przygotowaną zawiesinę komórek nakrapiano na szkiełko CaF₂ pokryte poli-L-lizyną (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) umieszczone w szalce Petriego i przechowywano w inkubatorze przez 30 min. Po tym czasie szkiełko delikatnie przemywano roztworem PBS (bez Ca²⁺ i Mg²⁺) w celu usunięcia pożywki oraz nieprzyklejonych komórek. Następnie szkiełka pokrywano

roztworem 100 nM MitoBADY (zsyntezowane w grupie badawczej prof. Jacka Młynarskiego, Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska) w HBSS (z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+}) zawierającym 0,001% DMSO lub analogicznym roztworem bez MitoBADY i inkubowano przez 15 lub 30 min w inkubatorze. Po tym czasie usuwano roztwór, a komórki przyklejone do podłoża przepłukiwano jednokrotnie ciepłym HBSS, a następnie dodawano świeży HBSS i szalkę umieszczano na stoliku piezoelektrycznym spektrometru ramanowskiego.

Pomiary ramanowskie wykonywano z użyciem konfokalnego mikroskopu Witec Alpha 300 z wyposażeniem opisanym w **IV.1.1** oraz z użyciem obiektywu zanurzeniowego 63x Zeiss W Plan-Apochromat (Oberkochen, Niemcy). Gęstość próbkowania wynosiła 0,5 μm natomiast czas zbierania pojedynczego widma 0,05 s. Moc lasera mierzona przed obiektywem wynosiła około 30 mW. Każdą próbkę badano między 40 min-1 h.

Przygotowanie danych hiperspektralnych do analiz chemometrycznych przeprowadzono w programie Project FIVE 5.3 Plus, wykorzystując m.in. funkcję usuwania promieniowania kosmicznego oraz gładzenia widm algorytmem Savitzky-Golay (wielomian 3 rzędu, szerokość okna 7) do korekty linii podstawy wykorzystano wielomian 3 rzędu. Linie podstawy usuwano w dwóch krokach: w zakresie daktyloskopowym i drgań CH-rozciągających z użyciem wielomianu 3 rzędu oraz w tzw. spektralnym zakresie cichym (2000-2700 cm^{-1}) metodą korekty linii podstawy z dopasowaniem okręgu. Obrazy hiperspektralne obejmujące wiele komórek pocięto na obrazy z pojedynczymi komórkami oraz wyeksportowano.

Widma średnie pojedynczych komórek otrzymano stosując algorytm przygotowany w języku Python, który na podstawie współczynnika Pearsona (0,7) klasyfikuje pojedyncze widma komórki z obrazu hiperspektralnego porównując je z widmem standardu, a następnie uśrednia. Program został przygotowany przez dr Annę M. Nowakowską.

Otrzymane widma średnie pojedynczych komórek obcięto w zakresie 3030-500 cm^{-1} oraz dodatkowo usunięto linię podstawy metodą Rubberband z 64 punktami wsparcia i przeprowadzono normalizację wektorową widm. Obliczono pola powierzchni pod pasmami 2850, 2220, 753 cm^{-1} odpowiednio w zakresie 2861-2822, 2238-2205, 772-742 cm^{-1} z punktem wsparcia 2635 cm^{-1} dla 2850 cm^{-1} oraz 1800 cm^{-1} dla 2220 i 753 cm^{-1} .

Prezentację wartości intensywności integralnych pasm oraz analizę istotności statystycznych obserwowanych różnic opracowano w oprogramowaniu Origin 2022 za pomocą wykresu pudełkowego z medianą oraz pierwszym i trzecim kwartyłem wraz z zaznaczonymi 1,5 zakresem dla wartości odstających.

Przygotowanie próbek do obrazowania SRS

Zawiesinę komórek HL-60 pobrano i zwirowano w celu usunięcia pożywki oraz przemyto ciepłym HBSS. Komórki zawieszono w ciepłym HBSS i nakropiono na plastikową szalkę Petriego ze szklanym dnem (ang. *Glass botom dish*) i umieszczono ją na stoliku mikroskopowym spektrometru SRS. Pomiary SRS wykonano z pomocą dr Krzysztofa Brzozowskiego, natomiast za przygotowanie próbki i analizę danych byłam odpowiedzialna osobiście.

Układ SRS posiada laser oparty na optycznym oscylatorze parametrycznym (OPO), który wytwarza wiązkę Stokes'a o długości 1029 nm i oraz wiązkę pompującą przestrajalną w zakresie 750-950 nm. Wiązka Stokes'a ma moc około 450 mW, a wiązka pompująca około 100 mW. Obie wiązki wytwarzają impulsy o długości 2 ps powtarzanych z częstotliwością repetycji 20 MHz. Wiązkę Stokesa jest modulowana za pomocą modulatora akustooptycznego (AOM) z częstotliwością 4 MHz. Obie wiązki są kolimowane i powiększane, a następnie nakładane przestrzennie za pomocą lustra dichroicznego. Pokrycie czasowe zostało osiągnięte dzięki optycznej linii opóźniającej (ODL) w drodze wiązki pompowej. Do przestrzennego skanowania próbek wykorzystujemy mikroskop odwrócony Nikon Ti2 oraz 2-osiowy skaner piezo-lustrzanym firmy WITec umieszczony na wejściu do mikroskopu. Do oświetlenia próbek użyto obiektywu powietrznego UPLXAPO40X NA 0.95 40× Olympus, natomiast obiektyw zanurzeniowy MRD07620 50× NA 1.0 Nikon oraz fotodiody Thorlabs SM1PD1 zbierały światło po przejściu przez próbkę. Dwa filtry o wysokiej gęstości optycznej (OD) (Semrock) były używane do eliminacji wiązki Stokesa przed wejściem światła do fotodiody. Za fotodiody wzmacniacz lock-in Stanford Research Systems SR865A demoduluje sygnał SRL, przesyłając go do systemu WITec, który jest zsynchronizowany ze skanerem piezozwierciadlanym, co pozwala na zapisywanie obrazu SRS.

Analiza obrazów hiperspektralnych oraz SRS

Obrazy hiperspektralne pojedynczych komórek HL-60 łączono w jeden większy obraz ręcznie zaznaczając i usuwając jak największą powierzchnię fragmentów obrazów nie zawierających

komórek. Widma w zakresie 3030-500 cm^{-1} normalizowano z użyciem MSC z widmem średnim całej pojedynczej komórki jako referencją. Analizę MCR przeprowadzono wykorzystując ograniczenia kontrastu „*contribution*”[129]. Do analizy PCA dodatkowo zastosowano centrowanie względem średniej.

Obrazy SRS dla poszczególnych wartości przesunięcia ramanowskiego eksportowano do plików w formacie Matlab (MathWorks, MA, USA) i przetwarzano w programie PLS Toolbox 9.0 (Eigenvector Research, USA.). Macierze dwuwymiarowe dla pojedynczych wartości przesunięć ramanowskich łączono w celu otrzymania trójwymiarowej macierzy zawierającej informacje o położeniu piksela oraz odpowiadających mu wartościach intensywności dla 2970, 2960, 2930 i 2850 cm^{-1} . Na podstawie obrazów dystrybucji intensywności do dalszej analizy włączono tylko punkty o wartościach niezerowych usuwając w ten sposób wpływ tła. Przed przystąpieniem do analizy chemometrycznej wykonano normalizację MSC.

3.2. Wyniki i dyskusja

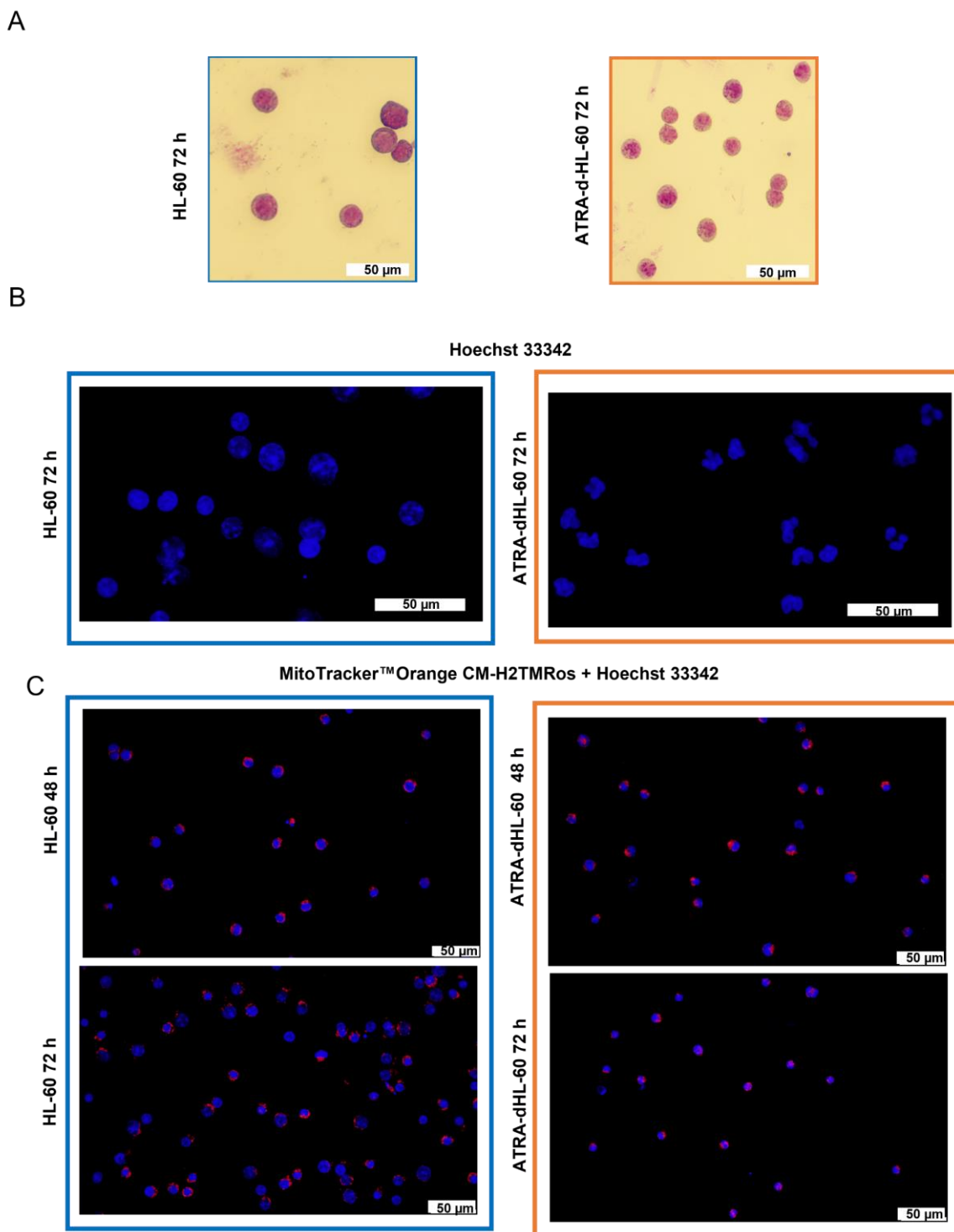
Do tej pory, w literaturze spektroskopowej dotyczącej podjętego w niniejszej dysertacji tematu charakterystyki modelu indukowanego różnicowania HL-60, dostępna była jedynie praca Y. Zhao i współpracowników [108]. Widma ramanowskie otrzymane w wyniku rozpraszania promieniowania laserowego o długości fali 532 nm komórek HL-60 poddanych działaniu 1,3% DMSO wskazywały na początkowy spadek a kolejno wzrost intensywności pasm 1449, 1338, 1580 cm^{-1} przypisanych przez autorów jako markery kwasów nukleinowych w czasie 0-6 dni. Mechanizm różnicowania komórek HL-60 DMSO i kwasem retinowym różnią się między sobą, co może przełożyć się na odmienne zmiany biochemiczne zachodzące w czasie tego procesu.

W celu otrzymania reprezentatywnego modelu indukowanego różnicowania komórek HL-60 za pomocą ATRA przeprowadzono optymalizację czasu wymaganego do osiągnięcia populacji komórek zawierającej wysoki odsetek komórek o fenotypie neutrofilii (ATRA-dHL-60). Jako metodę badawczą pozwalającą na weryfikację i optymalizację warunków różnicowania wykorzystano oznaczenie markera powierzchniowego CD11b oraz detekcję jego ekspresji z użyciem cytometrii przepływowej.

Tabela 5 Odsetek komórek o podwyższonej ekspresji markera CD11b obliczony na podstawie średniej geometrycznej. Niepewność podano jako błąd standardowy (SE), liczba powtórzeń biologicznych n=3.

Czas/h	HL-60 [%]	HL-60+1 μM ATRA [%]
48	80,6 \pm 1,3	15,0 \pm 1,1
72	87,1 \pm 1,5	9,0 \pm 0,9

Punkt czasowy 24 h nie był uwzględniany w dalszych badaniach, gdyż tylko ok. 56% badanych komórek wskazywało na podwyższoną ekspresję CD11b (dane nie pokazane). Dodatkowo, wizualną ocenę morfologii komórek po stymulacji ATRA przeprowadzono na podstawie barwienia May-Grunwald-Giemsa (**Rysunek 31 A**), a zmianę kształtu jąder potwierdzono obrazowaniem fluorescencyjnym z użyciem barwnika Hoechst (**Rysunek 31 B**). W każdym badanym punkcie czasowym przeżywalność komórek nie spadała poniżej 80%.



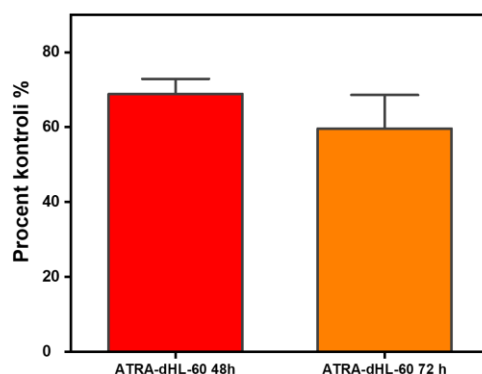
Rysunek 31 (A) Barwienie MGG komórek kontrolnych i ATRA-dHL-60 po 72 h inkubacji. (B) Barwienie fluorescencyjne jądra Hoechst HL-60 i ATRA-dHL-60 po 72 h inkubacji (C) Barwienie fluorescencyjne jądra Hoechst 33342 i mitochondriów MitoTracker™Orange CM-H2TMRos w badanych komórkach po 48 i 72 h inkubacji.

W celu pogłębienia oceny działania ATRA na komórki HL-60 podjęto również oceny wpływu ATRA na cykl komórkowy z wykorzystaniem jodku propidyny (PI) interkalującego w struktury jądrowe. Na podstawie sygnału fluorescencji PI szacowano odsetek komórek w punktach kontrolnych fazy spoczynkowej i interfazy G₀/G₁, interfazy G₂ oraz fazy mitozy, a także fazy, w czasie której dochodzi do podwojenia ilości materiału genetycznego S. Traktowanie komórek ATRA po 48 i 72 h powodowało zatrzymanie cyklu w fazie spoczynkowej (**Tabela 6**), co jest charakterystyczne dla komórek zróżnicowanych do swojej finalnej formy [100].

Tabela 6 Odsetek komórek HL-60 oraz traktowanych ATRA w punktach kontrolnych.

Czas/h	HL-60 [%]			HL-60 + 1 μM ATRA [%]		
	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
12	42,5	8,0	49,5	40,0	10,0	50,0
24	48,3	6,9	44,8	42,3	7,5	50,2
48	45,2	7,4	47,4	80,0	4,1	15,9
72	40,1	3,5	55,8	92,0	5,0	3,0

Ocenę zmiany potencjału błony mitochondrialnej w czasie indukowanego różnicowania przeprowadzono z wykorzystaniem TMRE, który akumuluje się w zależności wartości badanego potencjału. Stymulacja komórek HL-60 za pomocą ATRA wpływa na spadek potencjału względem komórek grupy kontrolnej (**Rysunek 32**) bez jednoczesnego uruchomienia mechanizmów śmierci komórkowej. Dodatkowo dla badanych komórek przeprowadzono fluorescencyjne obrazowanie mitochondriów barwionych związkiem MitoTracker™Orange CM-H2TMRos, którego akumulacja również zależy od potencjału błony mitochondrialnej. Mitochondria były obserwowane w rąbku cytoplazmatycznym lub okalały jądro (**Rysunek 31 C**).



Rysunek 32 Potencjał błony mitochondrialnej w ATRA-dHL-60 względem kontroli (100%) obliczony na podstawie geometrycznej średniej fluorescencji. Niepewność podano jako błąd standardowy (SE), liczba powtórzeń biologicznych N=3.

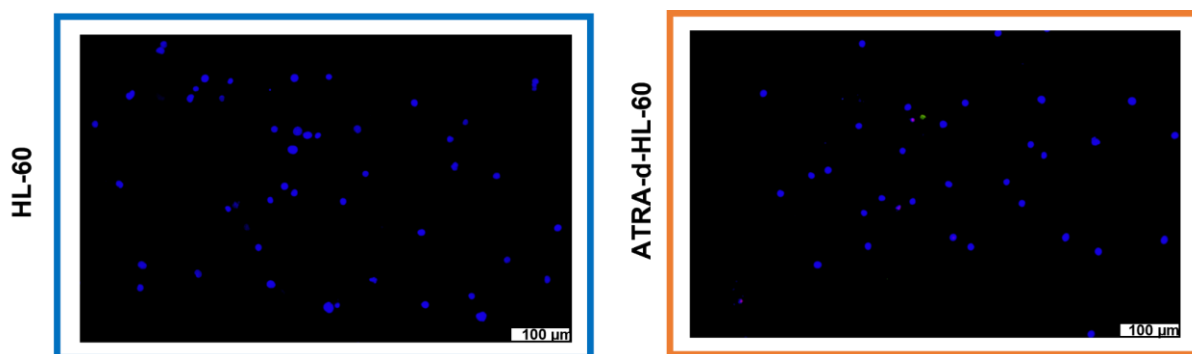
Ze względu na postawioną hipotezę badawczą niniejszych badań, tj., że różnicowanie się komórek HL-60 w kierunku neutrofilii manifestuje się zmianami w obrębie mitochondriów, których dystrybucję można efektywnie śledzić z użyciem reportera ramanowskiego MitoBADY, koniecznym było prowadzenie badań na żywych komórkach. Cytochrom obecny w mitochondriach jest wrażliwy na działanie czynników utleniających, do których należą szeroko stosowane w badaniach ramanowskich aldehydy (glutaraldehyd, paraformaldehyd, czy też buforowana formalina). Z kolei utrwalanie komórek etanolem skutkowało by z kolei niekorzystnym wypłukiwaniem lipidów. Praca z materiałem nieutrwalonym wymagała zatem dobrania odpowiednich parametrów pomiarowych zapobiegających przede wszystkim fototoksyczności i śmierci komórek na skutek zbyt wysokiej energii promieniowania dostarczonej przez promieniowanie laserowe.

Cel pracy zakładał spektroskopową ocenę stanu mitochondriów, które są niewielkimi strukturami, wobec czego w obrazowaniu ramanowskim zastosowano krok pomiarowy nie większy niż 0,5 μm . Optymalizując czas detekcji pojedynczego widma wzięto pod uwagę konieczność braku oznak śmierci komórkowych oraz utleniającego wpływu lasera na sygnał cytochromu, a także całościowy czas obrazowania. Do dalszych badań wybrano czas integracji 0,05 s, co pozwalało dokonać obrazowania pojedynczej komórki w czasie około 3 min. Ze względu na krótki czas akumulacji promieniowania ramanowskiego wzrósł stopień zaszumienia rejestrowanych widm utrudniając tym samym ich interpretację, w szczególności

pasma 790 cm^{-1} umożliwiającego wskazanie dystrybucji i kształtu jądra komórkowego (**Rysunek 34**).

Cecha wspólną MitoBADY (MB) oraz barwników fluorescencyjnych znakujących mitochondria jest obecność lipofilowego kationu [14], wobec tego obrazy ramanowskie prezentujące dystrybucję intensywności integralnych pasma tego związku 2220 cm^{-1} odpowiadają obrazom integracji 753 cm^{-1} , które są charakterystyczne dla zredukowanej formy cytochromu C obecnej w mitochondriach. W wyniku 15 i 30 minutowej inkubacji komórek HL-60 z MB obrazy dystrybucji intensywności integralnych MB nie wskazywały znacznej kolokalizacji znacznika ze strukturami lipidowymi. Zaobserwowano natomiast wzrost akumulacji MB w komórkach HL-60 traktowanych ATRA, pomimo obniżonego potencjału błony mitochondrialnej w tych komórkach (**Rysunek 32, Rysunek 34, Rysunek 36**).

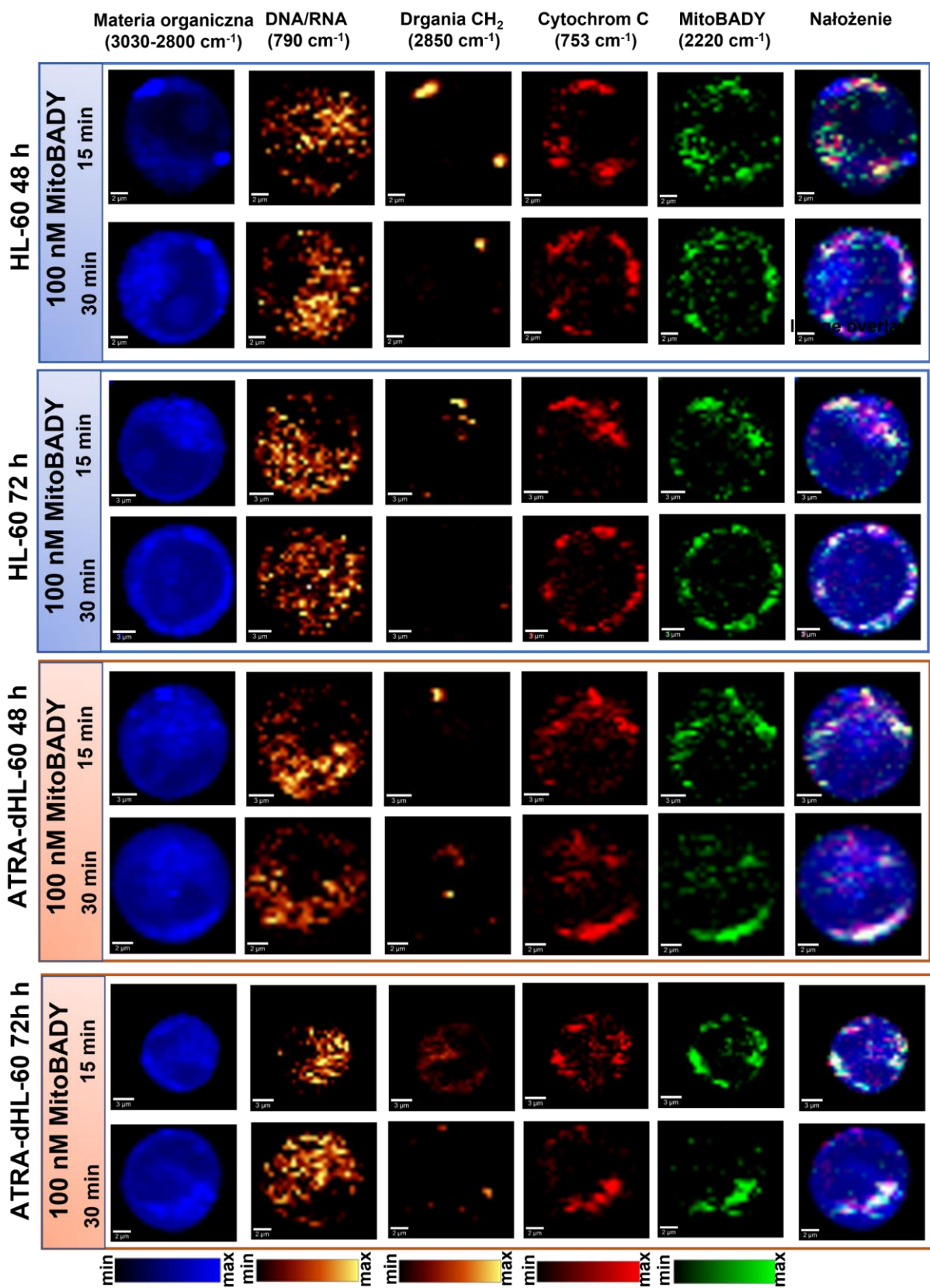
W celu pełnej oceny wpływu MB na badane komórki zweryfikowano, czy komórki HL-60 i ATRA-dHL-60 poddane działaniu MB w stężeniu 100 nM przez 15 i 30 min nie ulegają apoptozie i nekrozie w warunkach odpowiadającym pomiarom ramanowskim (czas trwania pomiaru). Komórki inkubowane z MB po ustalonym czasie przygotowania preparatu do oznaczeń ramanowskich pozostawiano dalej w ciepłym buforze HBSS przez 15, 30, 45 min i 1 h w temperaturze pokojowej. W każdym punkcie czasowym komórki nekrotyczne i apoptotyczne były oznaczane fluorescencyjnie przy użyciu barwienia PI oraz aneksyny V. W celu wizualizacji pojedynczych komórek stosowano równolegle barwnik Hoechst 33342. Po 1 h dla około 3% komórek zaobserwowano sygnał fluorescencyjny PI i aneksyny V (**Rysunek 33**). Pokazuje to, że inkubacja HL-60 z MitoBADY w stężeniu 100 nM przez 15 i 30 min nie prowadzi do śmierci komórek w warunkach symulujących czas trwania pomiarów ramanowskich.



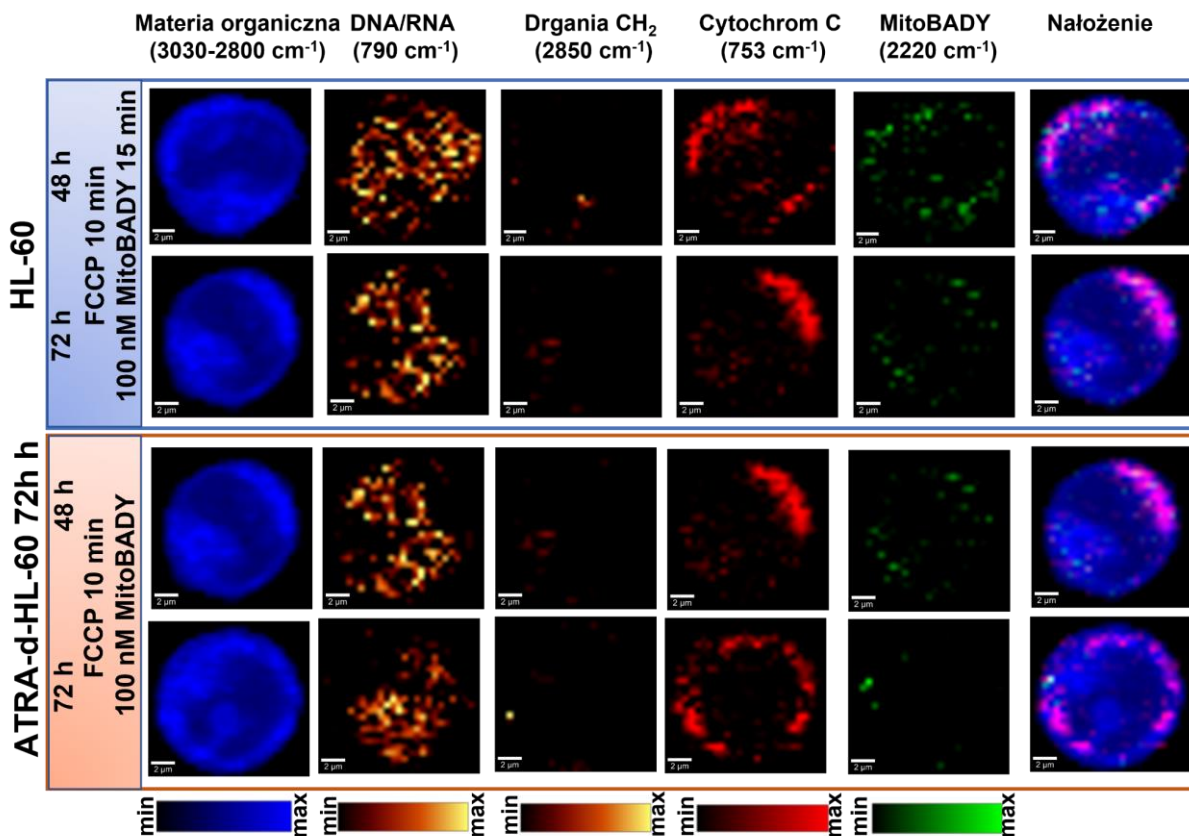
Rysunek 33 Obrazowanie fluorescencyjne komórek apoptotycznych i nekrotycznych bawionych odpowiednio Hoechst 33342 (niebieski), PI (czerwony), oraz aneksyną V (zielony) po 1 h od zakończenia 15 minutowej stymulacji komórek znacznikiem MB.

W celu identyfikacji związku między akumulacją MB a spadkiem potencjału błony mitochondrialnej jako kontrolę pozytywną zastosowano FCCP, będącego jonoforem protonowym rozprzegających oksydacyjną fosforylację oraz prowadzącym do obniżenia potencjału błony mitochondrialnej. Poprzedzenie 10 minutową inkubacją komórek 30 μM FCCP spowodowało spadek akumulacji MB w komórkach (**Rysunek 35**). To potwierdza przyjęte założenie, że spadek potencjału błony mitochondrialnej prowadzi do zmniejszenia akumulacji MB w komórkach. Można zatem wnioskować, że obserwowany na obrazach ramanowskich wzrost akumulacji znacznika w komórkach ATRA-dHL-60 nie jest związany wyłącznie ze zmianami potencjału błony mitochondrialnej.

Analiza widm średnich obrazowanych komórek, w szczególności pasm charakterystycznych cytochromu C (1585, 1315, 1130 cm^{-1}), DNA i RNA (790 cm^{-1}) nie wykazały istotnych różnic pomiędzy komórkami kontrolnymi i ATRA-dHL-60, bez względu na dodatkową obecność MB. Dodatkowo nie zaobserwowano istotnych różnic w intensywności pasma 1585 cm^{-1} , pomimo jego obecności w widmie ramanowskim ATRA (**Rysunek 36**). Niewielkie różnice spektralne obserwowane podczas analizy porównawczej widm komórek kontrolnych i ATRA-dHL-60 dotyczyły intensywności pasm 2850, 1660 i 1445 cm^{-1} będących pasmami charakterystycznymi lipidów (odpowiednio: drgania rozciągające grup CH_2 , $\text{C}=\text{C}$ i drgania deformacyjne grup CH_2). Intensywności tych pasm wzrastały w komórkach o fenotypie neutrofilii niezależnie od inkubacji z 100 nM MB. Zaobserwowano także zależną od czasu akumulację MB w komórkach, co zostało potwierdzone wyższą intensywnością pasma 2220 cm^{-1} po 30 min w porównaniu do 15 min inkubacji.

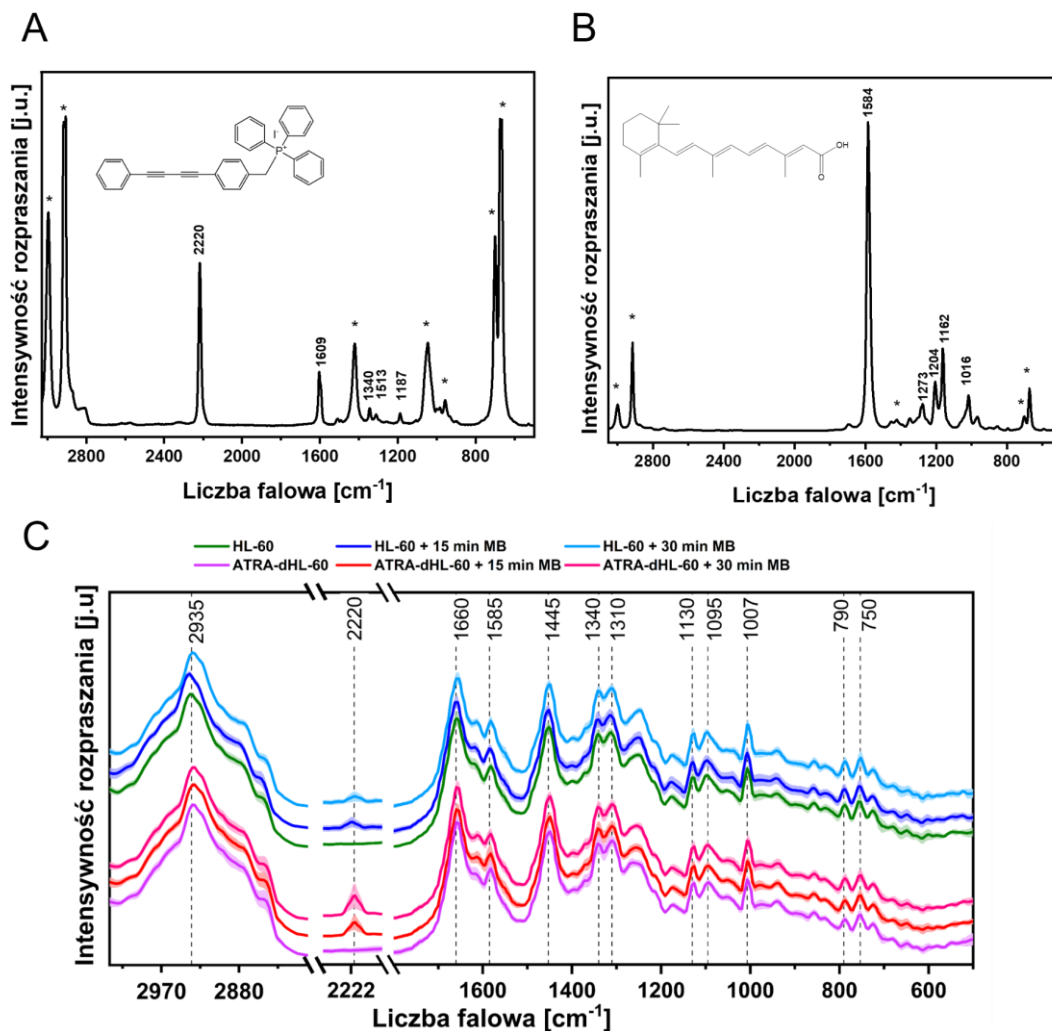


Rysunek 34 Reprezentatywne obrazy integracyjnie komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 inkubowanych z 100 nM MitoBADY przez 15 lub 30 min.



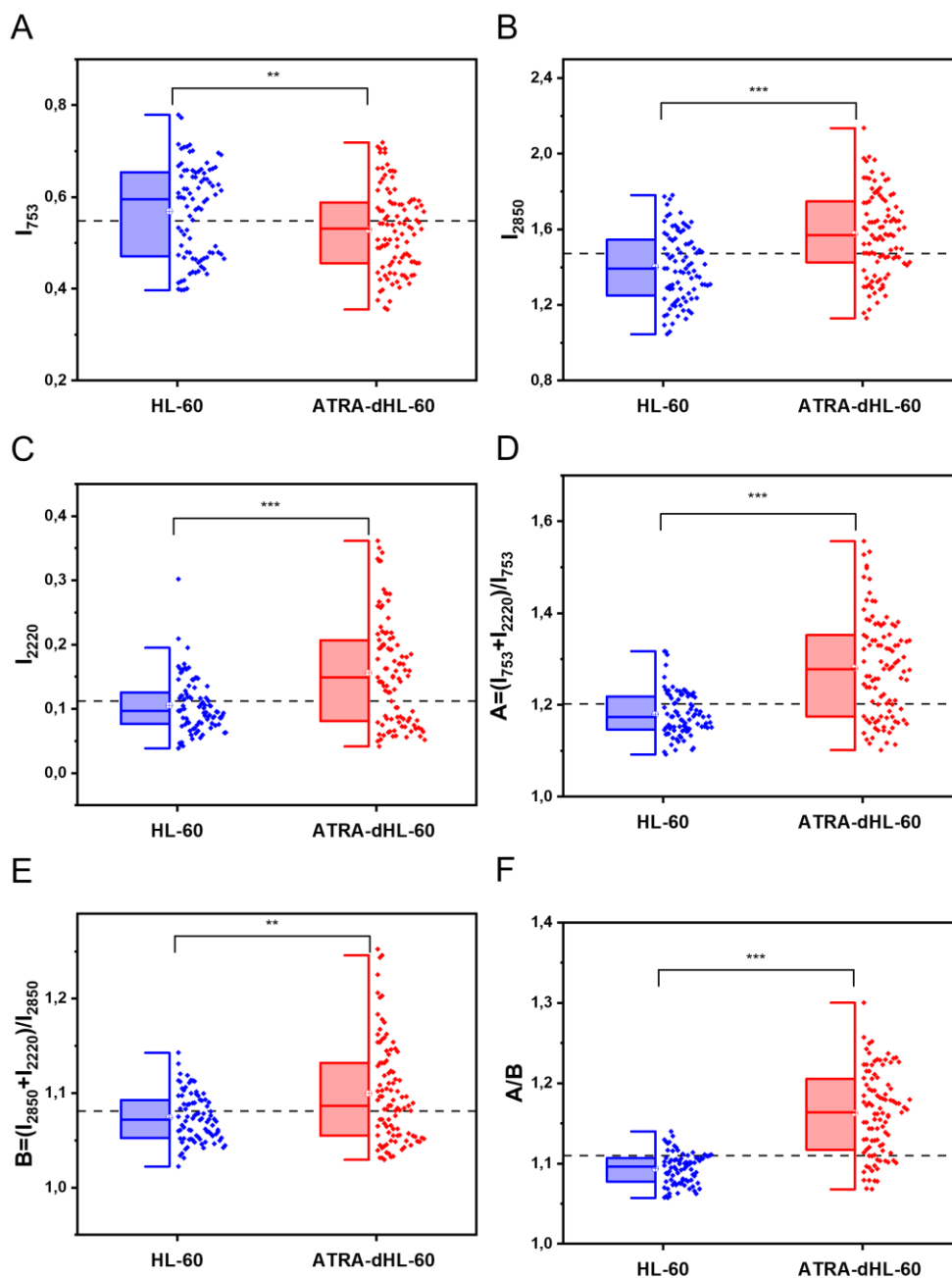
Rysunek 35 Reprezentatywne obrazy integracyjnie komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 preinkubowanych 30 μM FCCP, a następnie inkubowanych z 100 nM MitoBADY przez 15 lub 30 min.

Warto w tym miejscu wspomnieć, że badania nad TPP-BDDBPDM, związkiem podobnie jak MB zwierającym grupę kierującą do mitochondriów TPP+ oraz grupy funkcyjne dające sygnał w cichym zakresie spektralnym widma ramanowskiego, wykazały spadek jego sygnału 2216 cm^{-1} po obniżeniu potencjału błony mitochondrialnej komórek HeLa [130]. Mimo znacznego obniżenia potencjału błony mitochondrialnej, sygnał TPP- BDDBPDM był wciąż obecny, chociaż zdecydowanie mniejszy [130]. Stężenie MB w komórkach traktowanych ATRA po 48 i 72 h rośnie, pomimo jednoczesnego spadku potencjału błony mitochondrialnej (**Rysunek 32**). Uzyskane wyniki wskazują więc, że jedną z przyczyn akumulacji MB w badanych komórkach jest wrastająca zawartość lipidów w ATRA-dHL-60 oraz lipofilowość MB.

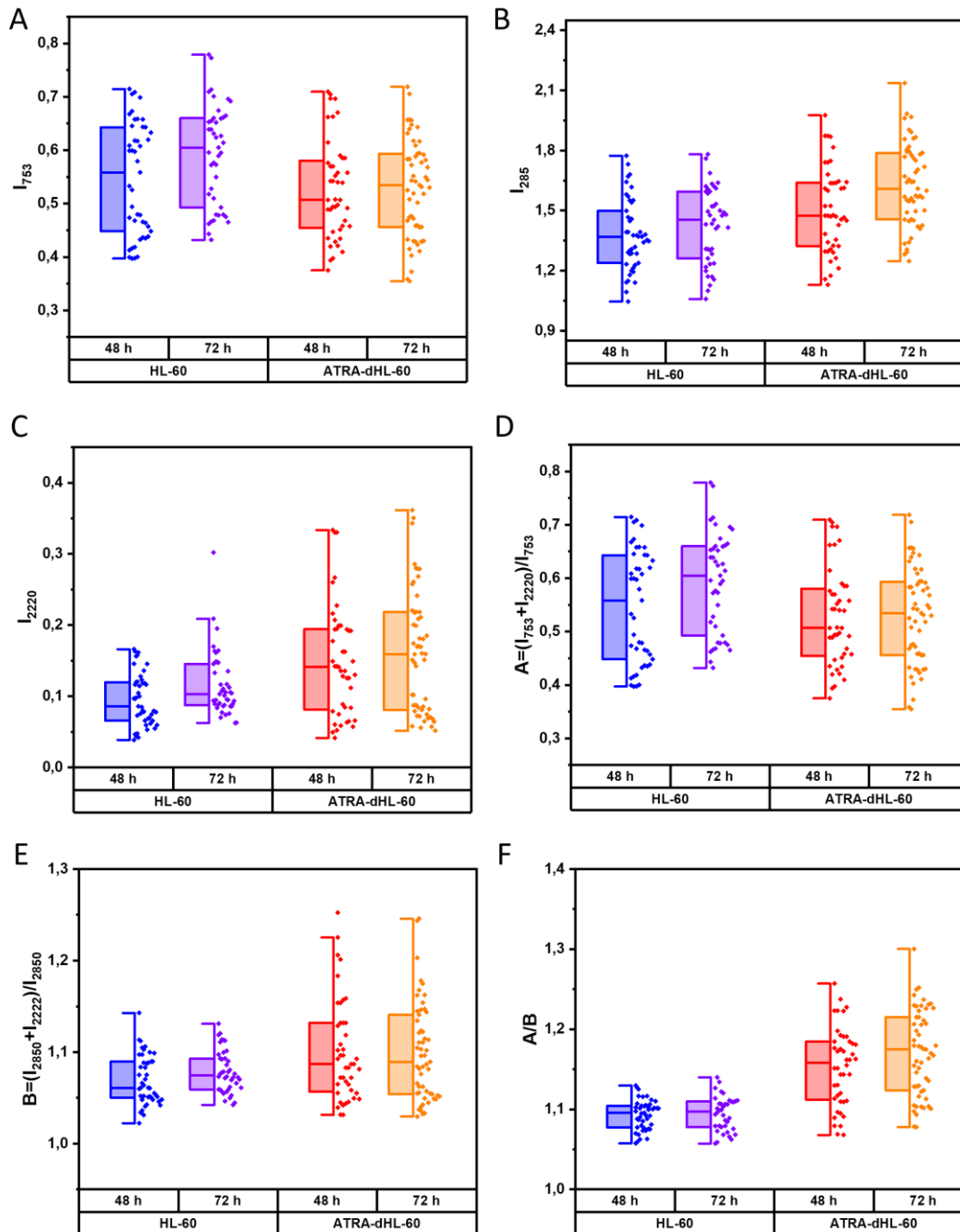


Rysunek 36 Widma średnie komórek HL-60 i traktowanych ATRA (ATRA-dHL-60) jak również dodatkowo inkubowanych przez 15 lub 30 minut z 100 nM MitoBADY

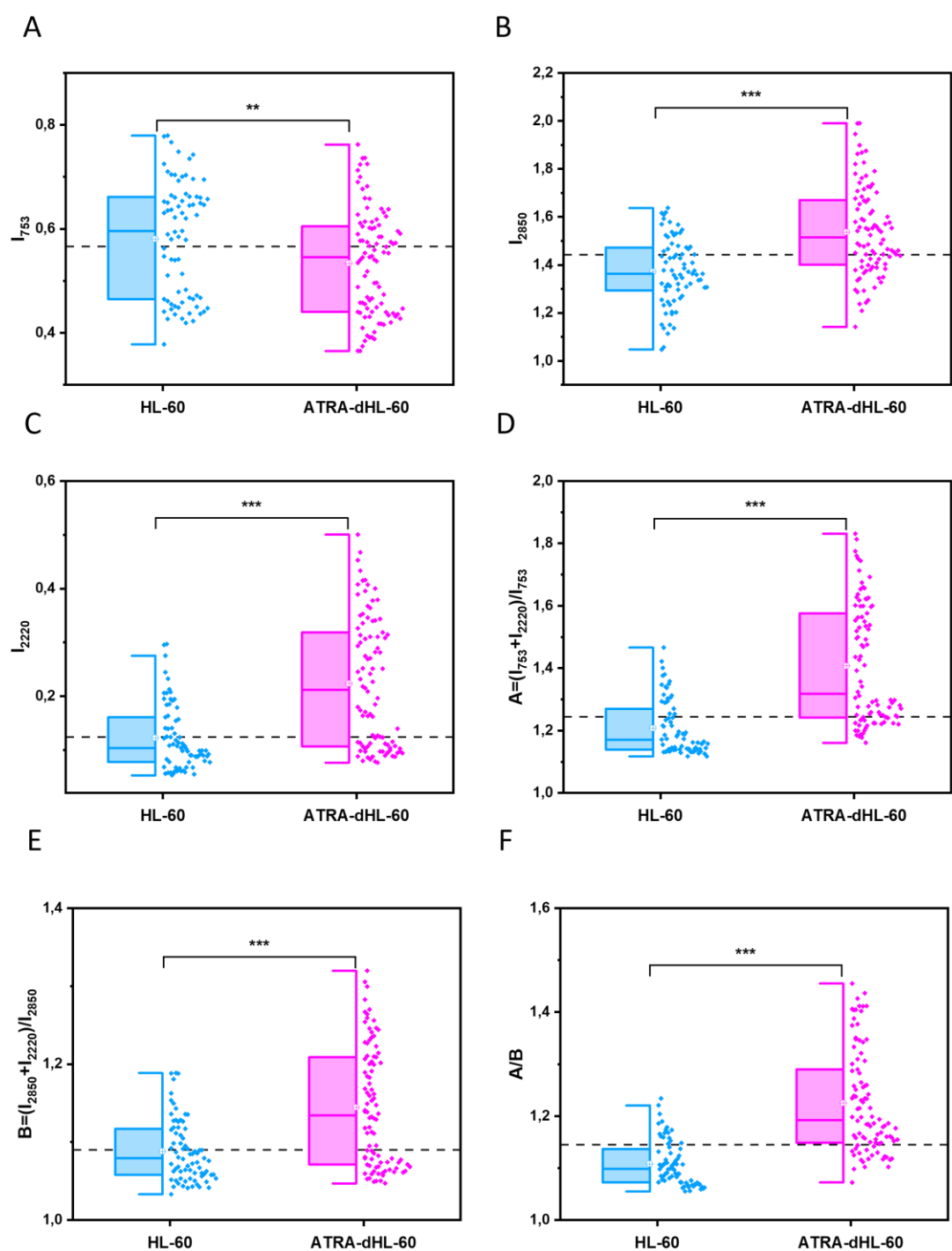
W celu opisu zmian biochemicznych wywołanych indukowanym ATRA procesem różnicowania HL-60 obliczono intensywności integralne pasm charakterystycznych dla lipidów (2850 cm^{-1}), hemoprotein (753 cm^{-1}) oraz MitoBADY (2220 cm^{-1}), których zmiany zaobserwowano na widmach średnich (**Rysunek 37, Rysunek 38, Rysunek 39, Rysunek 40**). Porównanie wartości intensywności integralnych poszczególnych pasm nie wykazało różnic istotnych statystycznie dla widm komórek inkubowanych z ATRA przez 48 i 72 h (**Rysunek 38, Rysunek 40**), dlatego dane z wykorzystaniem MB były dalej analizowane łącznie.



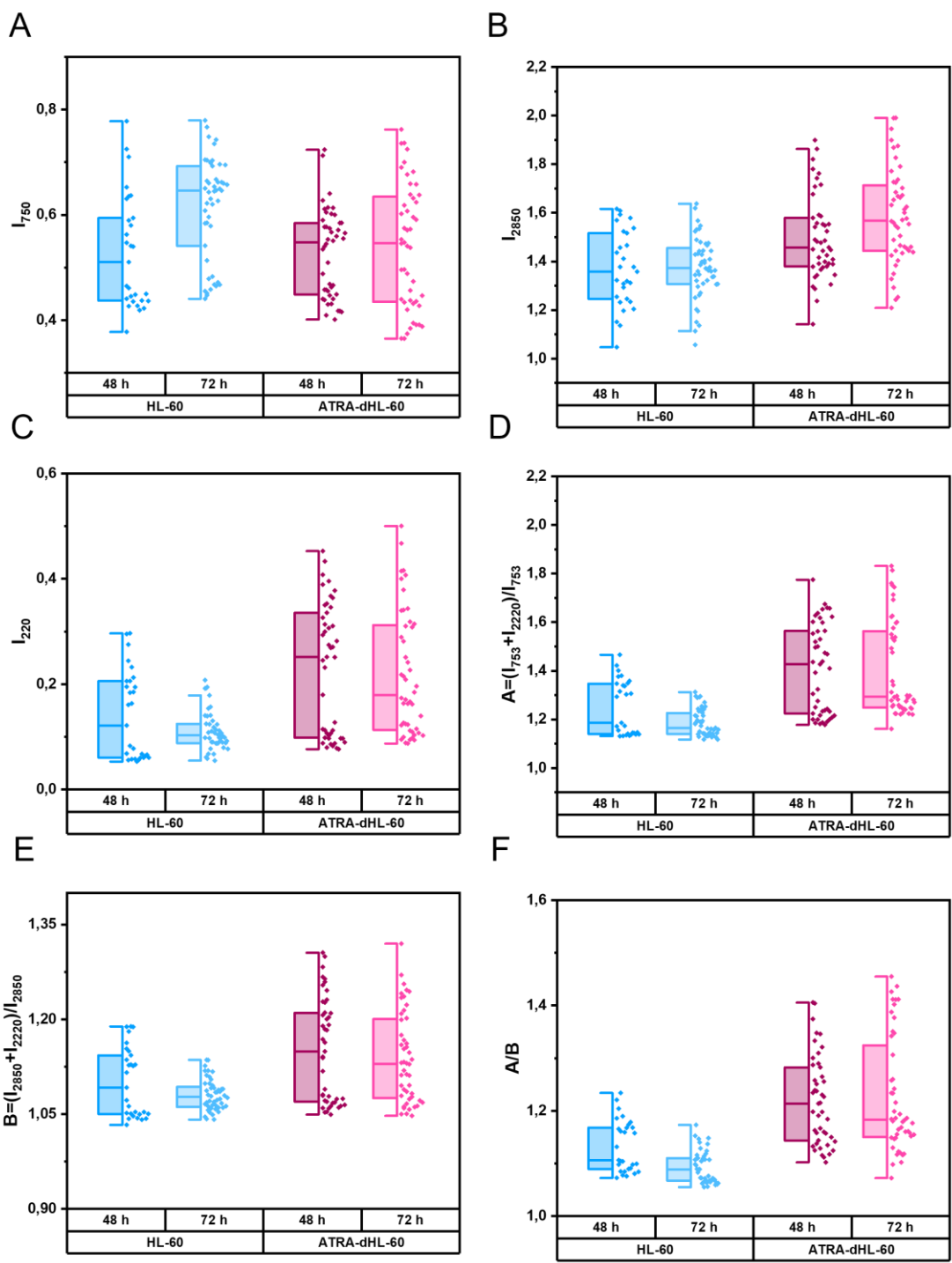
Rysunek 37 Intensywność integralna pasm (A) 753, (B) 2850, (C) 2220 cm^{-1} oraz stosunków (D) A, (E) B oraz (F) A/B odpowiednio zdefiniowanych na osiach Y obliczone dla średnich widm ramanowskich komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 inkubowanych przez 15 min z 100 nM MitoBADY. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyli. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartylowego



Rysunek 38 Intensywność integralna pasm (A) 753, (B) 2850, (C) 2220 cm^{-1} oraz stosunków (D) A, (E) B oraz (F) A/B odpowiednio zdefiniowanych na osiach Y obliczone dla średnich widm ramanowskich komórek kontrolnych HL-60 i traktowanych ATRA przez 48 i 72 h oraz inkubowanych przez 15 min z 100 nM MitoBADY. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyli. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartylowego.



Rysunek 39 Intensywność integralna pasm (A) 753, (B) 2850, (C) 2220 cm^{-1} oraz stosunków (D) A, (E) B oraz (F) odpowiednio zdefiniowanych na osiach Y obliczone dla średnich widm ramanowskich komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 inkubowanych przez 30 min z 100 nM MitoBADY. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyła. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartyłowego



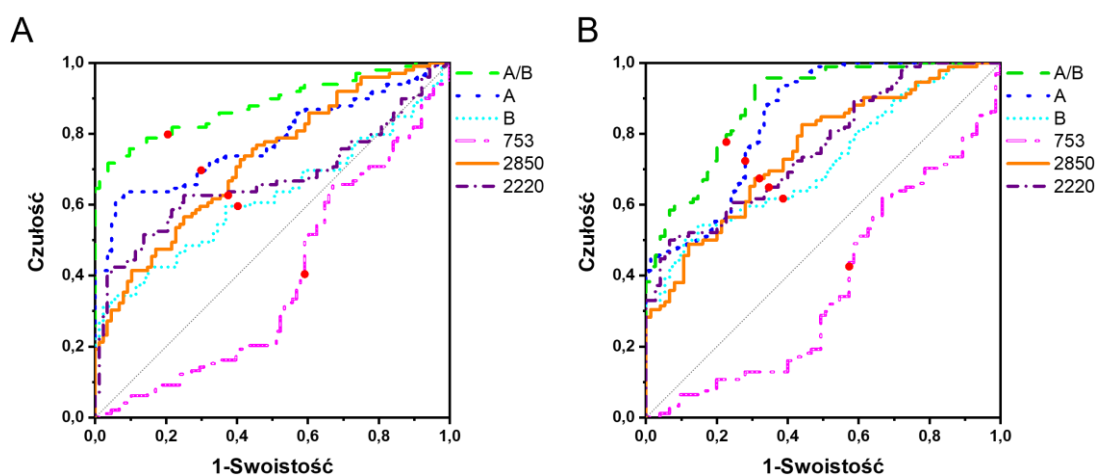
Rysunek 40 Intensywność integralna pasm (A) 753, (B) 2850, (C) 2220 cm^{-1} oraz stosunków (D) A, (E) B oraz (F) A/B odpowiednio zdefiniowanych na osiach Y obliczone dla średnich widm ramanowskich komórek kontrolnych HL-60 i traktowanych ATRA przez 48 i 72 h oraz inkubowanych przez 30 min z 100 nM MitoBADY. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyła. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, □ wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartylowego.

Analiza pasm charakterystycznych dla lipidów i MB potwierdziła istotny statystycznie wzrost intensywności integralnej pasm przy 2850 i 2220 cm^{-1} podczas indukowanego różnicowania komórek HL-60, obserwowany wcześniej na średnich widmach ramanowskich (**Rysunek 36**), oraz spadek intensywności pasma 753 cm^{-1} w komórkach ATRA-dHL-60 (**Rysunek 37 A, B, C; Rysunek 39 A, B, C**). Obliczenie stosunków intensywności pasm, zdefiniowanych jako $A = (I_{753}+I_{2220})/I_{753}$, $B = (I_{2850}+I_{2220})/I_{2850}$ oraz A / B umożliwiło podkreślenie różnic w profilu spektralnym pomiędzy komórkami HL-60 i ATRA-dHL-60 po odpowiednio 15 i 30 min inkubacji z 100 nM MB (**Rysunek 37 D, E, F; Rysunek 39 D, E, F**). Obliczono wartość progową stosunku A / B , która umożliwia klasyfikację widm ramanowskich komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 z najwyższą swoistością i czułością za pomocą analizy krzywej charakterystyki operacyjnej odbiornika (ROC) (**Rysunek 41, Tabela 7**). Optymalne parametry uzyskano dla stosunku A / B o wartość pola powierzchni pod krzywą ROC (AU-ROC) równego 0,882 oraz swoistości i czułość tego modelu na poziomie odpowiednio 79,5% i 79,8%. Próg dyskryminacji dla stosunku A / B był równy 1,110 i zapewniał najwyższą możliwą specyficzność i czułość po inkubacji komórek HL-60 z reporterem ramanowskim MitoBady o stężeniu 100 nM inkubowanym przez 15 min. Podobny poziom dyskryminacji uzyskano dla komórek inkubowanych przez 30 min z MitoBady z krzywą AUC-ROC równą 0,885, swoistością równą 77,3%, czułością 77,6% i progiem dyskryminacji równym 1,145. W obu przypadkach najslabszą wydajność klasyfikacji otrzymano na podstawie intensywności pasma 753 cm^{-1} . Potwierdza to, że pasma cytochromu C są trudne do interpretacji ze względu na jednoczesną obecność zjawisk rezonansu ramanowskiego dla długości promieniowania laserowego 532 nm oraz obecność tła rezonansowego na widmach ramanowskich [12]. Intensywność całek dla pasm 2850, 2220 cm^{-1} wykazała umiarkowane parametry wydajności modelu, które były lepsze niż dla samego stosunku B.

Tabela 7 Parametry klasyfikacji

	AUC-ROC	Swoistość (%)	Czułość (%)	Wartość progowa
15 min 100 nM MitoBady incubation				
750	0,400	40,4	41,8	0,548
2850	0,717	63,4	63,9	1,472
2222	0,700	62,5	62,6	0,112

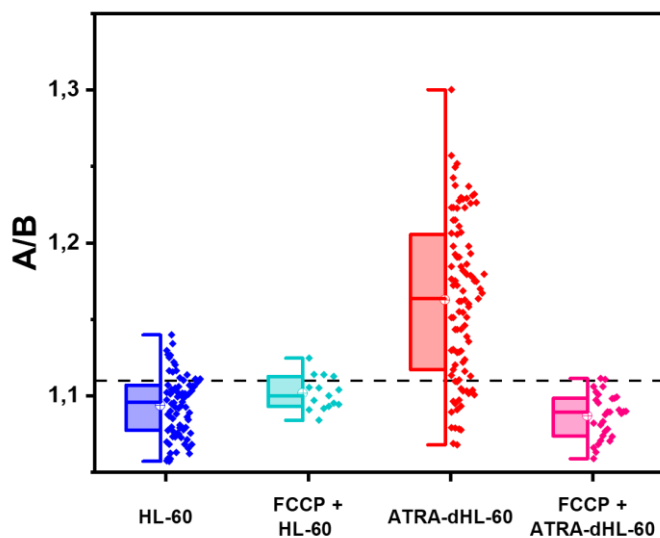
A	0,777	69,0	69,3	1,202
B	0,592	59,1	58,8	1,081
A/B	0,882	79,5	79,8	1,110
30 min 100 nM MitoBADY incubation				
750	0,365	42,7	42,6	0,566
2850	0,752	68,0	67,4	1,443
2222	0,761	65,3	64,9	0,124
A	0,843	72,0	72,3	1,244
B	0,719	61,3	61,7	1,090
A/B	0,885	77,3	77,7	1,145



Rysunek 41 Krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika obliczona dla modelu klasyfikacji HL-60 względem ATRA-dHL-60 inkubowanych z MitoBADY przez (A) 15 min (B) i 30 min.

Dodatkowo, wstępne traktowanie komórek protonoforem (FCCP) pozwoliło zmniejszyć wpływ potencjału błonowego mitochondriów na akumulację MB, przy czym związek ten nadal był wykrywany w inkubowanych komórkach co umożliwiło obliczenie wartości intensywności integralnej pasma charakterystycznego dla MB zastosowanie tego wyniku do wcześniej uzyskanych progów. W rezultacie stosunek A/B wykazał, że większość komórek ATRA-dHL-60 po traktowaniu FCCP jest klasyfikowana jako komórki kontrolne, podczas gdy tylko nieliczne komórki kontrolne były błędnie klasyfikowane (**Rysunek 42**). Biorąc pod uwagę, że ATRA-dHL-60 wykazuje wyższą zawartość lipidów odzwierciedloną przez intensywność pasma 2850 cm^{-1} , zmniejszoną akumulację MB oraz wartości A/B klasyfikujące ATRA-dHL-60 poddane działaniu FCCP

jako HL-60, można wnioskować, że MitoBADY jest nie tylko markerem potencjału błonowego mitochondriów, ale jest również zależny od zawartości lipidów w badanych komórkach. Jednak swoistość i czułość klasyfikatora opartego na intensywności pasma 2850 cm^{-1} nie jest wystarczająca, aby stać się wiarygodnym wskaźnikiem różnicowania, co wymaga zastosowania MitoBADY.

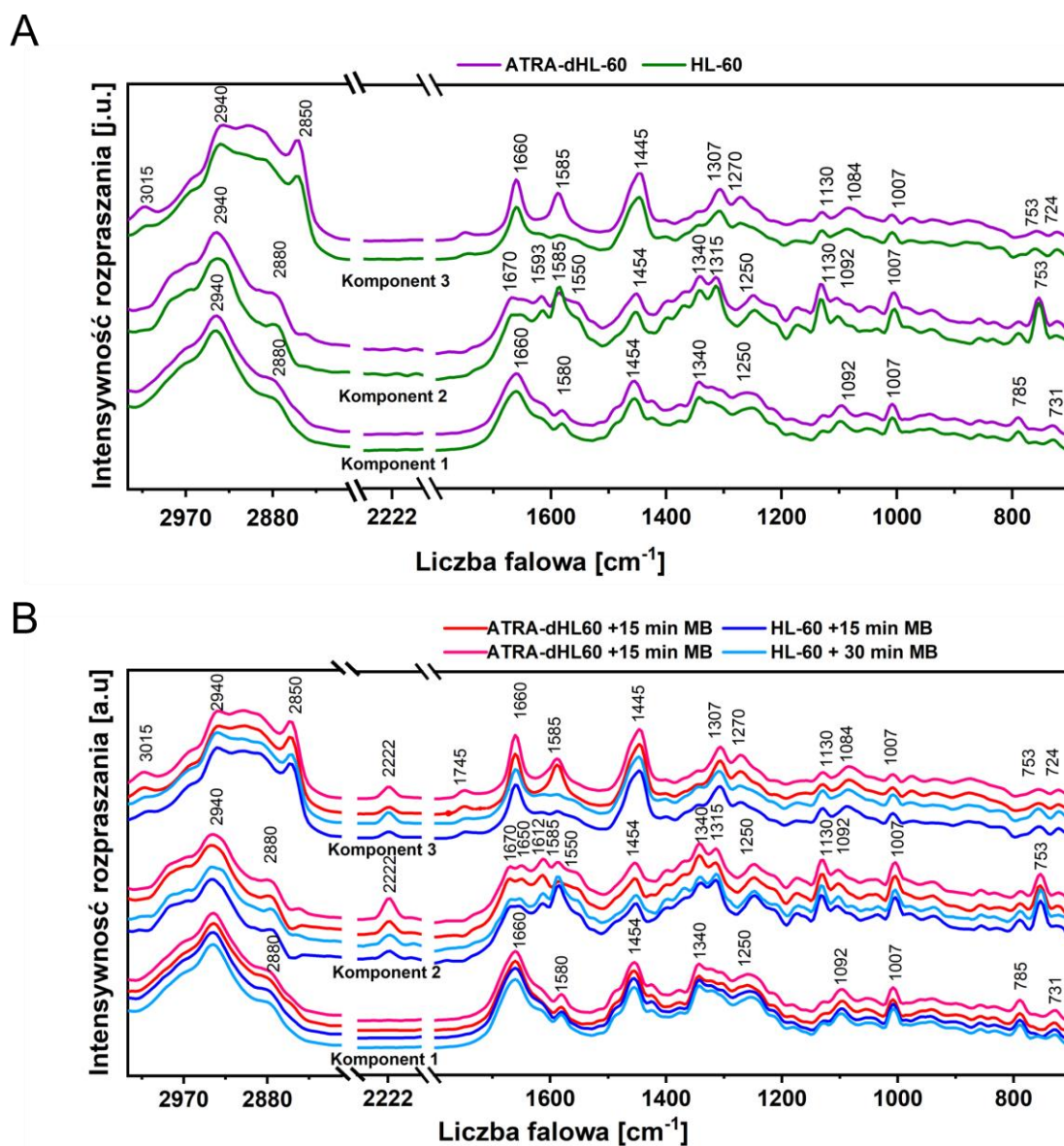


Rysunek 42 Wartości stosunku intensywności A/B obliczony dla widm średnich komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 traktowanych $30\ \mu\text{M}$ FCCP przez 10 min a kolejno z $100\ \text{nM}$ MitoBADY.

Otrzymane wyniki dla komórek poddanych działaniu FCCP są zgodne z doniesieniami literaturowymi, które wykazały zmniejszenie akumulacji reporterów opartych na TPP+ po zastosowaniu środków rozprzegających potencjał błonowy [130]. Pieczara i in. [14] wykazali natomiast, że komórki śródbłonna poddane działaniu $0,7\ \mu\text{M}$ FCCP przez 30 min i następnie inkubowaniu z MitoBADY wykazały zwiększony stosunek I_{2220}/I_{1440} , jednocześnie zaobserwowali oni zwiększoną intensywność pasma $753\ \text{cm}^{-1}$ w stosunku do $1440\ \text{cm}^{-1}$. W prezentowanych w niniejszej dysertacji badaniach, ze względu na obserwowaną zmianę zawartości lipidów oraz metabolizmu komórek na skutek indukowanego różnicowania, pasmo $1440\ \text{cm}^{-1}$ reprezentujące drgania deformacyjne CH_2 w łańcuchach lipidów nie jest dobrym kandydatem do opisu zmian związanych z depolaryzacją błony mitochondrialnej w HL-60 i ATRA-dHL-60. Z tego też względu nie zdecydowano się na śledzenie zmian I_{2220} względem I_{1440} .

Powyżej przedstawiona metoda klasyfikacji HL-60 i ATRA-dHL-60 oparta na analizie stosunku intensywności pasm charakterystycznych cytochromu C, lipidów oraz znacznika MitoBADY jest łatwa i nie wymaga stosowania analizy widm z wykorzystaniem zaawansowanych metod analizy wielowymiarowej.

Szczegółowa charakterystyka badanych grup komórek jest możliwa przy zastosowaniu zaawansowanej metody chemometrycznej jaką jest MCR-ALS. Metoda ta opiera się na budowaniu addytywnego modelu pozwalającego na oszacowaniu profili spektralnych czystych składników/komponentów przy wykorzystaniu jedynie informacji z wyjściowej macierzy danych, zawierającej wyniki pomiarów składników mieszanych [53,113]. celu potwierdzenia molekularnych różnic w modelu promielocytów HL-60 i komórek o fenotypie neutrofilii ATRA-dHL-60 jak również wpływu MitoBADY, przeprowadzono analizę MCR-ALS dla 4 komponentów. Aby uniknąć identyfikowania różnic wynikających z efektu serii, indywidualnej zmienności komórek lub skanowanej płaszczyzny ogniskowej połączono wszystkie otrzymane obrazy hiperspektralne pojedynczych komórek. Zastosowanie w modelu MCR-ALS o mniejszej niż 4 liczby składowych komponentów nie wyodrębniło podstawowych składników komórki, natomiast użycie większej liczby składników prowadziło do otrzymywania zniekształconych widma komponentów. W każdym badanym przypadku pierwsza składowa miała identyczny profil spektralny charakterystyczny dla zasad kwasów nukleinowych (1580, 1340, 785 cm^{-1}), grup $-\text{PO}_2^-$ w DNA (1092 cm^{-1}) oraz białek (2930, 2880, 1660, 1454, 1250, 1007 cm^{-1}), które są głównymi składnikami jądra komórkowego (**Rysunek 43**). Drugi komponent wykazywał głównie profil charakterystyczny dla hemoprotein (1593, 1315, 1130, 753 cm^{-1}) i białek (2940, 2880, 1250, 1007 cm^{-1}). Analiza profili spektralnych komponentu 2 pozwala na odróżnienie komórek ATRA-dHL-60, które cechuje wyższa intensywność pasma 2880 cm^{-1} i niższą pasm 1595 i 753 cm^{-1} w porównaniu do profilu spektralnego odpowiadającego komponentowi 2 dla widm komórek HL-60. W przypadku analizy obrazów hiperspektralnych komórek inkubowanych z MB komponent 2 reprezentujący hemoproteiny posiadał dodatkowo pasmo przy 2220 cm^{-1} , którego intensywność wzrastała wraz z czasem inkubacji z MB. Intensywność tego pasm była również wyraźnie wyższa dla komponenty 2 w grupie obrazów ramanowskich komórek ATRA-dHL-60 w stosunku do grupy HL-60. Inne obserwowane na widmach pasmo charakterystyczne MB to 1612 cm^{-1} .



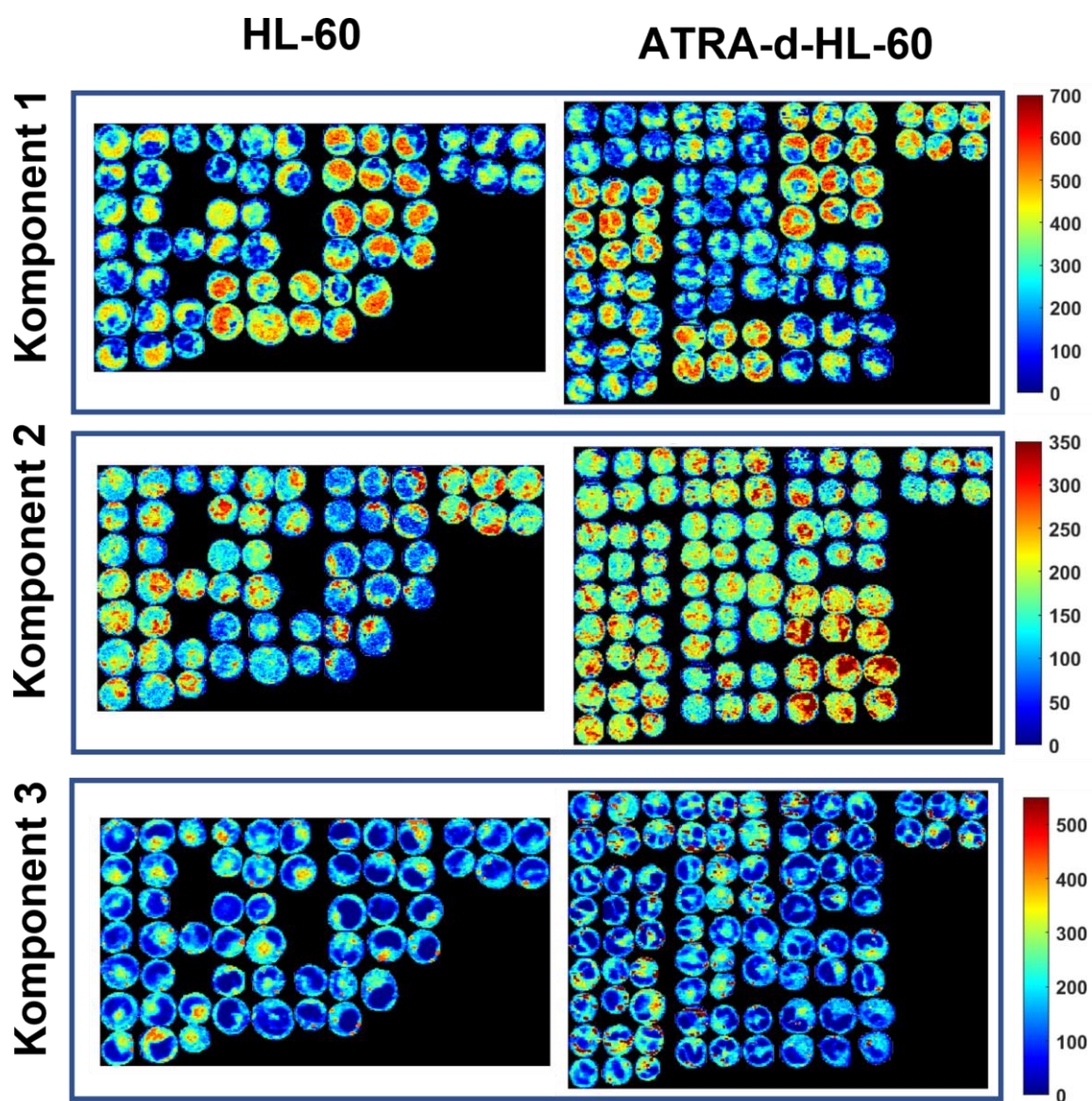
Rysunek 43 Profile spektralne komponentów analizy MCR komórek (A) HL-60 i ATRA-dHL-60 oraz (B) traktowanych 100 nM przez 15 lub 30 min.

Trzeci wyodrębniony w analizie MCR-ALS komponent zawierał pasma charakterystyczne dla struktur lipidowych, a obrazy jego dystrybucji sugerują obecność w komórkach kropli lipidowych. Komponenty lipidowe komórek ATRA-dHL-60 cechowała wyższa intensywność pasm charakterystycznych dla lipidów nienasyconych (3015 , 1660 , 1270 cm^{-1}), co wskazuje na wzrost stopnia nienasylenia w komórkach wskutek procesu różnicowania. Dodatkowo, znaczna różnica pomiędzy komórkami kontrolnymi i ATRA-dHL-60 została zaobserwowana dla intensywności pasma 2850 cm^{-1} specyficznego dla lipidów oraz pasma 1585 cm^{-1} charakterystycznego dla hemoprotein oraz ATRA. Jednoczesna obecność na widmach pasm 753 , 1130 i 1585 cm^{-1} może być wynikiem

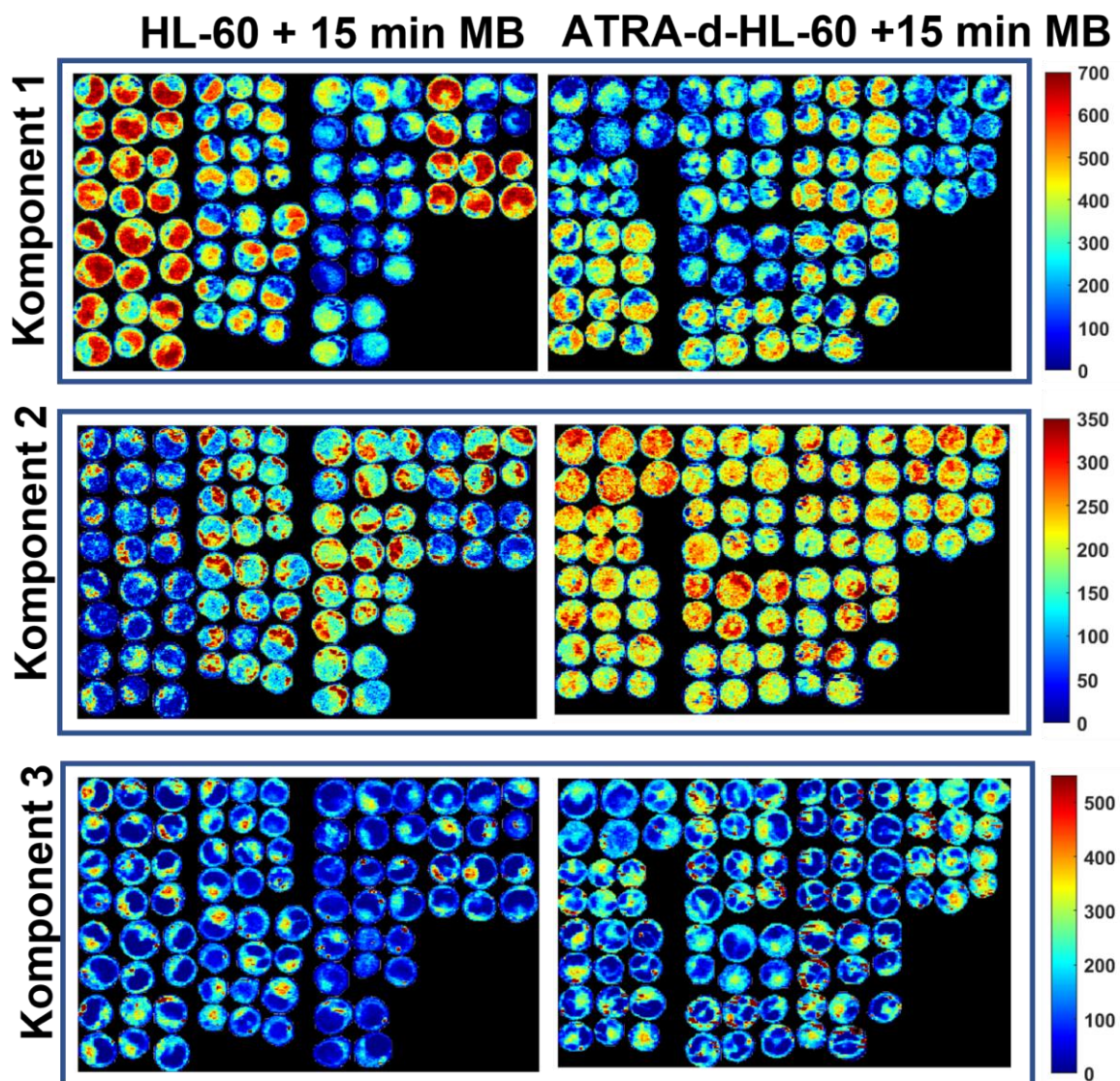
współwystępowania mitochondriów blisko kropli lipidowych, będących dla nich dogodnym magazynem energetycznym. Innym wyjaśnieniem wzrostu intensywności pasma 1593 cm^{-1} w komponencie 3, specyficznym dla kropli lipidowych, w komórkach ATRA-dHL-60 może być akumulacja ATRA w strukturach lipidowych ze względu na jego lipofilowy charakter. Ponadto obserwowano w komponencie 3 pasmo charakterystyczne dla MB, aczkolwiek jego intensywność nie wskazywało na zależność od czasu inkubacji. Profil komponentu 4 ujawnił natomiast typowe widma buforu otaczającego komórki charakteryzujące się głównie pasmami drgań grup O-H.

Obrazy dystrybucji komponentów (**Rysunek 44**, **Rysunek 45**, **Rysunek 46**) prezentowały znacznie lepszy kontrast dla składnika 1 o spektroskopowych cechach jądra komórkowego niż obrazy uzyskane w wyniku integracji pasma markerowego DNA przy 785 cm^{-1} (**Rysunek 34**) i pozwalały dodatkowo zaobserwować segmentację jądra na dwu- lub trzypłatowe w komórkach ATRA-dHL-60. Z drugiej strony, komponenty 2 i 3 eksponowały obszary komórek, które mogą wskazywać na dystrybucję mitochondriów i struktur lipidowych.

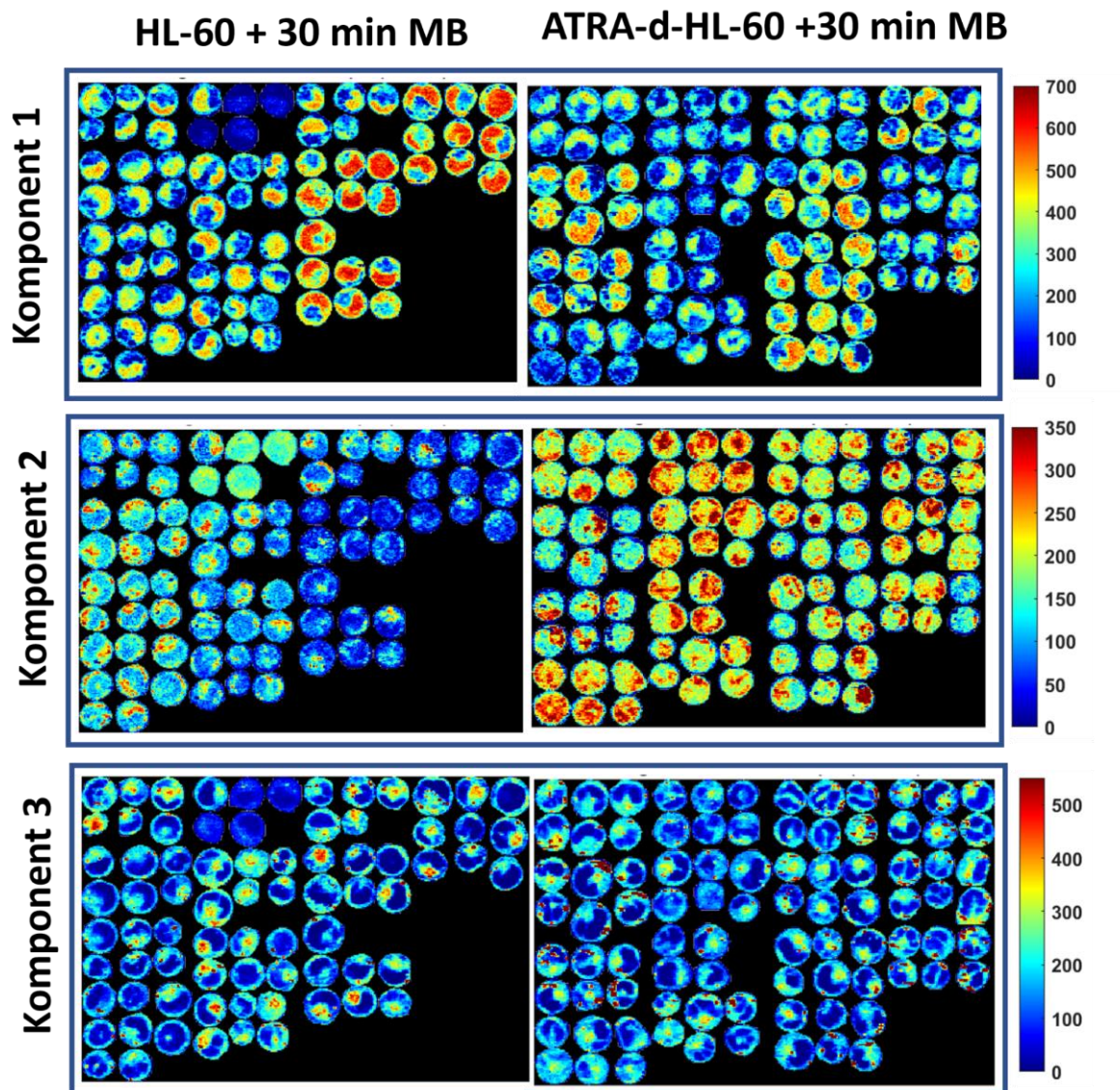
Podsumowując, otrzymane wyniki analizy MCR-ALS potwierdzają zróżnicowany skład struktur lipidowych w komórkach HL-60 i ATRA-dHL-60, w szczególności wskazuje na zmianę stopnia nienasycenia lipidów, jak i akumulację ATRA ($3015, 2850, 1660, 1593\text{ cm}^{-1}$) w strukturach lipidowych. Komponent 2 o profilu spektroskopowym charakterystycznym dla białek hemowych, również podkreśla różnice w stanie biochemicznym i metabolicznym zróżnicowanych komórek. Otrzymany wynik jest zgodny z wcześniej obserwowanymi na widmach średnich tendencjami do spadku intensywności pasma 753 cm^{-1} i zmniejszenia akumulacji MB pod wpływem ATRA.



Rysunek 44 Obrazy dystrybucji komponentów 1-3 wraz ze skalą kolorystyczną dla komórek grupy kontrolnej (HL-60) i zróżnicowanej w kierunku neutrofilii (ATRA-dHL-60).



Rysunek 45 Obrazy dystrybucji komponentów 1-3 wraz ze skalą kolorystyczną dla komórek grupy kontrolnej (HL-60) i zróżnicowanej w kierunku neutrofilii (ATRA-dHL-60) inkubowanych przez 15 min z 100 nM MitoBADY (MB).

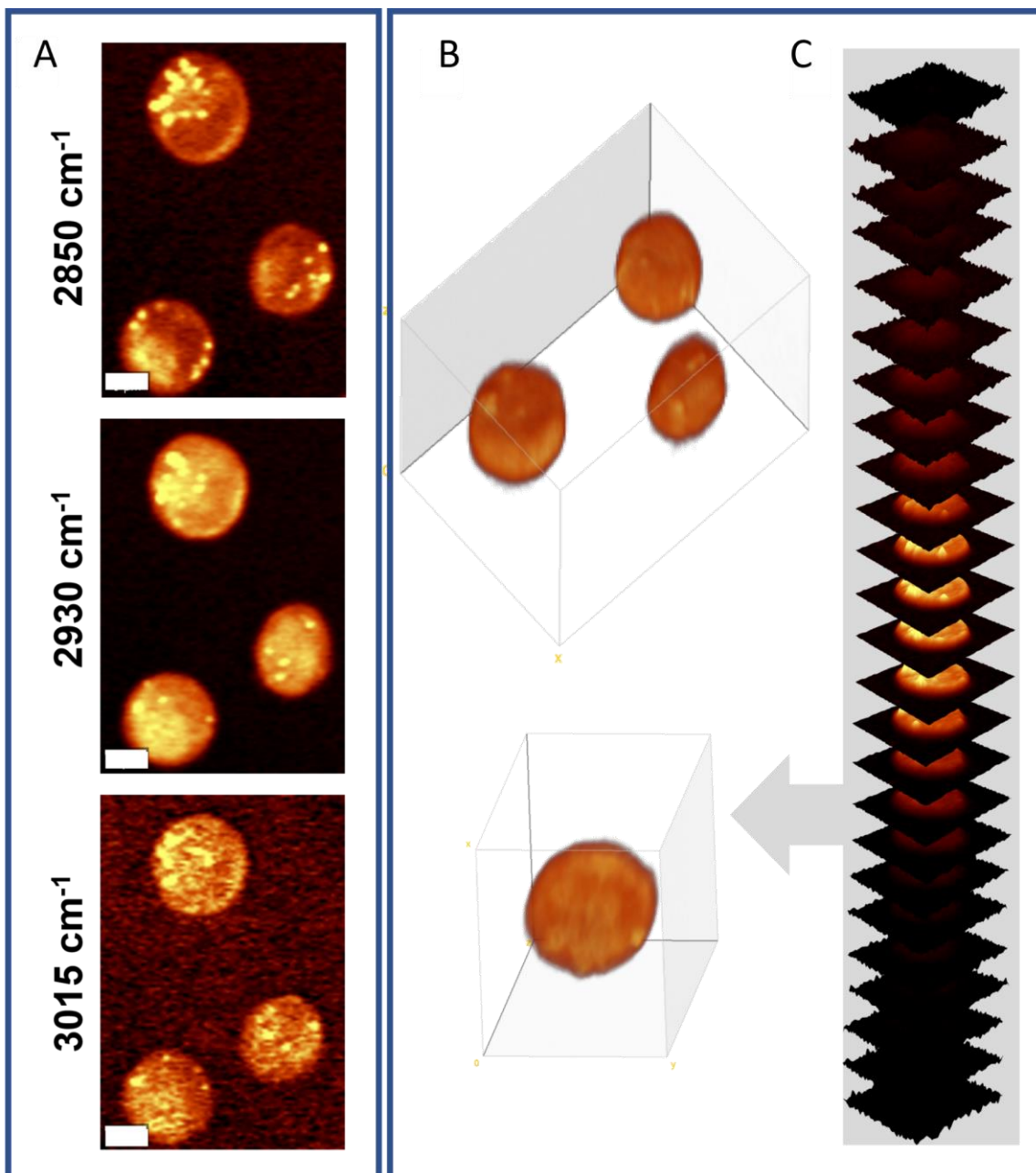


Rysunek 46 Obrazy dystrybucji komponentów 1-3 wraz ze skalą kolorystyczną dla komórek grupy kontrolnej (HL-60) i zróżnicowanej w kierunku neutrofilii (ATRA-dHL-60) inkubowanych przez 30 min z 100 nM MitoBADY (MB).

Powyżej prezentowane wyniki są oparte na analizie hiperspektralnych obrazów ramanowskich oraz widm średnich pojedynczych komórek. Ze względu na niewielką intensywność promieniowania ramanowskiego rozpraszane spontanicznie podejmowane są próby wykorzystania wymuszonego rozpraszania ramanowskiego SRS do opisu zmian biochemicznych i morfologicznych w układach biologicznych. Trudnością tego podejścia jest jednak fakt, że mimo rejestracji sygnału dla wymuszonego rozpraszania ramanowskiego oraz możliwemu dzięki temu krótkiemu czasowi obrazowania otrzymywane są informacje dla pojedynczych liczb falowych. Wymaga to nie tylko dostosowania algorytmów analizy danych, ale również posiadania przesłanek dotyczących zakresu spektralnego w obrębie,

którego spodziewane są zmiany dla badanych układów. Podczas realizacji badań skupiających się na opracowaniu metodologii wykorzystującej spektroskopię ramanowską i znaczniki molekularne do śledzenia procesu różnicowania komórek w kierunku neutrofilii oraz zmian metabolicznych związanych z tym procesem, podjęto się próby wykorzystania obrazowania SRS jako szybkiej i efektywnej alternatywy dla obrazowania opartego na spontanicznym zjawisku rozpraszania ramanowskiego.

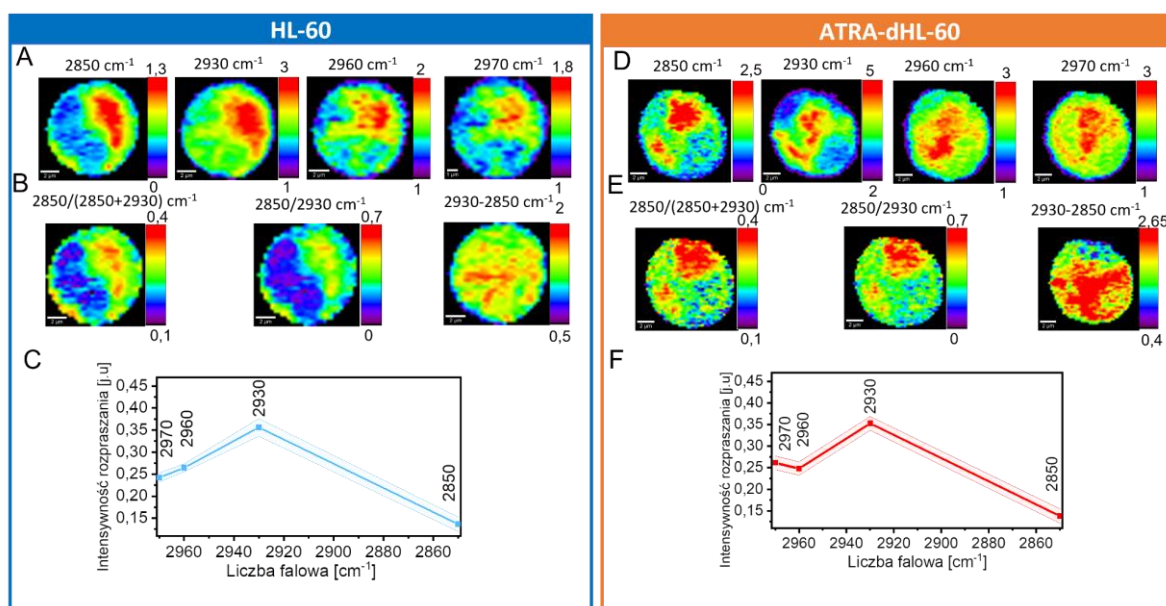
Do spektroskopowej charakterystyki i rozróżniania komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 wykorzystano informacje o intensywności sygnałów SRS rejestrowanych dla liczb falowych 2930, 2850, 3015 cm^{-1} . Sygnał SRS rejestrowany dla 2930 cm^{-1} reprezentuje drgania grup $-\text{CH}_3$ dominujących w białkach, podczas gdy sygnał dla 2850 cm^{-1} reprezentuje drgania rozciągające grup $-\text{CH}_2-$ przypisywane długołańcuchowym lipidom. Dodatkowo, sygnał przy 3015 cm^{-1} , charakterystyczny dla drgań układów olefinowych, potwierdza obecność lipidów nienasyconych. Obecność kropli lipidowych w komórkach HL-60 z wykorzystaniem SRS został opisany przez *Nandakumar i in.* [109], jednak autorzy tej pracy nie odnieśli się do składu obserwowanych kropli. Dodatkowo, podczas badań z użyciem obrazowania SRS komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 zrekonstruowano rozkład w 3D sygnałów drgań $-\text{CH}_3$ dla kilku komórek HL-60 jednocześnie (**Rysunek 47**). Otrzymane obrazy w trójwymiarowy sposób umożliwiają ocenę dystrybucji białek w cytoplazmie i jądrze komórkowym.



Rysunek 47 (A) Obrazy SRS dla wybranych przesunięć ramanowskich 2850, 2930, 3015 cm^{-1} . (B) zrekonstruowany rozkład 3D dla sygnału drgań rozciągających $-\text{CH}_3$ otrzymane w oparciu o konfokalny pomiar obrazów SRS przy 2930 cm^{-1} dla kolejnych równoodległych płaszczyzn ogniskowania obejmujących pełną wysokość komórek oraz (C) pojedyncze obrazy dystrybucji otrzymane dla tych płaszczyzn ogniskowania. Krok pomiarowy dla obrazowania SRS wynosił 0,3 μm w płaszczyźnie xy i 1 μm w z , a czas rejestracji sygnału dla pojedynczego piksela wynosił 900 μs . Pasek skali równy 3 μm .

Obrazowanie SRS białek i lipidów w oparciu o wartości przesunięcia ramanowskiego przy odpowiednio 2930 oraz 2850 cm^{-1} w sposób bezpośredni umożliwia analizę ich zawartości oraz dystrybucji. Pewną trudność narzuca natomiast dobór częstości odpowiedniej do reprezentowania dystrybucji drgań kwasów nukleinowy w zakresie spektralnym drgań rozciągających C-H. W niniejszej pracy podjęto próbę wizualizacji jądra komórkowego

poprzez generowanie obrazów będących wynikiem podejścia ratiometrycznego. Obrazy ratiometryczne dla stosunków intensywności integralnych pasm $I_{2850}/(I_{2850} + I_{2930})$, I_{2850}/I_{2930} wskazują głównie obszary komórek bogate w lipidy ($-CH_2-$). Z kolei obrazy różnicowe ($I_{2930} - I_{2850}$) otrzymane dla komórek HL-60 oraz ATRA-dHL-60 umożliwiły wizualizację pozycji jądra [131,132]. Otrzymane wyniki pokazały jednak, że obszary o wysokiej intensywności sygnału SRS (czerwone) nie do końca odzwierciedlają obszary o niskiej intensywności sygnału (niebieskie), np. w przypadku komórek HL-60 dla obrazów I_{2850}/I_{2930} oraz $I_{2850}/(I_{2850} + I_{2930})$. Te rozbieżności mogą wynikać z różnic w kondensacji chromatyny i intensywności drgań CH_3 wynikających w różnych faz cyklu komórkowego w szczególności, że ATRA prowadzi do zatrzymania cyklu komórek HL-60 w gazie G_0/G_1 (Tabela 6)[132].



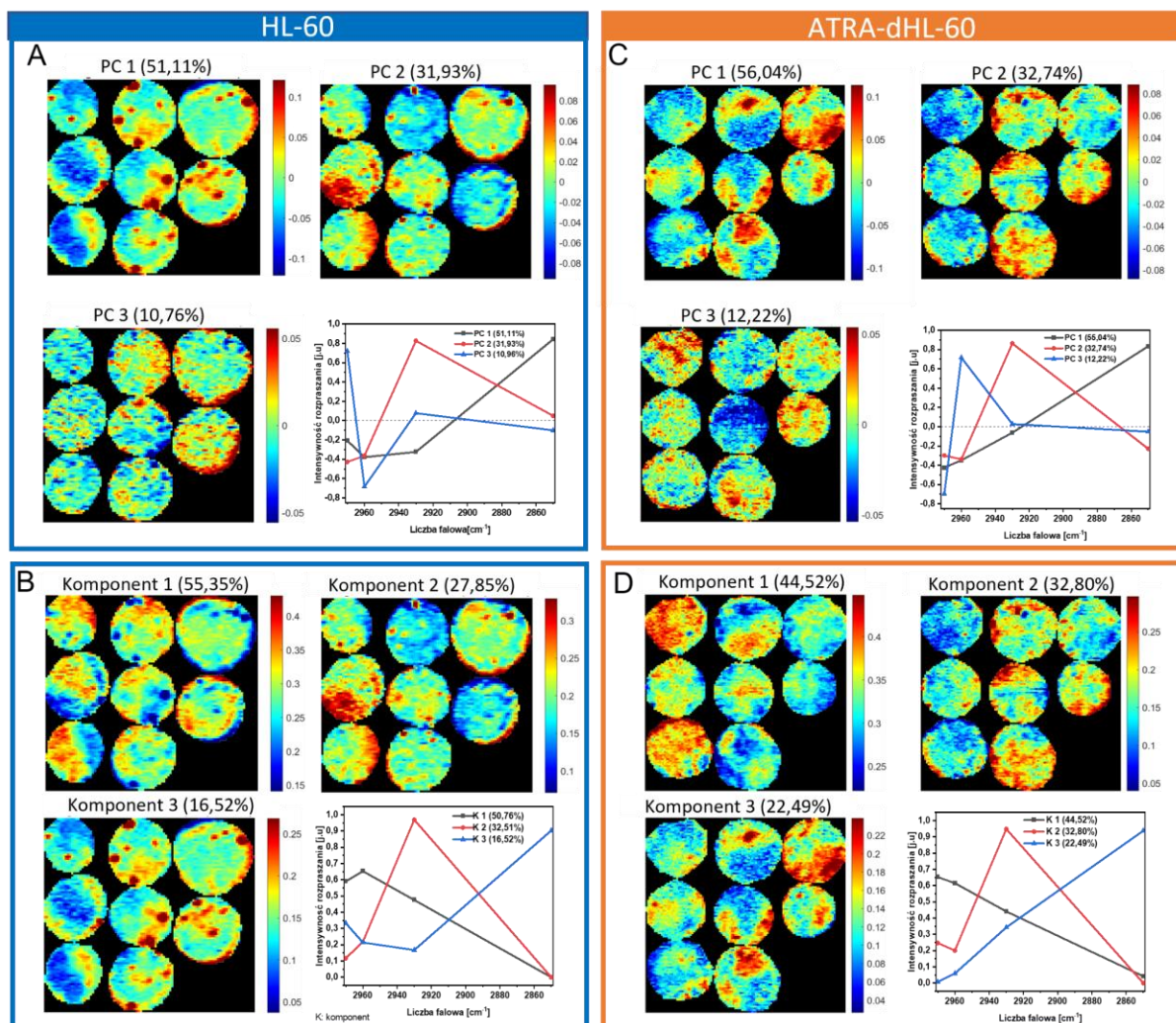
Rysunek 48 (A), (D) Obrazy SRS zebrane dla przesunięć ramanowskich przy 2850, 2930, 2960 i 2970 cm^{-1} wraz ze skalą kolorystyczną odpowiadającą intensywności sygnału SRS oraz (B), (E) obrazy ratiometryczne $I_{2850}/(I_{2850} + I_{2930})$, I_{2850}/I_{2930} oraz różnicowe I_{2850}/I_{2930} . (D), (F) Wykres intensywności sygnału SRS w zależności od wartości przesunięcia chemicznego średnie widma SRS w zakresie drgań rozciągających C-H dla żywych komórek kontrolnych HL-60 (lewy panel) i ATRA-dHL-60 (prawy panel) otrzymane na podstawie obrazów SRS ($N=8$ dla każdej badanej grupy komórek).

Do dalszych badań nad oceną morfologii jądra komórek zróżnicowanych w oparciu o obraz SRS wybrano jako optymalne pasma 2970 i 2960 cm^{-1} . Wybór ten był podyktowany analizą widm standardów białek, lipidów i kwasów nukleinowych (pasma te obecne na profilach spektroskopowych widmach ramanowskich wyizolowanego DNA) oraz na podstawie wyników pracy *F. Lu i in.*, w której autorzy wykazali możliwość śledzenia

dynamiki zmian kształtu jądra wskutek rozkładu DNA w warunkach *in vitro* i *ex vivo* na podstawie obrazów SRS dla I_{2973} , I_{2921} i I_{2851} cm^{-1} poprzez wykorzystanie algorytmu dekompozycji liniowej [133]. Warto jednak pamiętać, że pasma te charakteryzują jednak nie tylko drgania kwasów nukleinowych, ale także innych składników biologicznych, takich jak białka i lipidy [133], co wymaga dekonwolucji wkładu DNA względem innych składników. Średnie czteropunktowe widma SRS komórek HL-60 i ATRA-dHL-60, nie wykazały istotnych różnic w intensywności sygnałów przy 2850 i 2930 cm^{-1} , natomiast intensywność sygnału SRS rejestrowanego dla 2960 i 2970 cm^{-1} spadała w grupie komórek traktowanych różnicowanych wskazując na wpływ ATRA na zmiany w morfologii jądra, kondensacji chromatyny i biosyntezy DNA.

Obserwacje te stanowiły podstawy do podjęcia próby wykorzystania metod chemometrycznych takich jak PCA (**Rysunek 49 A, C**) MCR-ALS (**Rysunek 49 B, D**), w celu identyfikacji zmian wywołanych stymulacją ATRA z użyciem obrazowania SRS. Ponownie, jak w przypadku obrazów ramanowskich rejestrowanych z wykorzystaniem spontanicznego zjawiska rozpraszania oraz znacznika MB, analizowano jednocześnie połączone obrazy kilku komórek w celu identyfikacji cech spektralnych i morfologicznych związanych z daną grupą, a nie tylko pojedynczymi komórkami, które w zależności od cyklu komórkowego mogą się różnić. PCA macierzy 3D otrzymanej na podstawie obrazów SRS otrzymanych dla 2970, 2960, 2930 i 2850 cm^{-1} pozwalała na opis 80% zmienności zarówno dla HL-60 jak i ATRA-dHL-60 z użyciem dwóch pierwszych PC. Wykresy ładunków czynnikowych PC1 opisujące około 50% zmienności danych wskazywały na wyższą intensywność 2850 cm^{-1} dla obrazów SRS komórek ATRA-dHL-60, który obserwowany jest po podatniej części wartości wykresu. Obrazy dystrybucji PC1 zakodowane w skali kolorystycznej wskazują owalne skupiska o wysokiej intensywności (kolor bordowy), które mogą być interpretowane jako krople lipidowe w komórkach HL-60, podczas gdy obrazy dystrybucji PC1 dla ATRA-dHL-60 wskazują obszary o nieregularnym kształcie obejmujących większą część obserwowanej powierzchni. Niższe wartości ładunku czynnikowego PC1 dla 2970 i 2960 cm^{-1} w przypadku obrazów SRS komórek HL-60, jak i jego rozkład (kolor niebieski) wskazywały na większy udział struktur jądra. PC2 w obu przypadkach opisywało około 30% wariacji, a dodatnie wartości wykresu ładunków czynnikowych wskazywały jako istotne na drgania $-\text{CH}_3$ (2930 cm^{-1}) oraz $-\text{CH}_2-$ (2850 cm^{-1}), natomiast ujemne wartości wykresu ładunków czynnikowych PC2 na 2970 i 2960 cm^{-1} . Porównując obrazy dystrybucji PC1 i PC2, obszary o wysokiej intensywności PC2

nie wskazują jednoznacznie swoim kształtem na konkretną strukturę komórkową, jednak mogą być utożsamiane z dystrybucją białek w regionach cytoplazmatycznych. Ogólne tendencje PC3 są znacznie bardziej skomplikowane w interpretacji i w dużym stopniu zależą od obecności w komórkach kropli lipidowych. Powtarzalne jest jednak to, że przesunięcia ramanowskie 2960 i 2970 cm^{-1} znajdują się po przeciwnych stronach ładunków PC3 (**Rysunek 49 A, C**). Obserwowane tendencje wskazują, że PCA jest przydatną metodą w analizie obrazów SRS, jak i w charakterystyce stanu biochemicznego badanego materiału.



Rysunek 49 Analiza PCA obrazów SRS pojedynczych komórek zarejestrowanych przy 2850, 2930, 2960 i 2970 cm^{-1} pokazująca punktację oraz ładunki z wariancją uchwyconych żywych a) komórek grupy kontrolnej HL-60) i c) różnicowanych komórek HL-60 w kierunku neutrofilii za pomocą 1 μM ATRA przez 48 h. Analiza MCR: obrazy punktacji z sumą kwadratów sygnału w stosunku do całkowitego sygnału podane w % i składowe MCR żywych b) niestymulowanych i d) stymulowanych komórek HL-60 z 1 μM ATRA przez 48 h.

Jak wykazano powyżej zastosowanie analizy MCR-ALS sprawdziło się w analizie dystrybucji wybranych składników biochemicznych, jak i oceny morfologii komórek

(Rysunek 49 B, D). Dopasowanie danych w modelu dla poszczególnych komponentów bogatych w kwasy nukleinowe spada po traktowaniu HL-60 1 μ M ATRA, natomiast bogatego w lipidy rośnie dowodząc, że podobne tendencje mogą być opisane wykorzystując analizę MCR już dla 4 wartości przesunięcia ramanowskiego.

3.3. Wnioski

W niniejszej części pracy przedstawiono charakterystykę spektralną oraz przedstawiono wyniki dla opracowanej metody klasyfikacyjnej komórki o fenotypie promielocytów (HL-60) oraz neutrofilii (ATRA-dHL-60), która może być wykorzystana w kontroli jakości linii komórkowej HL-60 oraz weryfikacji efektywności procesu różnicowania komórek. Biorąc pod uwagę fakt, że komórki HL-60 mogą spontanicznie różnicować w kierunku neutrofilii, oraz że ocena dojrzałości komórek jest ważnym elementem diagnostyki białaczek, w tym identyfikacji ostrej białaczki szpikowej uzyskany model oparty na trzech wartościach intensywności integralnej może być z łatwością zastosowany. Proponowana analiza opiera się na ocenie zawartości zredukowanej formy cytochromu c oraz lipidów w odniesieniu do intensywności sygnału reportera ramanowskiego, jakim jest MitoBADY. Wykazano, że 15 minutowa inkubacja badanych komórek z MitoBADY jest wystarczająca do charakterystyki stanu komórek i daje lepsze wartości klasyfikacji niż modele oparte na intensywności pasm pojedynczo 2850, 753 i 2220 cm^{-1} zarówno po 15 min jak i po 30 min. Pomimo, że akumulacja MitoBADY w mitochondriach zależy od potencjału błony mitochondrialnej, który obniża się pod wpływem ATRA, wykazano, że zwiększona akumulacja MitoBADY w ATRA-dHL-60 jest związana ze wzrostem zawartości lipidów. Bardziej szczegółowych informacji o stanie biochemicznym badanych komórek dostarczyła analiza MCR. Potwierdzono również tendencje obserwowane na widmach średnich komórek oraz podczas analizy wartościach intensywności integralnych wybranych pasm. Jako znaczące wykazano przede wszystkim zmiany w obrębie kwasów nukleinowych i morfologii jądra, wzrost zawartości lipidów nienasyconych, spadek intensywności pasma 753 cm^{-1} oraz akumulację kwasu retinowego w strukturach lipidowych. Co więcej przedstawiono potencjał translacji prowadzonych badań na spektroskopowe techniki nieliniowe (spektroskopia SRS) oraz potencjał metod PCA i MCR w analizie obrazów SRS. Wykazano także, że dobór kilku jedynie wartości przesunięcia ramanowskiego rejestrowanych metodą obrazowania SRS jest wystarczający do opisu stanu biochemicznego komórek HL-60 i ATRA-dHL-60.

V. Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa doktorska zgłębia temat rozróżniania i oceny molekularnych podtypów białaczki oraz ich interakcji ze związkami egzogennymi z wykorzystaniem obrazowania ramanowskiego oraz SRS. Materiał badawczy stanowiły modele *in vitro*, w tym komórki zarówno utrwalone, jak i żywe. Badania prowadzone były od podstaw uwzględniając na każdym etapie optymalizację przygotowania materiału, parametrów pomiarowych aż po analizę danych. W przypadku, gdy możliwe było zastosowanie odpowiedniej techniki referencyjnej, wyniki konfrontowano w celu weryfikacji oraz walidacji skuteczności spektroskopii ramanowskiej. Dzięki wsparciu analizy metodami chemometrycznymi opracowano szereg klasyfikatorów o wysokiej czułości i swoistości oraz modeli predykcyjnych, które pozwoliły osiągnąć cele postawione w pracy.

Zweryfikowano hipotezy badawcze określając markery spektroskopowe pozwalające odróżnić widma ramanowskie komórek białaczkowych modelowych układów *in vitro* przynależących do różnych podtypów molekularne BCP-ALL, a w szczególności. blasty z rearanzacją *KMT2A* oraz blasty z obecnością chromosomu *Philadelphia* (fuzja genów *BCR-ABL1*). W części IV.1 części eksperymentalnej przedstawiono zestaw cech charakterystycznych profili spektroskopowych zarówno dla samych linii komórkowych, jak i tych spójnych w obrębie molekularnego podtypu, co jest znaczącym elementem nowości.

Istotnym aspektem poruszonym w podrozdziale IV.2 jest śledzenie metodą obrazowania ramanowskiego interakcji inhibitora kinazy tyrozynowej JAK2 z komórkami w modelowych układach *in vitro* z mutacjami punktowymi JAK2. Wspólne dla obu modeli markery spektroskopowe związane z zmianami stanu biochemicznego i metabolicznego traktowanych lekiem komórek zostały zidentyfikowane.

Ponadto badania spektroskopowe indukowanego różnicowania *in vitro* pod wpływem kwasu *trans*-retinowego komórek ostrej białaczki promieloblastycznej do komórek o fenotypie neutrofilii potwierdziły zmianami morfologicznymi, molekularnymi i metabolicznymi na poziomie subkomórkowym pojedynczych komórek skuteczność badanego procesu. Co więcej, zastosowanie reportera ramanowskiego MitoBADY pozytywnie wpłynęło na klasyfikację z wysoką czułością i swoistością promieloblastów HL-60 oraz komórek o fenotypie neutrofilii.

VI. Bibliografia

- [1] Zbigniew Kęcki, *Podstawy spektroskopii molekularnej*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 1998.
- [2] K. Malek, ed., *Vibrational spectroscopy from theory to practice*, First, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Krakow, 2016.
- [3] Derek A. Long, *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- [4] D. Cialla-May, C. Krafft, P. Rösch, T. Deckert-Gaudig, T. Frosch, I.J. Jahn, S. Pahlow, C. Stiebing, T. Meyer-Zedler, T. Bocklitz, I. Schie, V. Deckert, J. Popp, *Raman Spectroscopy and Imaging in Bioanalytics*, *Anal. Chem.* 94 (2022) 86–119.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03235>.
- [5] J.-X. Cheng, Xiaoliang Sunney Xie, eds., *Coherent Raman Scattering Microscopy*, 1st ed., Taylor & Francis, Boca Raton, 2012. <https://doi.org/10.1201/b12907>.
- [6] K. Brzozowski, E. Matuszyk, A. Pieczara, J. Firlej, A.M. Nowakowska, M. Baranska, *Stimulated Raman Scattering Microscopy in Chemistry and Life Science – Development, Innovation, Perspectives*, *Biotechnol. Adv.* 60 (2022) 108003.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108003>.
- [7] J.-X. Cheng, W. Min, Y. Ozeki, D.B.T.-S.R.S.M. Polli, eds., *Stimulated Raman Scattering Microscopy Techniques and Applications*, in: Elsevier, 2022: pp. i–ii.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85158-9.09990-5>.
- [8] A. Adamczyk, E. Matuszyk, B. Radwan, S. Rocchetti, S. Chlopicki, M. Baranska, *Toward Raman Subcellular Imaging of Endothelial Dysfunction*, *J. Med. Chem.* 64 (2021) 4396–4409.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00051>.
- [9] W.R. Zipfel, R.M. Williams, W.W. Webb, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1369–1377. <https://doi.org/10.1038/nbt899>.
- [10] P. Leszczenko, A. Borek-Doros, A.M. Nowakowska, A. Adamczyk, S. Kashyrskaya, J. Jakubowska, M. Ząbczyńska, A. Pastorczak, K. Ostrowska, M. Baranska, K.M. Marzec, K. Majzner, *Towards Raman-Based Screening of Acute Lymphoblastic Leukemia-Type B (B-ALL) Subtypes*, *Cancers* . 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/cancers13215483>.
- [11] E. Matuszyk, A. Adamczyk, B. Radwan, A. Pieczara, P. Szcześniak, J. Młynarski, K.

- Kamińska, M. Baranska, Multiplex Raman imaging of organelles in endothelial cells, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 255 (2021) 119658. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119658>.
- [12] H. Yamakoshi, A. Palonpon, K. Dodo, J. Ando, S. Kawata, K. Fujita, M. Sodeoka, A sensitive and specific Raman probe based on bisarylbutadiyne for live cell imaging of mitochondria, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 664–667. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.11.080>.
- [13] B. Radwan, A. Adamczyk, S. Tott, K. Czamara, K. Kaminska, E. Matuszyk, M. Baranska, Labeled vs. Label-Free Raman Imaging of Lipids in Endothelial Cells of Various Origins, *Molecules.* 25 (2020) 5752. <https://doi.org/10.3390/molecules25235752>.
- [14] A. Pieczara, E. Matuszyk, P. Szczesniak, J. Mlynarski, M. Baranska, Changes in the mitochondrial membrane potential in endothelial cells can be detected by Raman microscopy, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 286 (2023) 121978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121978>.
- [15] Y. Li, J. Heo, C.K. Lim, A. Pliss, A. V. Kachynski, A.N. Kuzmin, S. Kim, P.N. Prasad, Organelle specific imaging in live cells and immuno-labeling using resonance Raman probe, *Biomaterials.* 53 (2015) 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.056>.
- [16] H. Yamakoshi, K. Dodo, A. Palonpon, J. Ando, K. Fujita, S. Kawata, M. Sodeoka, Alkyne-Tag Raman Imaging for Visualization of Mobile Small Molecules in Live Cells, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 20681–20689. <https://doi.org/10.1021/ja308529n>.
- [17] F. Hu, C. Zeng, R. Long, Y. Miao, L. Wei, Q. Xu, W. Min, Supermultiplexed optical imaging and barcoding with engineered polyynes, *Nat. Methods.* 15 (2018) 194–200. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4578>.
- [18] S. Tian, H. Li, Z. Li, H. Tang, M. Yin, Y. Chen, S. Wang, Y. Gao, X. Yang, F. Meng, J.W. Lauher, P. Wang, L. Luo, Polydiacetylene-based ultrastrong bioorthogonal Raman probes for targeted live-cell Raman imaging, *Nat. Commun.* 11 (2020) 81. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13784-0>.
- [19] H. Yamakoshi, K. Dodo, M. Okada, J. Ando, A. Palonpon, K. Fujita, S. Kawata, M. Sodeoka, Imaging of EdU, an alkyne-tagged cell proliferation probe, by Raman microscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 6102–6105. <https://doi.org/10.1021/ja108404p>.
- [20] B. Radwan, S. Rocchetti, E. Matuszyk, M. Sternak, M. Stodulski, R. Pawlowski, J. Mlynarski, K. Brzozowski, S. Chlopicki, M. Baranska, EdU sensing: The Raman way of following endothelial cell proliferation in vitro and ex vivo, *Biosens. Bioelectron.* 216 (2022) 114624.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114624>.

- [21] T. Asai, H. Liu, Y. Ozeki, S. Sato, T. Hayashi, H. Nakamura, Imaging of cellular uptake of boron cluster compound by stimulated Raman scattering microscopy, *Appl. Phys. Express.* 12 (2019) 112004. <https://doi.org/10.7567/1882-0786/ab4a5d>.
- [22] Z. Chen, D. Paley, L. Wei, A. Weisman, R. Friesner, C. Nuckolls, W. Min, Multicolor Live-Cell Chemical Imaging by Isotopically Edited Alkyne Vibrational Palette, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 8027–8033. <https://doi.org/10.1021/ja502706q>.
- [23] J. Zhang, S. Yan, Z. He, C. Ding, T. Zhai, Y. Chen, H. Li, G. Yang, X. Zhou, P. Wang, Small Unnatural Amino Acid Carried Raman Tag for Molecular Imaging of Genetically Targeted Proteins, *J. Phys. Chem. Lett.* 9 (2018) 4679–4685. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.8b01991>.
- [24] L. Wei, Y. Shen, F. Xu, F. Hu, J.K. Harrington, K.L. Targoff, W. Min, Imaging Complex Protein Metabolism in Live Organisms by Stimulated Raman Scattering Microscopy with Isotope Labeling, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 901–908. <https://doi.org/10.1021/cb500787b>.
- [25] A.N. Kuzmin, A. Pliss, C.K. Lim, J. Heo, S. Kim, A. Rzhetskii, B. Gu, K.T. Yong, S. Wen, P.N. Prasad, Resonance Raman Probes for Organelle-Specific Labeling in Live Cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 28483. <https://doi.org/10.1038/srep28483>.
- [26] K. Czamara, A. Adamczyk, M. Stojak, B. Radwan, M. Baranska, Astaxanthin as a new Raman probe for biosensing of specific subcellular lipidic structures: can we detect lipids in cells under resonance conditions?, *Cell. Mol. Life Sci.* 78 (2021) 3477–3484. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03718-1>.
- [27] C. Zeng, F. Hu, R. Long, W. Min, A ratiometric Raman probe for live-cell imaging of hydrogen sulfide in mitochondria by stimulated Raman scattering, *Analyst.* 143 (2018) 4844–4848. <https://doi.org/10.1039/C8AN00910D>.
- [28] W.J. Tipping, L.T. Wilson, S.K. Blaseio, N.C.O. Tomkinson, K. Faulds, D. Graham, Ratiometric sensing of fluoride ions using Raman spectroscopy, *Chem. Commun.* 56 (2020) 14463–14466. <https://doi.org/10.1039/D0CC05939K>.
- [29] L.T. Wilson, W.J. Tipping, C. Wetherill, Z. Henley, K. Faulds, D. Graham, S.P. Mackay, N.C.O. Tomkinson, Mitokyne: A Ratiometric Raman Probe for Mitochondrial pH, *Anal. Chem.* 93 (2021) 12786–12792. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03075>.
- [30] H.J. Braddick, W.J. Tipping, L.T. Wilson, H.S. Jaconelli, E.K. Grant, K. Faulds, D. Graham, N.C.O. Tomkinson, Determination of Intracellular Esterase Activity Using Ratiometric Raman Sensing and Spectral Phasor Analysis, *Anal. Chem.* 95 (2023) 5369–5376.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05708>.

- [31] R. Brereton, *Applied Chemometrics for Scientists*, John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- [32] O. Matthias, *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Third, Wiley-VCH Verlag, 2017.
- [33] J. Miller, James; Miller, *Statystyka i chemometria w chemii analitycznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2016.
- [34] R. Gautam, S. Vanga, F. Ariese, S. Umapathy, Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy, *EPJ Tech. Instrum.* 2 (2015) 8. <https://doi.org/10.1140/epjti/s40485-015-0018-6>.
- [35] O. Ryabchykov, J. Popp, T. Bocklitz, Fusion of MALDI Spectrometric Imaging and Raman Spectroscopic Data for the Analysis of Biological Samples, *Front. Chem.* 6 (2018) 257. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00257>.
- [36] A. Martyna, A. Menzyk, A. Damin, A. Michalska, G. Martra, E. Alladio, G. Zadora, Improving discrimination of Raman spectra by optimising preprocessing strategies on the basis of the ability to refine the relationship between variance components, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 202 (2020) 104029. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104029>.
- [37] E.R.K. Neo, Z. Yeo, J.S.C. Low, V. Goodship, K. Debattista, A review on chemometric techniques with infrared, Raman and laser-induced breakdown spectroscopy for sorting plastic waste in the recycling industry, *Resour. Conserv. Recycl.* 180 (2022) 106217. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106217>.
- [38] H.G. Yu, D.J. Park, D.E. Chang, H. Nam, An Effective Baseline Correction Algorithm Using Broad Gaussian Vectors for Chemical Agent Detection with Known Raman Signature Spectra, *Sensors.* 21 (2021) 8260. <https://doi.org/10.3390/s21248260>.
- [39] K.H. Liland, A. Kohler, N.K. Afseth, Model-based pre-processing in Raman spectroscopy of biological samples, *J. Raman Spectrosc.* 47 (2016) 643–650. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.4886>.
- [40] T.M. James, M. Schlösser, R.J. Lewis, S. Fischer, B. Bornschein, H.H. Telle, Automated Quantitative Spectroscopic Analysis Combining Background Subtraction, Cosmic Ray Removal, and Peak Fitting, *Appl. Spectrosc.* 67 (2013) 949–959. <https://doi.org/10.1366/12-06766>.
- [41] L. Jamieson, J. Greaves, J. Mclellan, K. Munro, N. Tomkinson, L. Chamberlain, K. Faulds, D.

- Graham, Tracking intracellular uptake and localisation of alkyne tagged fatty acids using Raman spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 197 (2018) 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.01.064>.
- [42] E. Bik, J. Orleanska, L. Mateuszuk, M. Baranska, K. Majzner, S. Chlopicki, Raman and fluorescence imaging of phospholipidosis induced by cationic amphiphilic drugs in endothelial cells, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1869 (2022) 119186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119186>.
- [43] K. Czamara, K. Majzner, M. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, Raman spectroscopy of lipids: A review, *J. Raman Spectrosc.* 46 (2014) 4–20. <https://doi.org/10.1002/jrs.4607>.
- [44] A. Rygula, K. Majzner, K.M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, M. Baranska, Raman spectroscopy of proteins: a review, *J. Raman Spectrosc.* 44 (2013) 1061–1076. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.4335>.
- [45] H.R. Adams, C. Krewson, J.E. Vardanega, S. Fujii, T. Moreno, Chicano, Y. Sambongi, D. Svistunenko, J. Paps, C.R. Andrew, M.A. Hough, One fold, two functions: cytochrome P460 and cytochrome c'- β from the methanotroph *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Chem. Sci.* 10 (2019) 3031–3041. <https://doi.org/10.1039/C8SC05210G>.
- [46] J.W. Chan, D.S. Taylor, T. Zwerdling, S.M. Lane, K. Ihara, T. Huser, Micro-Raman Spectroscopy Detects Individual Neoplastic and Normal Hematopoietic Cells, *Biophys. J.* 90 (2006) 648–656. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066761>.
- [47] A. Rygula, M.Z. Pacia, L. Mateuszuk, A. Kaczor, R.B. Kostogryś, S. Chlopicki, M. Baranska, Identification of a biochemical marker for endothelial dysfunction using Raman spectroscopy, *Analyst.* 140 (2015) 2185–2189. <https://doi.org/10.1039/C4AN01998A>.
- [48] A. Borek-Doros, A.M. Nowakowska, P. Leszczenko, A. Adamczyk, A. Pieczara, J. Jakubowska, A. Pastorczak, K. Ostrowska, M. Ząbczyńska, K. Sowinski, W.I. Gruszecki, M. Baranska, K.M. Marzec, K. Majzner, Raman-based spectrophotyping of the most important cells of the immune system, *J. Adv. Res.* 41 (2022) 191–203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.013>.
- [49] Using Cross-Validation, (n.d.). https://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Using_Cross-Validation (accessed February 12, 2023).
- [50] F. Bonnier, H.J. Byrne, Understanding the molecular information contained in principal component analysis of vibrational spectra of biological systems, *Analyst.* 137 (2012) 322–332. <https://doi.org/10.1039/c1an15821j>.

- [51] H.-J. van Manen, Y.M. Kraan, D. Roos, C. Otto, Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 10159–10164. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0502746102>.
- [52] D. Chicco, G. Jurman, The advantages of the Matthews correlation coefficient (MCC) over F1 score and accuracy in binary classification evaluation, *BMC Genomics*. 21 (2020) 6. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6413-7>.
- [53] D. Perez-Guaita, G. Quintas, Z. Farhane, R. Tauler, H.J. Byrne, Data mining Raman microspectroscopic responses of cells to drugs in vitro using multivariate curve resolution-alternating least squares, *Talanta*. 208 (2020) 120386. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120386>.
- [54] A. de Juan, J. Jaumot, R. Tauler, Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem, *Anal. Methods*. 6 (2014) 4964–4976. <https://doi.org/10.1039/C4AY00571F>.
- [55] N.B. Gallagher, J.M. Shaver, E.B. Martin, J. Morris, B.M. Wise, W. Windig, Curve resolution for multivariate images with applications to TOF-SIMS and Raman, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 73 (2004) 105–117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.04.003>.
- [56] V. Notarstefano, A. Belloni, P. Mariani, G. Orilisi, G. Orsini, E. Giorgini, H.J. Byrne, Multivariate curve Resolution-Alternating least squares coupled with Raman microspectroscopy: new insights into the kinetic response of primary oral squamous carcinoma cells to cisplatin, *Analyst*. 148 (2023) 4365–4372. <https://doi.org/10.1039/D3AN01182H>.
- [57] R.W. Horobin, 9 - How histological stains work, in: S.K. Suvarna, C. Layton, J.D.B.T.-B.T. and P. of H.T. (Seventh E. Bancroft (Eds.), Churchill Livingstone, Oxford, 2013: pp. 157–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4226-3.00009-3>.
- [58] J.D. Bancroft, C. Layton, 10 - The hematoxylin and eosin, in: S.K. Suvarna, C. Layton, J.D.B.T.-B.T. and P. of H.T. (Seventh E. Bancroft (Eds.), Churchill Livingstone, Oxford, 2013: pp. 173–186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4226-3.00010-X>.
- [59] R.W. Horobin, How Romanowsky stains work and why they remain valuable — including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme, *Biotech. Histochem.* 86 (2011) 36–51. <https://doi.org/10.3109/10520295.2010.515491>.
- [60] G.M. Litwin Jan, Postawy technik mikroskopowych, in: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2011: pp. 49–80.
- [61] Podręcznik użytkownika: 101424 May-Grünwald’s eosine-methylene blue solution modified for microscopy, (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/mm/1.01424> (accessed

February 16, 2023).

- [62] A.N. Aldona Kaczmarek, Tatsua Osawa, Ewa Leporowska, Rola i miejsce cytometrii przepływowowej w diagnostyce klinicznej, *Współczesna Onkol.* 6 (2002) 366–373.
- [63] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, A. Nalbant, Flow cytometry: basic principles and applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* 37 (2017) 163–176.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>.
- [64] A.C. Rawstron, K.-A. Kreuzer, A. Soosapilla, M. Spacek, O. Stehlikova, P. Gambell, N. McIver-Brown, N. Villamor, K. Psarra, M. Arroz, R. Milani, J. de la Serna, M.T. Cedena, O. Jaksic, J. Nomdedeu, C. Moreno, G.M. Rigolin, A. Cuneo, P. Johansen, H.E. Johnsen, R. Rosenquist, C.U. Niemann, W. Kern, D. Westerman, M. Trneny, S. Mulligan, M. Doubek, S. Pospisilova, P. Hillmen, D. Oscier, M. Hallek, P. Ghia, E. Montserrat, Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) \& European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project, *Cytom. Part B Clin. Cytom.* 94 (2018) 121–128.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cyto.b.21595>.
- [65] Nobel Prize in Chemistry 2022, (2022).
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/press-release/> (accessed April 10, 2023).
- [66] N. Baumgarth, M. Roederer, A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping, *J. Immunol. Methods.* 243 (2000) 77–97.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00229-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00229-5).
- [67] E. Laurenti, B. Göttgens, From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes., *Nature.* 553 (2018) 418–426. <https://doi.org/10.1038/nature25022>.
- [68] C.J. Eaves, Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality, *Blood.* 125 (2015) 2605–2613. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>.
- [69] R.A. Nimmo, G.E. May, T. Enver, Primed and ready: understanding lineage commitment through single cell analysis, *Trends Cell Biol.* 25 (2015) 459–467.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.04.004>.
- [70] S. Watcham, I. Kucinski, B. Gottgens, New insights into hematopoietic differentiation landscapes from single-cell RNA sequencing, *Blood.* 133 (2019) 1415–1426.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-835355>.
- [71] Sawicki Wojciech, *Histologia, IV*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2005.

- [72] F. Malard, M. Mohty, Acute lymphoblastic leukaemia, *Lancet*. 395 (2020) 1146–1162. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1).
- [73] J. Cortes, C. Pavlovsky, S. Saußebe, Chronic myeloid leukaemia, *Lancet*. 398 (2021) 1914–1926. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01204-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01204-6).
- [74] G. Egan, A.D. Schimmer, Contribution of metabolic abnormalities to acute myeloid leukemia pathogenesis, *Trends Cell Biol.* 33 (2022) 455–462. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.11.004>.
- [75] M.T.S. Bertilaccio, C. Scielzo, M. Muzio, F. Caligaris-Cappio, An overview of chronic lymphocytic leukaemia biology, *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 23 (2010) 21–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.beha.2009.12.005>.
- [76] C. Schwab, C.J. Harrison, Advances in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Genomics, *HemaSphere*. 2 (2018) e53–e53. <https://doi.org/10.1097/HS9.000000000000053>.
- [77] N.A. Migita, P.Y. Jotta, N. Paiva do Nascimento, V.S. Vasconcelos, G.L. Centoducatte, K.B. Massirer, A. Cardoso de Azevedo, S.R. Brandalise, J.A. Yunes, Classification and genetics of pediatric B-other Acute Lymphoblastic Leukemia by targeted RNA-sequencing, *Blood Adv.* (2023). <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009179>.
- [78] I. Aldoss, D. Douer, V. Pullarkat, Therapy-related acute lymphoblastic leukemia: Where do we stand with regards to its definition and characterization?, *Blood Rev.* 37 (2019) 100584. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.06.001>.
- [79] O. Britten, D. Ragusa, S. Tosi, Y. Mostafa Kamel, MLL-Rearranged Acute Leukemia with t(4;11)(q21;q23)—Current Treatment Options. Is There a Role for CAR-T Cell Therapy?, *Cells*. 8 (2019) 1341. <https://doi.org/10.3390/cells8111341>.
- [80] J. Wen, M. Zhou, Y. Shen, Y. long, Y. Guo, L. Song, J. Xiao, Poor treatment responses were related to poor outcomes in pediatric B cell acute lymphoblastic leukemia with KMT2A rearrangements, *BMC Cancer*. 22 (2022) 859. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09804-w>.
- [81] I. Nilson, K. Löchner, G. Siegler, J. Greil, J.D. Beck, G.H. Fey, R. Marschalek, Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias., *Br. J. Haematol.* 93 (1996) 966–972. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1748.x>.
- [82] D.I. Marks, A. V Moorman, L. Chilton, E. Paietta, A. Enshaie, G. DeWald, C.J. Harrison, A.K. Fielding, L. Foroni, A.H. Goldstone, M.R. Litzow, S.M. Luger, A.K. McMillan, J. Racevskis, J.M. Rowe, M.S. Tallman, P. Wiernik, H.M. Lazarus, The clinical characteristics, therapy and

- outcome of 85 adults with acute lymphoblastic leukemia and t(4;11)(q21;q23)/MLL-AFF1 prospectively treated in the UKALLXII/ECOG2993 trial, *Haematologica*. 98 (2013) 945–952. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.081877>.
- [83] A.C. Winters, K.M. Bernt, MLL-Rearranged Leukemias—An Update on Science and Clinical Approaches, *Front. Pediatr.* 5 (2017). <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00004>.
- [84] M.O. Forgione, B.J. McClure, L.N. Eadie, D.T. Yeung, D.L. White, KMT2A rearranged acute lymphoblastic leukaemia: Unravelling the genomic complexity and heterogeneity of this high-risk disease, *Cancer Lett.* 469 (2020) 410–418. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.005>.
- [85] K.G. Roberts, C.G. Mullighan, The Biology of B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 10 (2020) a034835. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034835>.
- [86] J.L. Kamens, S. Nance, C. Koss, B. Xu, A. Cotton, J.W. Lam, E.A.R. Garfinkle, P. Nallagatla, A.M.R. Smith, S. Mitchell, J. Ma, D. Currier, W.C. Wright, K. Kavdia, V.R. Pagala, W. Kim, L.M. Wallace, J.-H. Cho, Y. Fan, A. Seth, N. Twarog, J.K. Choi, E.A. Obeng, M.E. Hatley, M.L. Metzger, H. Inaba, S. Jeha, J.E. Rubnitz, J. Peng, T. Chen, A.A. Shelat, R.K. Guy, T.A. Gruber, Proteasome inhibition targets the KMT2A transcriptional complex in acute lymphoblastic leukemia, *Nat. Commun.* 14 (2023) 809. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36370-x>.
- [87] A. Quintás-Cardama, H. Kantarjian, J. Cortes, Flying under the radar: the new wave of BCR–ABL inhibitors, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 834–848. <https://doi.org/10.1038/nrd2324>.
- [88] R. Ren, Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia, *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 172–183. <https://doi.org/10.1038/nrc1567>.
- [89] F. Rossari, F. Minutolo, E. Orciuolo, Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy, *J. Hematol. Oncol.* 11 (2018) 84. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0624-2>.
- [90] Rux-cALL-Pol 2020 trial, (n.d.). <https://call-pol.umed.pl/rux-all2019-trial-in-poland/> (accessed September 20, 2023).
- [91] J. Kołodrubiec, M. Kozłowska, N. Irga-Jaworska, Ł. Sędek, A. Pastorczak, J. Trelńska, W. Młynarski, Efficacy of ruxolitinib in acute lymphoblastic leukemia: A systematic review, *Leuk. Res.* 121 (2022) 106925. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.leukres.2022.106925>.
- [92] C.G. Mullighan, J. Zhang, R.C. Harvey, J.R. Collins-Underwood, B.A. Schulman, L.A.

- Phillips, S.K. Tasian, M.L. Loh, X. Su, W. Liu, M. Devidas, S.R. Atlas, I.-M. Chen, R.J. Clifford, D.S. Gerhard, W.L. Carroll, G.H. Reaman, M. Smith, J.R. Downing, S.P. Hunger, C.L. Willman, JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 9414–9418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811761106>.
- [93] C.E.J. Downes, B.J. McClure, D.P. McDougal, S.L. Heatley, J.B. Bruning, D. Thomas, D.T. Yeung, D.L. White, JAK2 Alterations in Acute Lymphoblastic Leukemia: Molecular Insights for Superior Precision Medicine Strategies, *Front. Cell Dev. Biol.* 10 (2022) 942053. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.942053>.
- [94] D.S. Aaronson, C.M. Horvath, A road map for those who don't know JAK-STAT., *Science*. 296 (2002) 1653–1655. <https://doi.org/10.1126/science.1071545>.
- [95] Drug Bank Online, Ruxolitinib, (n.d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB08877> (accessed February 23, 2023).
- [96] J. Mascarenhas, R. Hoffman, Ruxolitinib: The First FDA Approved Therapy for the Treatment of Myelofibrosis, *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 3008–3014. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3145>.
- [97] A.S. Tsiftoglou, I.S. Pappas, I.S. Vizirianakis, Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells, *Pharmacol. Ther.* 100 (2003) 257–290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.09.002>.
- [98] M. Blanter, M. Gouwy, S. Struyf, Studying Neutrophil Function in vitro: Cell Models and Environmental Factors, *J. Inflamm. Res.* 14 (2021) 141–162. <https://doi.org/10.2147/JIR.S284941>.
- [99] J.G. Lieber, S. Webb, B.T. Suratt, S.K. Young, G.L. Johnson, G.M. Keller, G.S. Worthen, The in vitro production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells, *Blood*. 103 (2004) 852–859. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1030>.
- [100] R. Tasseff, H.A. Jensen, J. Congleton, D. Dai, K. V Rogers, A. Sagar, R.P. Bunaciu, A. Yen, J.D. Varner, An Effective Model of the Retinoic Acid Induced HL-60 Differentiation Program, *Sci. Rep.* 7 (2017) 14327. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14523-5>.
- [101] F. Mollinedo, R. López-Pérez, C. Gajate, Differential gene expression patterns coupled to commitment and acquisition of phenotypic hallmarks during neutrophil differentiation of human leukaemia HL-60 cells, *Gene*. 419 (2008) 16–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.04.015>.
- [102] X. Cheng, H. Liang, Q. Li, J. Wang, J. Liu, Y. Zhang, Y. Ru, Y. Zhou, Raman spectroscopy

- differ leukemic cells from their healthy counterparts and screen biomarkers in acute leukemia, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 281 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121558>.
- [103] J.W. Chan, D.S. Taylor, S.M. Lane, T. Zwerdling, J. Tuscano, T. Huser, Nondestructive identification of individual leukemia cells by laser trapping raman spectroscopy, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2180–2187. <https://doi.org/10.1021/ac7022348>.
- [104] A.M. da Silva, F. de Siqueira E Oliveira, P.L. de Brito, L. Silveira, Spectral model for diagnosis of acute leukemias in whole blood and plasma through Raman spectroscopy, *J. Biomed. Opt.* 23 (2018) 107002. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.23.10.107002>.
- [105] S. Managò, C. Valente, P. Mirabelli, D. Circolo, F. Basile, D. Corda, A.C. De Luca, A reliable Raman-spectroscopy-based approach for diagnosis, classification and follow-up of B-cell acute lymphoblastic leukemia, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24821. <https://doi.org/10.1038/srep24821>.
- [106] S. Managò, C. Valente, P. Mirabelli, A.C. De Luca, Discrimination and classification of acute lymphoblastic leukemia cells by Raman spectroscopy, *Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng.* 9506 (2015). <https://doi.org/10.1117/12.2179486>.
- [107] S.K. Paidi, P. Raj, R. Bordett, C. Zhang, S.H. Karandikar, R. Pandey, I. Barman, Reagent-free Raman and quantitative phase imaging offer a unique morpho-molecular platform for recognition of malignancy and stages of B-cell acute lymphoblastic leukemia, *Biosens. Bioelectron.* 190 (2021) 113403. <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.428006>.
- [108] Y. Zhao, Y. Zhang, X. Liang, S. Liu, X. Cao, N. Chen, Z. Chen, J. Yan, Monitoring the differentiation of dimethyl sulfoxide-induced human leukemia (HL-60) cells by Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 52 (2021) 1086–1094.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.6122>.
- [109] P. Nandakumar, A. Kovalev, A. Volkmer, Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy, *New J. Phys.* 11 (2009) 33026. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/3/033026>.
- [110] S. Fornasaro, A. Bonifacio, E. Marangon, M. Buzzo, G. Toffoli, T. Rindzevicius, M.S. Schmidt, V. Sergo, Label-Free Quantification of Anticancer Drug Imatinib in Human Plasma with Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12670–12677.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02901>.
- [111] E.-O. Ganbold, J.K. Byun, S.Y. Lee, S.-W. Joo, Raman spectroscopy of combinatory anticancer drug release from gold nanoparticles inside a single leukemia cell, *J. Raman*

- Spectrosc. 44 (2013) 675–679. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.4266>.
- [112] D. Fu, J. Zhou, W.S. Zhu, P.W. Manley, Y.K. Wang, T. Hood, A. Wylie, X.S. Xie, Imaging the intracellular distribution of tyrosine kinase inhibitors in living cells with quantitative hyperspectral stimulated Raman scattering, *Nat. Chem.* 6 (2014) 614–622. <https://doi.org/10.1038/nchem.1961>.
- [113] R. Mojidra, A. Hole, K. Iwasaki, H. Noothalapati, T. Yamamoto, M.K. C, R. Govekar, DNA Fingerprint Analysis of Raman Spectra Captures Global Genomic Alterations in Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia: A Potential Single Assay for Screening Imatinib Resistance, *Cells.* 10 (2021) 2506. <https://doi.org/10.3390/cells10102506>.
- [114] K. Sepp, M. Lee, M.T.J. Bluntzer, G.V. Helgason, A.N. Hulme, V.G. Brunton, Utilizing Stimulated Raman Scattering Microscopy To Study Intracellular Distribution of Label-Free Ponatinib in Live Cells, *J. Med. Chem.* 63 (2020) 2028–2034. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01546>.
- [115] A. Feizpour, T. Marstrand, L. Bastholm, S. Eirefelt, C.L. Evans, Label-Free Quantification of Pharmacokinetics in Skin with Stimulated Raman Scattering Microscopy and Deep Learning, *J. Invest. Dermatol.* 141 (2021) 395–403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.06.027>.
- [116] C. Stiebing, T. Meyer, I. Rimke, C. Matthäus, M. Schmitt, S. Lorkowski, J. Popp, Real-time Raman and SRS imaging of living human macrophages reveals cell-to-cell heterogeneity and dynamics of lipid uptake, *J. Biophotonics.* 10 (2017) 1217–1226. <https://doi.org/10.1002/jbio.201600279>.
- [117] Y. Suzuki, K. Kobayashi, Y. Wakisaka, D. Deng, S. Tanaka, C.J. Huang, C. Lei, C.W. Sun, H. Liu, Y. Fujiwaki, S. Lee, A. Isozaki, Y. Kasai, T. Hayakawa, S. Sakuma, F. Arai, K. Koizumi, H. Tezuka, M. Inaba, K. Hiraki, T. Ito, M. Hase, S. Matsusaka, K. Shiba, K. Suga, M. Nishikawa, M. Jona, Y. Yatomi, Y. Yalikul, Y. Tanaka, T. Sugimura, N. Nitta, K. Goda, Y. Ozeki, Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 15842–15848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902322116>.
- [118] C. Krafft, Raman Spectroscopy of Proteins and Nucleic Acids: From Amino Acids and Nucleotides to Large Assemblies, in: *Encycl. Anal. Chem.*, 2018: pp. 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9611>.
- [119] N. Huang, M. Short, J. Zhao, H. Wang, H. Lui, M. Korbelik, H. Zeng, Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model, *Opt. Express.* 19 (2011)

- 22892–22909. <https://doi.org/10.1364/OE.19.022892>.
- [120] E. Wiercigroch, E. Szafraniec, K. Czamara, M.Z. Pacia, K. Majzner, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, K. Malek, Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 185 (2017) 317–335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>.
- [121] A.J. Ruiz-Chica, M.A. Medina, F. Sánchez-Jiménez, F.J. Ramírez, Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guanine–cytosine and adenine–thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine, *J. Raman Spectrosc.* 35 (2004) 93–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.1107>.
- [122] R. Ulloa, O. Corrales, F. Cabrera-Reyes, J. Jara-Wilde, J.J. Saez, C. Rivas, J. Lagos, S. Härtel, C. Quiroga, M.-I. Yuseff, J. Diaz-Muñoz, B Cells Adapt Their Nuclear Morphology to Organize the Immune Synapse and Facilitate Antigen Extraction, *Front. Immunol.* 12 (2022) 801164. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.801164>.
- [123] Class Centroid Centering, (n.d.). <https://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Classcentroid> (accessed January 30, 2023).
- [124] O. Weigert, A.A. Lane, L. Bird, N. Kopp, B. Chapuy, D. van Bodegom, A. V Toms, S. Marubayashi, A.L. Christie, M. McKeown, R.M. Paranal, J.E. Bradner, A. Yoda, C. Gaul, E. Vangrevelinghe, V. Romanet, M. Murakami, R. Tiedt, N. Ebel, E. Evrot, A. De Pover, C.H. Régnier, D. Erdmann, F. Hofmann, M.J. Eck, S.E. Sallan, R.L. Levine, A.L. Kung, F. Baffert, T. Radimerski, D.M. Weinstock, Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition., *J. Exp. Med.* 209 (2012) 259–273. <https://doi.org/10.1084/jem.20111694>.
- [125] M. Bylesjö, M. Rantalainen, O. Cloarec, J.K. Nicholson, E. Holmes, J. Trygg, OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification, *J. Chemom.* 20 (2006) 341–351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cem.1006>.
- [126] S. Wiklund, E. Johansson, L. Sjöström, E.J. Mellerowicz, U. Edlund, J.P. Shockcor, J. Gottfries, T. Moritz, J. Trygg, Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models, *Anal. Chem.* 80 (2008) 115–122. <https://doi.org/10.1021/ac0713510>.
- [127] H. Abramczyk, A. Imiela, B. Brożek-Płuska, M. Kopeć, J. Surmacki, A. Śliwińska, Aberrant Protein Phosphorylation in Cancer by Using Raman Biomarkers., *Cancers (Basel)*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11122017>.

- [128] S. Managò, C. Valente, P. Mirabelli, D. Circolo, F. Basile, D. Corda, A.C. De Luca, A reliable Raman-spectroscopy-based approach for diagnosis, classification and follow-up of B-cell acute lymphoblastic leukemia, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24821. <https://doi.org/10.1038/srep24821>.
- [129] W. Windig, M.R. Keenan, Angle-Constrained Alternating Least Squares, *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 349–357. <https://doi.org/10.1366/10-06139>.
- [130] K. Bae, W. Zheng, Y. Ma, Z. Huang, Real-Time Monitoring of Pharmacokinetics of Mitochondria-Targeting Molecules in Live Cells with Bioorthogonal Hyperspectral Stimulated Raman Scattering Microscopy, *Anal. Chem.* 92 (2020) 740–748. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02838>.
- [131] B. Sarri, R. Canonge, X. Audier, E. Simon, J. Wojak, F. Caillol, C. Cador, D. Marguet, F. Poizat, M. Giovannini, H. Rigneault, Fast stimulated Raman and second harmonic generation imaging for intraoperative gastro-intestinal cancer detection, *Sci. Rep.* 9 (2019) 10052. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46489-x>.
- [132] T. Guerrenne-Del Ben, Z. Rajaofara, V. Couderc, V. Sol, H. Kano, P. Leproux, J.-M. Petit, Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering highlights state of chromatin condensation in CH region., *Sci. Rep.* 9 (2019) 13862. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50453-0>.
- [133] F.-K. Lu, S. Basu, V. Igras, M.P. Hoang, M. Ji, D. Fu, G.R. Holtom, V.A. Neel, C.W. Freudiger, D.E. Fisher, X.S. Xie, Label-free DNA imaging in vivo with stimulated Raman scattering microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 11624–11629. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515121112>.

Spis ilustracji

Rysunek 1 Zakresy promieniowania elektromagnetycznego stosowanego w technikach spektroskopowych oraz badane przejścia.....	9
Rysunek 2 Ideowy schemat rozpraszania promieniowania przez cząsteczkę benzenu (lewa część) i uproszczony diagram poziomów energetycznych z zaznaczonymi rozpraszaniem Rayleigha, ramanowskim stokesowskim i antystokesowskimi.....	11
Rysunek 3. Schematy diagramu energetycznego ilustrujący pre-rezonansowe i rezonansowe rozpraszanie ramanowskie oraz fluorescencję. Zakrzywione strzałki odpowiadają bezpromienistemu rozproszeniu energii.....	12
Rysunek 4 Schemat diagramu energetycznego przejść w SRS (A) oraz schemat detekcji sygnału na przykładzie pomiaru ubytku intensywności wiązki pompującej (B). Schemat diagramu energetycznego wraz z detekcją w metodzie CARS (C).....	15
Rysunek 5 Schemat działania mikroskopu konfokalnego (A). Iluminacja punktowa (B) i liniowa (B) wykorzystywane w obrazowaniu ramanowskim.....	17
Rysunek 6 Wzór 5-etynylo-2'-deoksyurydyny (EdU) (A), MitoBADY (B) i falkarinolu (C) wraz z widmami ramanowskimi ich roztworów o stężeniu 10 g/l w DMSO (A, B) i etanolu (C). Pasma rozpuszczalnika zaznaczono gwiazdką. Obrazy dystrybucji reporterów ramanowskich dla reprezentacyjnej komórki linii komórkowej HMEC-1 inkubowanej z 20 μ M EdU przez 24h, 400 nM MitoBADY przez 2h i 50 μ M falkarinolu przez 2 h otrzymano poprzez integrację pasm w zakresie spektralnym 2136-2106 cm^{-1} (EdU), 2236-2206 cm^{-1} (MitoBADY), 2270-2250 cm^{-1} (falkarinol) (D). Średnie widma ramanowskie obszaru cytoplazmy (niebieskie widmo) i jądra (czerwone widmo) (E). Pomiaru komórek dokonywano z czasem integracji 0,5 s i krokiem 0,5 μ m, roztwory badanych reporterów mierzono z czasem integracji 1s i 25 akumulacjami. Moc lasera mierzona przed obiektywem wynosiła 20 mW. Rysunek przedrukowany z [11].	20
Rysunek 7 Dystrybucja lipidów w komórce śródbłonna linii komórkowej HMEC-1 inkubowanej z 10 μ M AXT przez 3 h. Obraz mikroskopowy (A) oraz ramanowski dla drgań C-H rozciągających (B) uzyskany przez integrację pasm w zakresie spektralnym 3030-2830 cm^{-1} obrazując dystrybucję materii organicznej, lipidów (C, E) w zakresie 2900-2830 cm^{-1} i AXT w zakresie 1595-1545 cm^{-1} (D, F) mierzone przy odpowiednio niskiej (~ 3 mW) i wysokiej (~ 30 mW) mocy lasera. Pojedyncze widma ramanowskie (G) kropli lipidowej uzyskane przy niskiej i wysokiej mocy lasera (widmo z punktu zaznaczonego zieloną strzałką na B). Obrazowanie ramanowskie przeprowadzono z wykorzystaniem lasera o długości wzbudzenia 532 nm oraz dla czasu akwizycji pojedynczego widma 0,5 s i kroku 0,5 μ m. Obraz przedrukowano z referencji [26].....	25
Rysunek 8 Reportery ramanowskie do detekcji (A) H_2S , (B) pH oraz (C) aktywności enzymatycznej estraz.....	26

Rysunek 9 Schemat miar odległości (A) euklidesowej i (B) miejskiej. Graficzne przedstawienie hierarchicznej analizy skupień metodą (C) aglomeracyjną, (B) podziału oraz metod określania podobieństwa (E-H).	33
Rysunek 10 Graficzna ilustracja algorytmu KMCA.....	34
Rysunek 11 (A) Schematyczne przedstawienie PCA w postaci macierzowej. (B) Schemat SVD jako metody rozkładu macierzy.	35
Rysunek 12 Metody wyboru optymalnej liczby głównych składowych na podstawie (A) procentu całkowitej wariancji opisywanej przez kolejne główne składowe (B) testu Scree połączonego ze sprawdzianem krzyżowym (CV). Graficzne przedstawienie typów sprawdzianu krzyżowego: losowego, n-krotnego, Venetian blinds oraz leave-one-out.	36
Rysunek 13 Przykładowy wynik PCA: (A) wykres przebiegu wartości czynników trzech pierwszych głównych składowych oraz(B) wykres ładunków czynnikowych dla składowej PC2.	37
Rysunek 14 Schemat działania MCR.	40
Rysunek 15 Diagram Jabłońskiego ilustrujący proces fluorescencji i fosforescencji.	43
Rysunek 16 Hierarchiczny model hematopoezy. Skrót: LT-HSC długożyjące HSC (ang. long-term HSC), IT-HSC (ang. innate lymphoid HSC), ST-HSC krótkożyjące HSC (ang. short-term HSC), multipotencjalne komórki progenitorowe (ang. multipotent progenitors, MPP): erytrocytów i megakariocytów, linii mieloidalnej i limfoidalnej (ang. erythroid/megakaryocytic (MPP2), myeloid (MPP3), lymphoid lineages (MPP4)), CMP wspólne komórki progenitorowe linii mieloidalnej i granulocytarnej (ang. common myeloid progenitor), LMPP limfoidalne multipotencjalne komórki progenitorowe (ang. lymphoid-primed multipotential progenitor), progenitory MEP megakariocytów i erytrocytów (ang. megakaryocyte-erythroid progenitor), EoBP eozynofili i bazofili (ang. eosinophil–basophil progenitor), GMP granulocytów i monocytów (ang. granulocyte-monocyte progenitor), CLP wspólne komórki progenitorowe linii limfoidalnej (ang. common lymphoid progenitors). Schemat przygotowany na podstawie [67].....	45
Rysunek 17 Struktura ruksolitynibu.....	50
Rysunek 18 Schemat różnicowania komórek linii komórkowych HL-60, K562 i U937 wybranymi związkami chemicznymi: D ₃ -witamina D ₃ , TPA- 12-O-tetradekanoiloforbol-13-octan, ATRA - kwas retinowy, DMSO-dimetylosulfotlenek, BA-kwas butyrowy.	51
Rysunek 19 Widma średnie wraz z odchyleniem standardowym obszaru całej komórki linii dla linii RS4;11 (N = 263), SEM (N = 206), SUP-B15 (N = 191) oraz BV-173 (N = 198). Widma średnie pochodzą z komórek zmierzonych w 4 niezależnych powtórzeniach biologicznych, gdzie N stanowi sumę komórek uwzględnionych w analizie.	62
Rysunek 20 Charakterystyka spektroskopowa struktur lipidowych w badanych liniach komórkowych BCP-ALL. (A) Widma średnie z odchyleniem standardowym klasy struktur lipidowych. (B) Wykres procentowej zawartości komórek z wyodrębnioną klasą lipidów. (C) Stosunek intensywności	

integralnej pasm 1660 i 1440 cm^{-1} oraz (D) 1305 i 1265 cm^{-1} widm klasy struktur lipidowych w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyla. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazują wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartylowego (ang. Inter Quartile Range, IQR). (E) Porównanie par badanych linii komórkowych w oparciu o wyniki nieparametrycznej analizy wariancji Kruskala-Wallis. Wyniki otrzymano dla 4 niezależnych eksperymentów biologicznych. 65

Rysunek 21 Wyniki analizy PCA widm średnich linii komórkowych reprezentujących BCP-ALL oraz widm komórek prawidłowych - limfocytów B. Wykresy 3D (A) i 2D (C) dla PC1 vs PC2 i PC3 z 95% elipsą ufności dla limfocytów B (N=182, 37,6%) i linii komórkowych BCP-ALL (N=302, 62,4%) oraz odpowiednio (B) (D) z kodowaniem kolorystycznym linii komórkowych zebranych w 3 różnych eksperymentach biologicznych. Wykres wartości czynnikowych PC1 (E) i PC2 (F) z przypisaniem do biokomponentów (L-lipidy, #-hemoproteiny, C-białka, P-fosforany, N-DNA w tym pojedyncze kwasy nukleinowe). 67

Rysunek 22 Model PLS-DA dla 4 zmiennych ukrytych (A-D) oraz SVM-DA (E, F). (A) Zależność średniego błędu klasyfikacji kalibracji i sprawdzianu krzyżowego od ilości zmiennych ukrytych. (B) Wynik predykcji, przerywaną linią zaznaczono wartość proggu klasyfikacji. (C) Wektor regresji z kodowaniem kolorystycznym zależnym od wartości VIP. Pasma ramanowskie o wartości VIP większej od 1 zostały wskazane jako istotne dla dyskryminacji i przypisane do biokomponentów (L-lipidy, #-hemoproteiny, C-białka, P-fosforany, N-DNA w tym kwasy nukleinowe). (D) krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika z obliczonym polem powierzchni (AUC). (E) Sumaryczny wykres błędu klasyfikacji względem parametrów SVM kosztu i γ . (F) Wyniki klasyfikacji dla wybranych wartości γ i kosztu użytych do wytrenowania optymalnego modelu SVM. 69

Rysunek 23. Analiza PCA 449 widm (58,4%) komórek z mutacją BCR-ABL1 i 320 widm (41,65%) komórek z grupy KMT2A-r. Udział poszczególnych linii komórkowych był w następujący: RS4;11 21,1%, SEM 19,5% (KMT2A), BV-173 18,6%, SUP-B15 22,4%, SD-1 17,4% (BCR-ABL1). Wykres PC1 vs. PC2 z zaznaczoną elipsą ufności (A) dla BCP-ALL z fuzją genów BCR-ABL1 i KMT2A-r (B) a także z kodowaniem kolorystycznym poszczególnych badanych linii komórkowych. Wykres ładunków czynnikowych PC1 (E), PC2 (F) i PC5 (G) z przypisaniem do biokomponentów (L-lipidy, #-hemoproteiny, C-białka, P-fosforany, N-DNA w tym pojedyncze kwasy nukleinowe). 73

Rysunek 24 Modele klasyfikacyjne komórek z obecnością BCR-ABL1 i KMT2A-r przy użyciu dwóch algorytmów, tj. modelu PLS-DA dla 5 zmiennych ukrytych (A-D) oraz SVM-DA (E, F). (A) Średni błąd klasyfikacji względem liczby zmiennych ukrytych LV (B) Wyniki predykcji. Czerwona linia wskazuje próg użyty do klasyfikacji. (C) Wektor regresji z kodowaniem kolorystycznym względem wartości VIP. Ekstrema wektora regresji o wartościach VIP większych od 1 zostały wskazane jako istotne dla klasyfikacji i przypisane do biokomponentów (L-lipidy, # hemoproteiny, C-białka, P-fosforany, N-DNA w tym kwasy nukleinowe). (D) Krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika (ROC) z

obliczonym AUC. (E) Wykres błędu klasyfikacji względem parametrów SVM kosztu i γ . (F) Wartości parametrów wydajności modelu dla wybranych wartości γ i kosztu użytych do wytrenowania optymalnego modelu SVM.....	74
Rysunek 25 Widmo ramanowskie ciała stałego (A) L-tyrozyny i o-fosfo-L-tyrozyny oraz (B) seryny i fosfo-L-seryny.....	75
Rysunek 26 Widma średnie z odchyleniem standardowym komórek MHH-CALL-4 i MUTZ5 kontrolnych i traktowanych 10 μ M ruksolitynibu przez (A) 0,5 h i (B) 48 h.....	83
Rysunek 27 Wartości intensywności integralnych pasm (A, D) 1003, (B, E) 788 oraz stosunków intensywności integralnych (C, F) I_{788}/I_{1003} obliczonych dla widm linii komórkowej MHH-CALL-4 i MUTZ5 stanowiących grupę kontrolną oraz komórek traktowanych 10 μ M ruksolitynibu przez 48 h. Wykres pudełkowy reprezentuje zakres 1 i 3 kwartyli. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartylowego (ang. Inter Quartile Range, IQR).	85
Rysunek 28 Wartości intensywności integralnych pasm (A, D) 1660, (B, E) 1450 cm^{-1} oraz stosunków intensywności integralnych (C, F) I_{1660}/I_{1440} cm^{-1} obliczonych dla widm linii komórkowej MHH-CALL-4 i MUTZ5 stanowiących grupę kontrolną oraz komórek traktowanych 10 μ M ruksolitynibu przez 48 h. Wykres pudełkowy reprezentuje zakres 1 i 3 kwartyli. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartylowego (ang. Inter Quartile Range, IQR).	86
Rysunek 29 Modele O-PLS-DA dla 3 zmiennych ukrytych LV: (A-D) klasyfikujący komórki MHH-CALL-4 traktowane przez 0,5 h 10 μ M ruksolitynibu (MHH-CALL-4 + 0.5 h RUX) oraz kontrolne (MHH-CALL-4) oraz (E-H) klasyfikujący komórki MHH-CALL-4 traktowane przez 48 h 10 μ M ruksolitynibu (MHH-CALL-4 + 48 h RUX) oraz kontrolne (MHH-CALL-4). (A, E) Wykres przebiegu wartości zmiennej ukrytej LV1 dla badanych klas. (B, F) Wykres ładunków ważonego LV1. (C, G) Wynik predykcji, przerywaną linią zaznaczono wartość progu klasyfikacji. W tabeli podano parametry wydajności modelu dla etapu kalibracji (Cal), sprawdzianu krzyżowego (Val) i predykcji (Pred) (D, H) Wektor regresji z kodowaniem kolorystycznym zależnym od wartości VIP.	88
Rysunek 30 Modele O-PLS-DA dla 4 zmiennych ukrytych LV (A-D) klasyfikujący komórki MUTZ5 traktowane przez 0,5h 10 μ M ruksolitynibu (MUTZ5 + 0.5h RUX) oraz dla 3 zmiennych ukrytych LV klasyfikujący komórki MUTZ5 (MHH-CALL-4) oraz (E-H) klasyfikujący komórki MUTZ5 traktowane przez 48h 10 μ M ruksolitynibu (MUTZ5 + 48h RUX) oraz kontrolne (MUTZ5). (A, E) Wykres przebiegu wartości zmiennej ukrytej LV1 dla badanych klas. (B, F) Wykres ładunków ważonego LV1. (C, G) Wynik predykcji, przerywaną linią zaznaczono wartość progu klasyfikacji. W tabeli podano parametry wydajności modelu dla etapu kalibracji (Cal), sprawdzianu krzyżowego (Val) i predykcji (Pred) (D, H) Wektor regresji z kodowaniem kolorystycznym zależnym od wartości VIP. Pasma ramanowskie o wartości VIP większej od 1 zostały wskazane jako istotne dla dyskryminacji.	92

Rysunek 31 (A) Barwienie MGG komórek kontrolnych i ATRA-dHL-60 po 72 h inkubacji. (B) Barwienie fluorescencyjne jądra Hoechst HL-60 i ATRA-dHL-60 po 72 h inkubacji (C) Barwienie fluorescencyjne jądra Hoechst 33342 i mitochondriów MitoTracker™Orange CM-H2TMRos w badanych komórkach po 48 i 72 h inkubacji.	103
Rysunek 32 Potencjał błony mitochondrialnej w ATRA-dHL-60 względem kontroli (100%) obliczony na podstawie geometrycznej średniej fluorescencji. Niepewność podano jako błąd standardowy (SE), liczba powtórzeń biologicznych N=3.....	105
Rysunek 33 Obrazowanie fluorescencyjne komórek apoptotycznych i nekrotycznych bawionych odpowiednio Hoechst 33342 (niebieski), PI (czerwony), oraz aneksyną V (zielony) po 1 h od zakończenia 15 minutowej stymulacji komórek znacznikiem MB.	106
Rysunek 34 Reprezentatywne obrazy integracyjnie komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 inkubowanych z 100 nM MitoBADY przez 15 lub 30 min.	108
Rysunek 35 Reprezentatywne obrazy integracyjnie komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 preinkubowanych 30 μ M FCCP, a następnie inkubowanych z 100 nM MitoBADY przez 15 lub 30 min.	109
Rysunek 36 Widma średnie komórek HL-60 i traktowanych ATRA (ATRA-dHL-60) jak również dodatkowo inkubowanych przez 15 lub 30 minut z 100 nM MitoBADY.....	110
Rysunek 37 Intensywność integralna pasm (A) 753, (B) 2850, (C) 2220 cm^{-1} oraz stosunków (D) A, (E) B oraz (F) A/B odpowiednio zdefiniowanych na osiach Y obliczone dla średnich widm ramanowskich komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 inkubowanych przez 15 min z 100 nM MitoBADY. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyła. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartyłowego	111
Rysunek 38 Intensywność integralna pasm (A) 753, (B) 2850, (C) 2220 cm^{-1} oraz stosunków (D) A, (E) B oraz (F) A/B odpowiednio zdefiniowanych na osiach Y obliczone dla średnich widm ramanowskich komórek kontrolnych HL-60 i traktowanych ATRA przez 48 i 72 h oraz inkubowanych przez 15 min z 100 nM MitoBADY. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyła. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartyłowego.....	112
Rysunek 39 Intensywność integralna pasm (A) 753, (B) 2850, (C) 2220 cm^{-1} oraz stosunków (D) A, (E) B oraz (F) odpowiednio zdefiniowanych na osiach Y obliczone dla średnich widm ramanowskich komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 inkubowanych przez 30 min z 100 nM MitoBADY. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyła. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, \square wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartyłowego	113
Rysunek 40 Intensywność integralna pasm (A) 753, (B) 2850, (C) 2220 cm^{-1} oraz stosunków (D) A, (E) B oraz (F) A/B odpowiednio zdefiniowanych na osiach Y obliczone dla średnich widm	

<i>ramanowskich komórek kontrolnych HL-60 i traktowanych ATRA przez 48 i 72 h oraz inkubowanych przez 30 min z 100 nM MitoBADY. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu pudełkowego reprezentującego zakres 1 i 3 kwartyła. Pudełko rozdzielone jest linią mediany, □ wskazuje wartość średniej. Wąsy wskazują 1,5 przedziału międzykwartyłowego.....</i>	114
Rysunek 41 <i>Krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika obliczona dla modelu klasyfikacji HL-60 względem ATRA-dHL-60 inkubowanych z MitoBADY przez (A) 15 min (B) i 30 min.....</i>	116
Rysunek 42 <i>Wartości stosunku intensywności A/B obliczony dla widm średnich komórek HL-60 i ATRA-dHL-60 traktowanych 30 μM FCCP przez 10 min a kolejno z 100 nM MitoBADY.</i>	117
Rysunek 43 <i>Profile spektralne komponentów analizy MCR komórek (A) HL-60 i ATRA-dHL-60 oraz (B) traktowanych 100 nM przez 15 lub 30 min.</i>	119
Rysunek 44 <i>Obrazy dystrybucji komponentów 1-3 wraz ze skalą kolorystyczną dla komórek grupy kontrolnej (HL-60) i zróżnicowanej w kierunku neutrofilii (ATRA-dHL-60).</i>	121
Rysunek 45 <i>Obrazy dystrybucji komponentów 1-3 wraz ze skalą kolorystyczną dla komórek grupy kontrolnej (HL-60) i zróżnicowanej w kierunku neutrofilii (ATRA-dHL-60) inkubowanych przez 15 min z 100 nM MitoBADY (MB).</i>	122
Rysunek 46 <i>Obrazy dystrybucji komponentów 1-3 wraz ze skalą kolorystyczną dla komórek grupy kontrolnej (HL-60) i zróżnicowanej w kierunku neutrofilii (ATRA-dHL-60) inkubowanych przez 30 min z 100 nM MitoBADY (MB).</i>	123
Rysunek 47 <i>(A) Obrazy SRS dla wybranych przesunięć ramanowskich 2850, 2930, 3015 cm⁻¹. (B) zrekonstruowany rozkład 3D dla sygnału drgań rozciągających -CH₃ otrzymane w oparciu o konfokalny pomiar obrazów SRS przy 2930 cm⁻¹ dla kolejnych równoodległych płaszczyzn ogniskowania obejmujących pełną wysokość komórek oraz (C) pojedyncze obrazy dystrybucji otrzymane dla tych płaszczyzn ogniskowania. Krok pomiarowy dla obrazowania SRS wynosił 0,3 μm w płaszczyźnie xy i 1 μm w z, a czas rejestracji sygnału dla pojedynczego piksela wynosił 900 μs. Pasek skali równy 3 μm.....</i>	125
Rysunek 48 <i>(A), (D) Obrazy SRS zebrane dla przesunięć ramanowskich przy 2850, 2930, 2960 i 2970 cm⁻¹ wraz ze skalą kolorystyczną odpowiadającą intensywności sygnału SRS oraz (B), (E) obrazy ratiometryczne $I_{2850}/(I_{2850} + I_{2930})$, I_{2850}/I_{2930} oraz różnicowe I_{2850}/I_{2930}. (D), (F) Wykres intensywności sygnału SRS w zależności od wartości przesunięcia chemicznego średnie widma SRS w zakresie drgań rozciągających C-H dla żywych komórek kontrolnych HL-60 (lewy panel) i ATRA-dHL-60 (prawy panel) otrzymane na podstawie obrazów SRS (N=8 dla każdej badanej grupy komórek).</i>	126
Rysunek 49 <i>Analiza PCA obrazów SRS pojedynczych komórek zarejestrowanych przy 2850, 2930, 2960 i 2970 cm⁻¹ pokazująca punktację oraz ładunki z wariancją uchwyconych żywych a) komórek grupy kontrolnej HL-60) i c) różnicowanych komórek HL-60 w kierunku neutrofilii za pomocą 1 μM ATRA przez 48 h. Analiza MCR: obrazy punktacji z sumą kwadratów sygnału w stosunku do</i>	

całkowitego sygnału podane w % i składowe MCR żywych b) niestymulowanych i d) stymulowanych komórek HL-60 z 1 μ M ATRA przez 48 h. 128

Spis tabel

<i>Tabela 1 Aktualne zestawienie reporterów ramanowskich do obrazowania organelli na podstawie [8].....</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 2 Zestawienie istotnych pasm charakterystycznych wraz z przypisaniem.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 3 Opis kolorystyczny barwienia MGG w warunkach pH 7,2 [61].....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 4 Interpretacja pasm ramanowskich wraz z referencjami</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 5 Odsetek komórek o podwyższonej ekspresji markera CD11b obliczony na podstawie średniej geometrycznej. Niepewność podano jako błąd standardowy (SE), liczba powtórzeń biologicznych N=3.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabela 6 Odsetek komórek HL-60 oraz traktowanych ATRA w punktach kontrolnych.</i>	<i>104</i>
<i>Tabela 7 Parametry klasyfikacji.....</i>	<i>115</i>

Wykaz publikacji z listy JCR

Związane z pracą doktorską:

Matuszyk, E.; **Adamczyk, A.**; Radwan, B.; Pieczara, A.; Szcześniak, P.; Mlynarski, J.; Kamińska, K.; Baranska, M. *Multiplex Raman Imaging of Organelles in Endothelial Cells*. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, 255, 119658, IF=4.4, MEiN =140, doi: 10.1016/j.saa.2021.119658.

Adamczyk, A.; Matuszyk, E.; Radwan, B.; Rocchetti, S.; Chlopicki, S.; Baranska, M. *Toward Raman Subcellular Imaging of Endothelial Dysfunction*. *J. Med. Chem.* **2021**, IF=7.446, MEiN=200,doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00051.

Współautor publikacji:

Czamara, K.; **Adamczyk, A.**; Stojak, M.; Radwan, B.; Baranska, M. *Astaxanthin as a New Raman Probe for Biosensing of Specific Subcellular Lipidic Structures: Can We Detect Lipids in Cells under Resonance Conditions?* *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, 78, 3477–3484, doi:10.1007/s00018-020-03718-1.

Leszczenko, P.; Borek-Dorosz, A.; Nowakowska, A.M.; **Adamczyk, A.**; Kashyrskaya, S.; Jakubowska, J.; Ząbczyńska, M.; Pastorczak, A.; Ostrowska, K.; Baranska, M.; et al. *Towards Raman-Based Screening of Acute Lymphoid Leukemia-Type b (B-All) Subtypes*. *Cancers* **2021**, 13, 1–21, IF=6.639, MEiN =140, doi:10.3390/cancers13215483.

Borek-Dorosz, A., Nowakowska, A. M., Leszczenko P., **Adamczyk A.**, Pieczara A., Jakubowska J., Pastorczak A., Ostrowska K., Ząbczyńska M., Sowinski K., Gruszecki W. I., Baranska M., Marzec K. M., Majzner K. *Raman-based spectrophotyping of the most important cells of the immune system*, *Journal of Advanced Research*, **2022**, 41, 191-203, IF=10.478, MEiN =140, doi: 10.1016/j.jare.2021.12.013.

Nowakowska, A. M.; Borek-Dorosz, A.; Leszczenko, P.; **Adamczyk, A.**; Pieczara, A.; Jakubowska, J.; Pastorczak, A.; Ostrowska, K.; Marzec, K.M.; Majzner, K. *Reliable Cell Preparation Protocol for Raman Imaging to Effectively Differentiate Normal Leukocytes and Leukemic Blasts*. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2023**, 292, 122408, F=4.831, MEiN=140, doi:10.1016/j.saa.2023.122408.

Radwan B., **Adamczyk A.**, Tott S., Czamara K., Kaminska K., Matuszyk E., Baranska M., *Labeled vs label-free Raman imaging of lipids in endothelial cells of various origins*, *molecules*, 25(23), 5752, IF= 4.71, MEiN=140, doi: 10.3390/molecules25235752.

Szafraniec E., Tott S., Kus E., Augustynska D., Jaształ A., **Filipek A.**, Chlopicki S., Baranska M., *Vibrational spectroscopy-based qua-tification of liver steatosis*, *BBA - Molecular Basis of Disease*, 2019, 1865 (11), 1–6, 1655226, IF= 6,633, MNISW=140, doi: 10.1016/j.bbadis.2019.08.002.

Wykaz zgłoszeń patentowych

Zgłoszenie patentowe pt.: "*Method for identifying a neutrophil-like cell derive*" from a promyelocytic leukemia cell" (**Adamczyk A.**, Majzner K., Nowakowska A. M., Jakubowska J., Młynarski W., Barańska M). Numer zgłoszenia: EP 23461553.2

Wykaz ustnych wystąpień konferencyjnych

1. 23.08.2021-26.08.2021: 11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, online (5 minutowa krótka prezentacja)
2. 21.02.2022-22.02.2022 - Coherent Raman Microscopy and other Nonlinear Imaging techniques, development and application, Kraków, Polska (prezentacja ustna)
3. 7.05.2022-8.05.2022- International student's conference: Young in Cancer Research, online (prezentacja ustna)
4. 19.06.2022-23.06.2022- 12th International Conference on Clinical Spectroscopy, Dublin, Irlandia (plakat oraz 1 minutowa krótka prezentacja)
5. 27.08.2023-1.09.2023- 12th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Kraków, Polska (prezentacja ustna)

Kierowanie grantem

Narodowe Centrum Nauki, Preludium 20, (UMO-2021/41/N/ST4/03069), Reportery ramanowskie jako narzędzie do oceny różnicowania komórek na przykładzie modeli in vitro komórek prekursorowych krwi linii mieloidalnej, 02. 2022-obecnie

Udział w projektach badawczych

1. Narodowe Centrum Nauki, Projekt OPUS 15 (UMO-2018/29/B/ST4/00335) , RS-SRS-MED: Spontaneous and stimulated Raman scattering microscopy for sensitive and ultrafast imaging of cells upon development of life style diseases, wolontariusz
2. Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, Projekt Team-Net (POIR.04.04.00-00-16ED/18-00), Platforma do szybkiego, bezznacznikowego obrazowania, identyfikacji I sortowania podtypów komórek białaczkowych, Luty 2020-Luty 2023,

Wykaz staży i wyjazdów naukowych

25.02.2023-10.03.2023- staż w grupie dr David'a Perez-Guaita na Uniwersytecie w Walencji. Staż miał na celu rozwijanie modeli klasyfikacyjnych z wykorzystaniem różnych metod analizy wielowymiarowej stosując oprogramowanie MATLAB i PLS+MIA Toolbox. Poruszono również kwestie doboru walidacji krzyżowej oraz nadinterpretacji wyników.

Wykaz uczestnictwa w szkoleniach i szkołach naukowych

1. 30.07.2020-1.08.2020: International School On Nonlinear vibrational Spectro-microscopy ICONS 2020
2. 15.06.2020-20.06.2020: BioSpec Workshop on Machine Learning and Chemometrics in Biospectroscopy
3. 16.02.2021-4.03.2021: Basic Chemometrics Plus Online, Eigenvector
4. 7.10.2021-8.10.2021 Eigenvector University Europe, advanced course, Montpellier, Francja

Po za wymienionymi, brałam udział w wielu pomniejszych webinarjach i szkoleniach online z zakresu chemii analitycznej, chemometrii i spektroskopii.

Działalność organizacyjna

7.05.2022-8.05.2022- komitet organizacyjny, prowadzenie sesji podczas International student's conference: Young in Cancer Research

13.07.2020-14.07.2020- komitet organizacyjny webinarium *Chemometrics in Vibrational Spectroscopy* organizowanego przez Zespół Obrazowania Ramanowskiego

27.08.2023-1.09.2023- komitet organizacyjny konferencji *12th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS12)* w Krakowie