



Uniwersytet Rzeszowski
Collegium Medicum

mgr Aneta Kowal

**Zastosowanie spektroskopii IR i spektroskopii Ramana
w poszukiwaniu potencjalnych markerów diagnostycznych
i prognostycznych w surowicy i szpiku kostnym pacjentów
pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)**

**Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk
o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotorzy: **dr hab. n. med. Radosław Chaber, prof. UR**

dr hab. n. fiz. Józef Cebulski, prof. UR

Rzeszów, 2025 r.

Serdeczne podziękowania dla
dr hab. n. med. Radosława Chabry, prof. UR
oraz dr hab. n. fiz. Józefa Cebulskiego, prof. UR
za nadzór merytoryczny i nieocenioną pomoc
udzielone podczas tworzenia niniejszej pracy.

Słowa podziękowania kieruję także
do najbliższych współpracowników
za życzliwość, przyjaźń, poświęcony czas,
a także do moich Rodziców za wsparcie i cierpliwość.

Spis treści

Wykaz wykorzystanych skrótów	6
I. Wstęp.....	9
1.1. Ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci.....	12
1.1.1. Symptomatologia i diagnostyka ALL u dzieci.....	13
1.1.2. Leczenie ALL.....	14
1.2. Techniki spektroskopii oscylacyjnej	18
1.2.1. Spektroskopia w podczerwieni – podstawy teoretyczne.....	19
1.2.2. Spektroskopia Ramana – podstawy teoretyczne	21
II. Cel pracy	23
III. Materiały i metody	24
3.1. Materiał	24
3.2. Aparatura badawcza i warunki pomiarów.....	27
3.2.1. Analizy FT-IR	27
3.2.2. Spektroskopia Ramana.....	28
3.3. Analiza statystyczna.....	28
IV. Wyniki.....	31
4.1. Analizy spektralne FT-IR– SUROWICA	31
4.1.1. Wyznaczenie pasm charakterystycznych dla widm FT-IR surowicy oraz porównanie wartości absorpcji.....	31
4.1.2. Określenie drugorzędowej struktury białek – analiza pasm składowych zakresu amidu I widm FT-IR surowicy.....	53
4.1.3. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm FT-IR surowicy	59
4.1.4. Ocena różnic spektralnych dla widm FT-IR surowicy pacjentów z ALL uwzględniająca grupy ryzyka.....	63

4.1.5. Określenie drugorzędowej struktury białek – analiza pasm składowych zakresu amidu I widm FT-IR surowicy pacjentów z ALL uwzględniająca grupę ryzyka.....	66
4.1.6. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm FT-IR surowicy pacjentów z ALL uwzględniające grupę ryzyka	68
4.2. Analizy spektralne FT-IR – SZPIK KOSTNY	72
4.2.1. Wyznaczenie pasm charakterystycznych dla widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego oraz porównanie wartości absorpcji.....	72
4.2.2. Określenie drugorzędowej struktury białek – analiza pasm składowych zakresu amidu I widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego	83
4.2.3. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego	87
4.2.4. Ocena różnic spektralnych lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniająca grupy ryzyka	90
4.2.5. Określenie drugorzędowej struktury białek – analiza pasm składowych zakresu amidu I widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniająca grupę ryzyka.....	92
4.2.6. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniające grupę ryzyka.....	94
4.3. Spektroskopia Ramana - SUROWICA	97
4.3.1. Wyznaczenie pasm charakterystycznych dla widm ramanowskich surowicy oraz porównanie wartości znormalizowanej intensywności	97
4.3.2. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm ramanowskich surowicy.....	112
4.3.3. Ocena różnic spektralnych dla widm ramanowskich surowicy pacjentów ALL uwzględniająca grupy ryzyka.....	116
4.3.4. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm ramanowskich surowicy pacjentów z ALL uwzględniające grupę ryzyka.....	118
4.4. Spektroskopia Ramana – SZPIK KOSTNY	120

4.4.1. Wyznaczenie pasm charakterystycznych dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego oraz porównanie wartości znormalizowanej intensywności.....	120
4.4.2. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego.....	128
4.4.3. Ocena różnic spektralnych dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniająca grupy ryzyka.....	131
4.4.4. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniające grupę ryzyka.....	133
V. Dyskusja.....	135
VI. Wnioski	159
VII. Piśmiennictwo	161
Streszczenie.....	176
Abstract	178
Wykaz rycin	180
Wykaz tabel	191
Aktywność naukowa Osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora.....	194
Załączniki.....	197

Wykaz wykorzystanych skrótów

- ALL – ostra białaczka limfoblastyczna (ang. acute lymphoblastic leukemia)
- AML – ostra białaczka mieloblastyczna (ang. acute myeloid leukemia)
- ATR – osłabione całkowite odbicie (ang. attenuated total reflectance)
- AUC – pole powierzchni pod krzywą ROC (ang. area under the curve)
- B-ALL – B-komórkowa ALL (ang. B-cell ALL)
- CAR-NK – komórki NK z chimerycznym receptorem antygenowym (ang. chimeric antigen receptor Natural Killer)
- CAR-T – komórki T z chimerycznym receptorem antygenowym (ang. chimeric antigen receptor T-cell)
- CD – antygen różnicowania komórkowego (ang. cluster of differentiation)
- CHT – chemioterapia
- CLL – przewlekła białaczka limfocytowa (ang. chronic lymphocytic leukemia)
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
- EBV – wirus Epsteina-Barr (ang. Epstein-Barr virus)
- EDTA – kwas wersenowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
- EVs – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular vesicles)
- FAB – francusko-amerykańsko-brytyjski (ang. french-american-british)
- FC – cytometria przepływowa (ang. flow cytometry)
- FIR – daleka podczerwień (ang. far infrared)
- FPA – detektor ogniskowej matrycy (ang. focal plane array)
- FT-IR – spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. Fourier transform infrared spectroscopy)
- FTIR-MSP – technika mikrospektroskopii FT-IR (ang. FT-IR microspectroscopy)
- HC – zdrowa kontrola
- HCA – hierarchiczna analiza skupień (ang. hierarchical cluster analysis)

HEMC – pacjenci ze schorzeniami hematologicznymi innymi niż choroby nowotworowe

HEMC-E – pacjenci grupy HEMC ze zdiagnozowaną anemią

HEMC-L – pacjenci grupy HEMC ze zdiagnozowaną leukopenią

HEMC-P – pacjenci grupy HEMC ze zdiagnozowaną małopłytkowością

HEMC-W – pacjenci grupy HEMC ze zdiagnozowaną pancytopenią

HHV6 – ludzi herpeswirus typu 6 (ang. human herpesvirus-6)

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus)

HR – grupa wysokiego ryzyka (ang. high-risk)

HTLV-1 – wirus ludzkiej białaczki z komórek T typ 1 (ang. human T-cell leukemia/lymphoma virus-1)

IG – immunoglobulina (ang. immunoglobulin)

IR – podczerwień (ang. infrared)

KW ANOVA – test Anova Kruskalla-Wallisa

LEUK-PD – pacjenci grupy badanej ze zdiagnozowaną białaczką

LH-ALL – ALL z niską hipodiploidią (ang. low hypodiploid ALL)

MCT – rtęciowo-kadmowo-tellurkowy (ang. mercury-cadmium-telluride)

MIR – średnia podczerwień (ang. mid infrared)

MRD – minimalna choroba resztkowa (ang. minimal residual disease)

NH-ALL – ALL z prawie haploidią (ang. near haploid ALL)

NIR – bliska podczerwień (ang. near infrared)

non-HR – pacjenci spoza grupy wysokiego ryzyka (ang. non-high risk)

OS - wskaźnik przeżywalności (ang. overall survival)

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PC – główna składowa/ komponent podstawowy (ang. principal component)

PCA – analiza głównych składowych (ang. principal component analysis)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

Ph+ ALL – Philadelphia-dodatnia ALL (ang. Philadelphia+ ALL)

PLS-DA – analiza dyskryminacyjna z użyciem częściowych najmniejszych kwadratów

(ang. partial least squares discriminant analysis,)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)

ROC – krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika (ang. receiver operating characteristic curve)

RS – spektroskopia Ramana (ang. Raman spectroscopy)

SERS – powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana (ang. surface enhanced Raman spectroscopy)

T-ALL – T-komórkowa ALL (ang. T-cell ALL)

TCR – receptor komórki T (ang. T-cell receptor)

TKI – inhibitory kinazy tyrozynowej (ang. tyrosine kinase inhibitor)

UMW – test U Manna-Whitneya

UPGMA – algorytm grupy parowanej/metoda nieważonych średnich połączeń
(ang. unweighted pair group method with arithmetic mean)

VS – spektroskopia wibracyjna (ang. vibrational spectroscopy)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

I. Wstęp

Rozwój nowotworu uważany jest za proces wielostopniowy, zainicjowany pojawieniem się pojedynczej komórki, która uległa mutacji i dała początek klonowi nowotworowemu. Nagromadzenie kolejnych mutacji prowadzi do nabycia przez komórkę nowotworową zdolności do niekontrolowanej proliferacji, przetrwania, lokalnego naciekania (inwazji) i przerzutowania. Komórki nowotworowe dostosowują swój metabolizm tak, aby sprostać zwiększonemu zapotrzebowaniu na energię i składniki odżywcze. Adaptacja ta jest procesem złożonym, nie w pełni poznanym, związanym między innymi ze zmianami w transdukcji sygnałów szlaków metabolicznych czy modulacją epigenetyczną. Oprócz opisanej przez Warburga glikolizy beztlenowej (tzw. efekt Warburga), której towarzyszy zwiększone wytwarzanie mleczanów, obserwuje się między innymi zmiany metabolizmu glukozy, glutaminy, zwiększenie syntezy kwasów tłuszczowych wraz z ograniczeniem ich oksydacji, odpowiadające zwiększonemu zapotrzebowaniu na m.in. glukozę, lipidy czy aminokwasy wykorzystywane przez komórki nowotworowe do syntezy kwasów nukleinowych, białek czy lipidów. Progresji nowotworu sprzyjają także jego mikrośrodowisko - zmienione fenotypowo pod wpływem komórek nowotworowych komórki swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, fibroblasty, komórki naczyń krwionośnych i limfatycznych, a także modyfikacje i przebudowa macierzy pozakomórkowej [1,2].

Choroby nowotworowe w populacji dziecięcej występują niezwykle rzadko. Stanowią około 1% zachorowań na choroby nowotworowe we wszystkich grupach wiekowych. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO), w 2022 roku na świecie odnotowano ponad 275 tysięcy nowych przypadków i ponad 105 tysięcy zgonów w grupie wiekowej do 19 lat [3]. W Polsce diagnozuje się ok. 1300 przypadków rocznie [4,5]. Etiologia nowotworów wieku dziecięcego pozostaje w dużej mierze nieznana. Wśród potencjalnych czynników ryzyka wskazuje się czynniki genetyczne – mutacje dziedziczne i nabyte, czynniki wrodzone takie jak niska waga urodzeniowa, późne rodzicielstwo i wrodzone anomalie, wcześniejszą chemioterapię, jak również niekorzystne czynniki środowiskowe, narażenie na toksyczne środki chemiczne, wysokie dawki promieniowania jonizującego czy przebyte infekcje wirusowe tj. infekcja ludzkim wirusem niedoboru odporności

(ang. human immunodeficiency virus, HIV), ludzkimi herperwirusami np. wirusem Epsteina-Barr (ang. Epstein-Barr virus, EBV) i herpeswirusem 6 (ang. human herpesvirus-6, HHV6) [6,7].

Częstość występowania nowotworów oraz ich profil u dzieci odbiegają znacząco od tych obserwowanych w populacji dorosłych. Ostre białaczki stanowią około 28% wszystkich nowotworów rozpoznawanych u dzieci, a najczęściej diagnozowane to ostra białaczka limfoblastyczna (ang. acute lymphoblastic leukemia, ALL) i ostra białaczka szpikowa (ang. acute myeloid leukemia, AML). Uwzględniając częstość występowania dominują także guzy ośrodkowego układu nerwowego (ok. 26%) czy nerwiak zarodkowy współczulny (neuroblastoma, ok. 15%) – najczęściej diagnozowany nowotwór u dzieci poniżej pierwszego roku życia. Chłoniaki obejmują około 12%, a mięsaki kości i tkanek miękkich około 13% wszystkich przypadków przy czym najczęstsze dla tych drugich są odpowiednio osteosarcoma i mięsaki Ewinga oraz rhabdomyosarcoma. Guz Wilmsa (nephroblastoma) występuje z częstością około 5%. Do pozostałych diagnozowanych typów należą guzy germinalne, nowotwory wątroby czy nowotwory nabłonkowe. Te ostatnie dominują w populacji dorosłych stanowiąc około 85% wszystkich przypadków zachorowań [8-11]. W odróżnieniu od nowotworów występujących u dorosłych, te występujące u dzieci mają tendencję do intensywnego rozwoju i szybkiej możliwości przerzutowania. Kluczowa jest więc możliwość szybkiej diagnostyki i wdrożenia leczenia choroby nowotworowej. Rozwój narzędzi diagnostycznych jak i modyfikacja protokołów terapeutycznych pozwoliły na osiągnięcie współczynników przeżycia sięgających nawet 90%, jak w przypadku ALL. W terapii chorób nowotworowych stosuje się dziś zarówno chemioterapię, radioterapię, leczenie chirurgiczne, jak i nowoczesne środki terapii dopasowane do profilu molekularnego pacjenta oraz immunoterapię. Pomimo postępów w leczeniu, chemioterapia — nadal będąca podstawową metodą terapii systemowej u dzieci — wiąże się z wysoką toksycznością, ryzykiem powikłań w trakcie leczenia, a także późnymi efektami ubocznymi, które mogą negatywnie wpływać na jakość życia pacjentów w długoterminowej obserwacji [12–13].

Rutynowa diagnostyka nowotworów opiera się o badanie histopatologiczne zmiany w przypadku guzów litych bądź jak w przypadku chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, o ocenę cytologiczną i oznaczenie immunofenotypu komórek nowotworowych. Wspomagająco stosowane w diagnostyce są zarówno laboratoryjne oznaczenie markerów nowotworowych, techniki cytogenetyczne, biologii molekularnej

jak i badania obrazowe takie jak tomografia komputerowa czy rezonans magnetyczny. Najważniejszym badaniem decydującym o diagnozie jest na ogół badanie histopatologiczne, które opiera się w dużym stopniu na subiektywnej ocenie przez osobę wykonującą badanie i wiąże się z długim czasem niezbędnym do uzyskania wyniku [14-15].

Techniki spektroskopii wibracyjnej jako szybkie, nieinwazyjne, narzędzia diagnostyczne pozwalają na biochemiczną analizę próbki i śledzenie zmian molekularnych, dzięki czemu znalazły zastosowanie w diagnostyce medycznej. Spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) i spektroskopia Ramana (ang. Raman spectroscopy, RS) badają oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z drgającymi molekułami, które selektywnie odpowiednio absorbują bądź rozpraszają to promieniowanie. Uzyskany wynik ma postać widma, przy czym za najistotniejszy w analizie próbek biologicznych uznaje się region nazywany molekularnym odciskiem palca, w obszarze którego obserwuje się pasma i piki przypisywane dla drgań związanych z białkami, węglowodanami i kwasami nukleinowymi. W ostatnich latach zauważalny jest wzrost zainteresowania możliwością wykorzystywania tych technik w diagnostyce chorób nowotworowych. Według bazy PubMed liczba doniesień naukowych z tego zakresu wynosi niemal 5500 do 2024 roku (słowa kluczowe: „cancer” i FT-IR” bądź „Raman Spectroscopy”) [16].

W niniejszym badaniu uzyskano i analizowano widma spektroskopowe dla surowicy i lizatu komórkowego szpiku kostnego w celu uzyskania spektralnych markerów diagnostycznych i prognostycznych dla ostrej białaczki limfoblastycznej występującej u dzieci.

W pierwszym rozdziale dokonano przeglądu aktualnej literatury przedstawiając charakterystykę, epidemiologię oraz strategie terapeutyczne dla ALL diagnozowanej u dzieci, a także omówiono podstawy teoretyczne wykorzystanych technik spektroskopowych. Kolejne rozdziały prezentują szczegółowy opis celu badania, metodyki i materiału, w tym charakterystykę badanych populacji pacjentów. W dalszej części omówiono wyniki pomiarów spektralnych dla surowicy i lizatu komórkowego szpiku kostnego, przypisując pasma charakterystyczne, porównując wartość absorpcji bądź intensywności widma, dokonując rozkładu pasma amidu I poprzez integrację widma

drugiej pochodnej widm spektroskopii w podczerwieni, a także wykorzystano wielowymiarowe analizy tj. analizę głównych składowych (ang. principal component analysis, PCA) i hierarchiczną analizę skupień (ang. hierarchical cluster analysis, HCA) dla wskazania najistotniejszych regionów dla diagnozowania i prognozowania ALL. W końcowych rozdziałach zawarto dyskusję oraz wnioski z przeprowadzonego badania.

1.1. Ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci

Najczęściej diagnozowanym typem białaczki u dzieci jest ostra białaczka limfoblastyczna wywodząca się ze zmienionych nowotworowo progenitorowych komórek limfoidalnych. W około 85% przypadków ALL wywodzi się z linii limfocytów B (ang. B-cell ALL, B-ALL), a w 15% z linii limfocytów T (ang. T-cell ALL, T-ALL). Nowotwór ten występuje z częstotliwością 3-4 na 100 000 dzieci w wieku poniżej 15 roku życia, ze szczytem zachorowań pomiędzy 2 i 5 rokiem życia, nieznacznie częściej u chłopców [17]. Tak jak w przypadku innych nowotworów wieku dziecięcego, czynniki genetyczne i narażenie środowiskowe, w tym na substancje chemiczne (np. benzen, toluen) czy infekcje wirusowe (np. wirus EBV, HHV-6, wirus ludzkiej białaczki z komórek T typ 1 (ang. human T-cell leukemia/lymphoma virus-1, HTLV-1), parwovirus B19) wskazywane są jako istotne dla ryzyka rozwoju ALL. Do zaburzenia genetycznych predysponujących do wystąpienia ALL należy m.in. zespół Downa, zespół Blooma, anemia Fanconiego, ataksja-teleangiectazja i zespół Nijmegen czy zespół Li-Fraumeni [18-19]. W większości przypadków stwierdza się jednakże mutacje *de novo*. Rearanżacje obejmujące gen receptora komórki T (ang. T-cell receptor, TCR) i onkogeny tj. *TLX1*, *TLX3*, *TAL1*, *LMO1*, *LMO2* czy *HOXA* występują w 40-50% przypadków T-ALL. Inne zaburzenia obserwowane dla T-ALL to m.in. mutacje aktywujące *NOTCH1* i *N-RAS*, mutacje inaktywujące *WT1* czy delecje *CDKN2A* [20-22]. Hyperdiploidia, definiowana jako obecność powyżej 50 chromosomów, obserwowana jest w 25% przypadków B-ALL. Nawet u 25% pacjentów z B-ALL obserwuje się translokację t(12;21) skutkującą powstaniem genu fuzyjnego *ETV6-RUNX1*. Rearanżacje genu *KMT2A* dotyczą 5-6% wszystkich przypadków u dzieci i aż około 80% przypadków wśród niemowląt poniżej 1 rok życia [23-24]. Rzadziej, w 3-5% przypadków występuje translokacja t(1;19) z wytworzeniem genu fuzyjnego *TCF3-PBX1* i translokacja t(9;22)

prowadząca do powstania tzw. chromosomu Philadelphia (gen fuzyjny *BCR-ABL1*). Philadelphia-podobna ALL z profilem ekspresji genów i wysoką częstością zaburzeń genu *IKZF1*, jak w przypadku Ph-pozytywnej ALL (ang. Philadelphia+ ALL, Ph+ ALL), ale bez stwierdzonego genu fuzyjnego *BCR-ABL1* występuje w 12% przypadków B-ALL [25-28]. Hypodiploidię obserwuje się w około 1-2% przypadków. Z ALL z prawie haploidią (ang. near haploid ALL, NH-ALL) powiązane są zaburzenia genu kinazy tyrozynowej receptora, szlaku przekazywania sygnału RAS i mutacje genu *IKZF3*, a delecje genu *IKZF2* i mutacje genu *TP53* z drugim podtypem hypodiploidii – ALL z niską hipodiploidią (ang. low hypodiploid ALL, LH-ALL) [29-30].

1.1.1. Symptomatologia i diagnostyka ALL u dzieci

Objawy ALL są niespecyficzne i związane z akumulacją komórek blastycznych w szpiku kostnych, jak również w krwi obwodowej i narządach pozaszpikowych. Do objawów tych należą między innymi osłabienie, gorączka, nocne poty, łatwe siniaczenie, bladość, utrata wagi. Obserwowana w morfologii krwi obwodowej anemia i trombocytopenia są następstwem niewydolności procesu hematopoezy w wyniku wypierania prawidłowych komórek szpiku kostnego przez komórki nowotworowe. U pacjentów obserwuje się także limfadenopatię, splenomegalię i hepatomegalię [31]. Charakterystyczna dla T-ALL masa węzłowa zlokalizowana w śródpiersiu, może manifestować się dusznością, bólami klatki piersiowej czy zespołem żyły głównej górnej. W 5-8% przypadkach dochodzi również do zajęcia ośrodkowego układu nerwowego, z objawami przypominającymi zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych bądź zaburzenie funkcjonowania nerwów czaszkowych [32]. Niespecyficzny charakter objawów klinicznych stanowi istotne wyzwanie diagnostyczne, nierzadko skutkując opóźnieniem rozpoznania, co przekłada się na pogorszenie rokowania oraz obniżenie skuteczności wdrożonego leczenia [33].

W diagnostyce ALL wykorzystuje się badanie cytologiczne aspiratu szpiku kostnego. Obecność ponad 20% komórek blastycznych w obrazie mikroskopowym szpiku kostnego wraz z potwierdzeniem immunofenotypu tych komórek metodą cytometrii przepływową (ang. flow cytometry, FC) jest niezbędne do rozpoznania ALL. Poprzednio wprowadzone kryteria francusko-amerykańsko-brytyjskie (ang. french-

american-british, FAB) klasyfikacji ALL wyodrębniały trzy jej podtypy (L1, L2 i L3) i uwzględniały różnice w morfologii komórek blastycznych – ich wielkość, cechy cytoplazmy czy jądra komórkowego, nie uwzględniały natomiast czynników rokowniczych. Klasyfikacje WHO, pierwsze oparte o ocenę morfologii i zaburzeń cytogenetycznych komórek blastycznych i kolejne zmienione z 2008 r. oraz obecna z 2016 r. zdefiniowały poszczególne podtypy ALL ze względu na morfologię, immunofenotyp oraz profil cytogenetyczny i molekularny.

Ocena pierwotnego zajęcia ośrodkowego układu nerwowego obejmuje badanie cytologiczne płynu mózgowo rdzeniowego uzyskanego drogą nakłucia lędźwiowego, a także badanie podmiotowe i przedmiotowe, tj. występowanie objawów klinicznych i potwierdzenie zmian w badaniach obrazowych. U pacjentów wykonuje się obowiązkowo badanie rentgenowskie klatki piersiowej. Wykluczyć należy także zajęcie innych narządów tj. nerek, jajników, jąder [34-35].

1.1.2. Leczenie ALL

W leczeniu ALL u dzieci stosuje się wielolekową chemioterapię (CHT), wspomaganą w poszczególnych przypadkach radioterapią, przeszczepem komórek macierzystych szpiku kostnego, jak również terapią ukierunkowaną molekularnie i immunoterapią. Ewaluacja czynników prognostycznych i ocena odpowiedzi na leczenie stanowią podstawę kwalifikacji pacjentów do odpowiednich grup terapeutycznych, z zintensyfikowaną formą chemioterapii u tych z grupy wysokiego ryzyka i skupiającą się na minimalizacji efektów toksyczności leczenia u pozostałych pacjentów. Indywidualizacja protokołów leczniczych pozwoliła na osiągnięcie wskaźnika przeżycia całkowitego przekraczającego 90% i wskaźnika 5-letniego czasu wolnego od wznowy sięgającego 85% [35-39].

Gorsze rokowanie cechuje niemowlęta i dzieci powyżej 10 roku życia, pacjentów z leukocytozą powyżej 50 G/l, białaczką z linii T-komórkowej, płci męskiej i rasy czarnej. Do kluczowych czynników prognostycznych należą cytogenetyczne bądź molekularne powtarzalne zaburzenia genetyczne. Korzystne to m.in. hiperdiploidia i translokacja *ETV6-RUNX1* oraz translokacja *TCF3-PBX1*. Hipodiploidia, rearanżacje

genu *KMT2A* (*MLL*), obecność genu fuzyjnego *BCR-ABL1* na skutek translokacji t(9;22) czy translokacja t(17;19) skutkująca fuzją *TCF3-HLF* to przykłady niekorzystnych czynników rokowniczych, których stwierdzenie kwalifikuje pacjentów do grupy wczesnego wysokiego ryzyka [40].

Wyróżnia się następujące fazy chemioterapii – fazę indukcji, konsolidacji oraz fazę leczenia podtrzymującego. Czas trwania poszczególnych faz, skojarzenia chemioterapeutyków i ich dawki mogą nieznacznie różnić dla poszczególnych protokołów terapeutycznych, z reguły jednak leczenie trwa około 2-3 lata i związane jest z zastosowaniem spektrum leków sterydowych i cytostatycznych. Kortykosteroidy, najczęściej prednizon oraz deksametazon, łącząc się z odpowiednimi receptorami modulują odpowiedź immunologiczną organizmu i redukując wydzielanie cytokin, regulują ekspresję szeregu onkogenów, a także indukują zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę komórek. Cytostatyki w leczeniu ALL, najczęściej winkrystyna, asparaginaza, cytarabina, metotreksat, antracykliny (doksorubicyna i daunorubicyna), cyklofosfamid czy 6-merkaptopuran, działają poprzez blokowanie podziałów komórkowych w różnych mechanizmach zatrzymania cyklu komórkowego oraz inicjację apoptozy komórek nowotworowych [32,35-36,41] .

Leczenie rozpoczyna trwająca 5-7 dni profaza sterydowa, w trakcie której pacjenci otrzymują prednizon lub deksametazon dla redukcji masy guza i zmniejszenia ryzyka wystąpienia zespołu lizy guza na dalszym etapie leczenia. Następną fazą leczenia – fazą indukcji remisji ma na celu przywrócenie prawidłowej hematopoezy i uzyskanie całkowitej remisji choroby. Faza ta trwa 6-8 tygodni. Ocena minimalnej choroby resztkowej (ang. minimal residual disease, MRD) stanowi obecnie najistotniejszy marker odpowiedzi na leczenie indukcyjne. Cytometria przepływowa oraz metoda reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR), odpowiednio w oparciu o markery immunologiczne i rearanżacje klonalnego genu receptora komórek T lub immunoglobuliny (ang. immunoglobulin, IG) wykorzystywane są do ilościowej oceny poziomu MRD. Dzięki wykraczającej poza ocenę mikroskopową czułość tych metod sięgająca 1 na 1000 - 10 000 komórek (10^{-3} do 10^{-4}) w przypadku FC i nawet 1 na 1 000 000 komórek w przypadku metody PCR (10^{-5} do 10^{-6}), poziom MRD może być wykorzystywany nie tylko dla oceny odpowiedzi na leczenie, ale także do wczesnego wykrywania wznowy choroby. Innym istotnym markerem jest ocena odpowiedzi na leczenie sterydami pod koniec trwania profazy cytoredukcyjnej –

u pacjentów z dobrą odpowiedzią na leczenie liczba komórek blastycznych nie przekracza 1000 w 1 μ l krwi obwodowej. Faza konsolidacji leczenia trwa około 2 miesiące i wiąże się z zastosowaniem kombinacji chemioterapeutyków dla eradykacji submikroskopowej choroby resztkowej i zminimalizowania ryzyka nabycia lekooporności przez komórki nowotworowe. Dłuższe i intensywniejsze leczenie w tej fazie obejmuje pacjentów z grupy wysokiego ryzyka, u których po leczeniu indukcyjnym stwierdza się wysoki poziom minimalnej choroby resztkowej. Ostatnia faza leczenia to leczenie podtrzymujące, trwające w zależności od protokołu około 12 miesięcy, w czasie których pacjenci otrzymują chemioterapię doustną 6-merkaptopurynę z metotreksatem dla obniżenia ryzyka wznowy choroby u pacjentów u których osiągnięto remisję [42-44].

Profilaktyka i leczenie zajęcia ośrodkowego układu nerwowego realizowana jest poprzez dokanałowe podawanie dużych dawek metotreksatu w monoterapii bądź w skojarzeniu z arabinozydem cytozyny i prednizonem oraz leczenie systemowe terapeutykami przenikającymi barierkę krew-mózg, a także radioterapię ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [40].

Allogeniczny przeszczep komórek macierzystych szpiku kostnego rozważany jest u pacjentów z wskaźnikami wysokiego ryzyka wznowy, jak np. Ph⁺ ALL i z innymi niekorzystnymi zmianami genetycznymi, wysokim poziomem choroby resztkowej oraz w przypadku wznowy choroby [32,43].

Leczenie ukierunkowane molekularnie i immunoterapia stanowią nowe metody leczenia i wykorzystywane są zwłaszcza u pacjentów z chorobą oporną na konwencjonalną CHT i ze wznową choroby. Celem immunoterapii jest ukierunkowanie odpowiedzi immunologicznej dla zniszczenia komórek nowotworowych poprzez m.in. aktywację cytotoksyczny limfocytów T bądź bezpośrednie dostarczenie leku do komórki nowotworowej. Stosowane przeciwciała rozpoznają obecne na komórkach białaczkowych antygeny różnicowania komórkowego (ang. cluster of differentiation, CD) tj. CD19 CD20, CD22 czy CD38. W leczeniu dostępne są m.in. blinatumomab czyli cząsteczka bispecyficznej IG skierowanej przeciwko antygenom CD19 komórki białaczkowej i obecnemu na prawidłowych limfocytach T – CD3. Do najbardziej obiecujących nowych metod leczenia białaczek zalicza się terapię genetycznie zmodyfikowanymi chimerycznymi limfocytami T (ang. chimeric antigen receptor T-Cell, CAR-T) lub komórkami NK (ang. chimeric antigen receptor natural killer, ang. CAR-NK)

z receptorami anty-CD19 stosowaną w leczeniu B-ALL [44-45]. Zaprojektowane na poziomie molekularnym inhibitory kinazy tyrozynowej (ang. tyrosine kinase inhibitor, TKI) stosowane są u pacjentów z translokacją obejmującą geny *BCR* i *ABL*, ze zmienioną aktywnością kinazy tyrozynowej ABL1 lub ABL2. Trwają badania nad skutecznością zastosowania selektywnego inhibitora kinaz JAK1 i JAK2 (Ruxolitinib) w grupie pacjentów z zaburzeniami genetycznymi prowadzącymi do aktywacji szlaku sygnałowego JAK-STAT, np. w przypadku Ph-podobnej ALL [46].

1.2. Techniki spektroskopii oscylacyjnej

Cząstki i atomy to dynamiczne molekuly pozostające w stałym ruchu i zdolne do oddziaływania ze sobą. Energia wewnętrzna ciała, na którą składa się energia kinetyczna oraz energia potencjalnych oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych może ulec zmianie wtedy gdy zostanie pobrane lub oddane ciepło bądź zostanie wykonana nad lub przez dane ciało/układ praca. Metody spektroskopowe badają oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią. Promieniowanie elektromagnetyczne (fotony) może zostać przez daną próbkę zaabsorbowane, wyemitowane bądź ulec rozproszeniu stąd też wyróżniamy odpowiednio metody absorpcyjne, emisyjne i spektroskopię Ramana [47-48].

Spektroskopia w podczerwieni (ang. infrared, IR) i spektroskopia Ramana to komplementarne techniki spektroskopii wibracyjnej (ang. vibrational spectroscopy, VS) szeroko stosowane w laboratoriach przemysłowych i zyskujące coraz większą rolę w medycynie jako narzędzia analityczne dostarczające kompleksową informację na temat struktury i składu chemicznego danego układu. Rozważając komórki, tkanki czy płyny ustrojowe jako złożone układy molekuł, techniki te badając oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z budującymi je cząstkami i atomami mogą być wykorzystywane do śledzenia zmian zachodzących w przebiegu chorób m.in. chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, zaburzeń metabolicznych, czy monitorowania skuteczności terapii [49-52].

Rozwój mikroelektroniki umożliwił śledzenie zmian na poziomie submikroskopowym, z rozdzielczością niedostępną dla konwencjonalnej mikroskopii wykorzystywanej w badaniach histopatologicznych, bez konieczności stosowania dodatkowych barwników czy specyficznych przeciwciał znakujących. Badania genetyczne, kolejny istotny filar diagnostyki schorzeń, jako wieloetapowy proces wymaga czasochłonnego i kosztownego opracowania materiału, np. prowadzenia hodowli komórkowej, izolacji kwasów nukleinowych, zaprojektowania komplementarnych primerów i sond znakujących dla ściśle określonych sekwencji. Zarówno w przypadku badań histopatologicznych jak i genetycznych poprawność analizy jest wysoce zależna od doświadczenia osoby przeprowadzającej badanie, a wynik badania może być obarczony błędem interpretacyjnym. W przypadku VS wynik w postaci widma odnosi się do

badanego układu w całej jego złożoności, a jednocześnie możliwość połączenia dwóch technik analitycznych – spektroskopii IR lub spektroskopii Ramana z mikroskopią pozwala na obrazowanie (inaczej mapowanie) próbki czego rezultatem są mapy łączące obraz chemiczny próbki z cyfrowym odwzorowaniem jej topografii. Do istotnych zalet VS należą m.in. niewielka objętość materiału niezbędnego do pomiaru, krótki czas pomiaru czy relatywnie niski koszt operacyjny oraz brak destrukcyjnego wpływu na próbkę dzięki czemu może ona zostać wykorzystana do dalszej diagnostyki. Ograniczenia zastosowania technik VS w diagnostyce medycznej wynikają przede wszystkim z silnej absorpcji promieniowania podczerwonego przez cząsteczki wody w zakresie pasm amidowych oraz przez parafinę, powszechnie stosowaną do utrwalania preparatów histologicznych, w zakresie pasm charakterystycznych dla lipidów [53-55].

1.2.1. Spektroskopia w podczerwieni – podstawy teoretyczne

Spektroskopia w podczerwieni to technika wibracyjnej spektroskopii badającą absorpcję światła z zakresu podczerwieni przez materię. Zakres ten w widmie promieniowania elektromagnetycznego położony jest pomiędzy promieniowaniem widzialnym i mikrofalowym, przy czym za najistotniejszy dla analizy biomolekuł uważa się zakres środkowej podczerwieni (ang. mid infrared, MIR) obejmujący liczby falowe od 4000 do 400 cm^{-1} otoczony przez zakres bliskiej podczerwieni (ang. near infrared, NIR – zakres powyżej 4000 cm^{-1}) i dalekiej podczerwieni (ang. far infrared, FIR - zakres 400-50 cm^{-1}). Absorpcja promieniowania podczerwonego przez molekuły powoduje zmianę energii oscylacyjnej i energii rotacyjnej, skutkując powstaniem widm oscylacyjnych dla próbek w fazie ciekłej i stałej oraz widm oscylacyjno-rotacyjnych dla próbek w fazie gazowej [51-52]. Drgające molekuły, które wykazują obligatoryjnie zmienny moment dipolowy, selektywnie absorbują promieniowanie o danej długości fali i energii odpowiadającej ich modułom oscylacyjnym. Podstawowe drgania to drgania rozciągające i deformacyjne. Drgania rozciągające związane są ze zmianą długości wiązań i dzielą się na symetryczne i asymetryczne, a drgania deformacyjne ze zmianą kątów pomiędzy wiązaniami podczas ruchów w płaszczyźnie lub poza płaszczyznę wiązań. Wyróżnia się drgania deformacyjne zginające związane z ruchem w płaszczyźnie ze zmianą kątów pomiędzy wiązaniami, drgania wahadłowe związane z ruchem atomów w płaszczyźnie

i skręcające związane z ruchem atomów poza płaszczyznę oraz drgania szkieletowe charakterystyczne dla pierścieni aromatycznych [55-56].

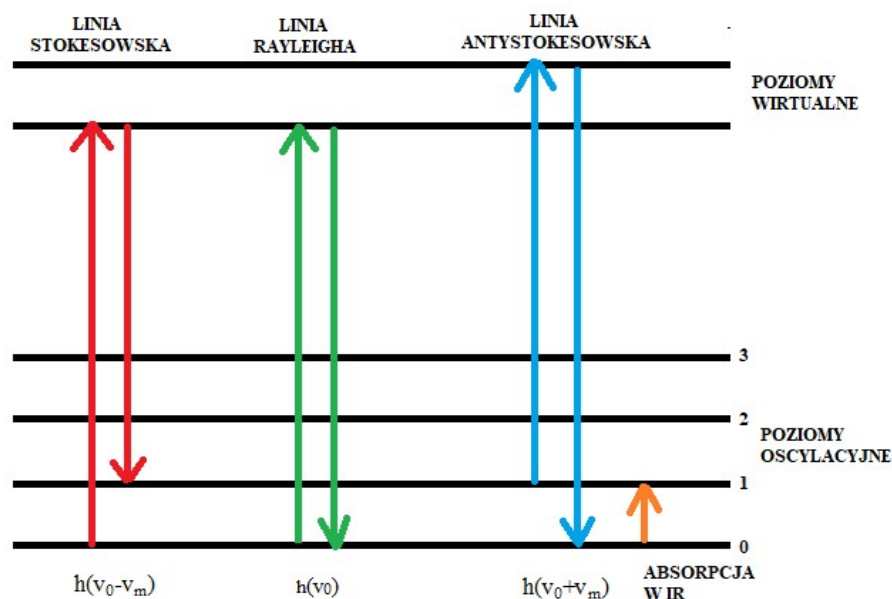
Dostępne jako pierwsze spektrometry IR – spektrofotometry dyspersyjne składają się ze źródła promieniowania, fotometru, monochromatora, komory pomiarowej i detektora. Funkcją monochromatora jest rozpraszanie i wydzielanie fali o danej długości. Uzyskanie widm wyższej czułości, rozdzielczości i w krótszym czasie możliwe jest dzięki zastosowaniu nowocześniejszych spektrometrów fourierowskich, w których monochromator zastąpiono interferometrem wykorzystującym zjawisko interferencji fal. W pierwszej kolejności dla całego zakresu spektralnego rejestrowane są interferogramy, które następnie przekształcane są matematycznie za pomocą transformaty Fourier’a zmieniającej otrzymany sygnał do postaci intensywności w funkcji częstości z funkcji czasu. Pomiar odbywa się w trybie transmisyjnym bądź odbiciowym inaczej refleksyjnym, w których odpowiednio analizie podlega promieniowanie które przeszło przez próbkę i przepuszczalne dla IR podłoże (np. fluorek wapnia czy bromek potasu) oraz promieniowanie odbite od próbki. Metoda wielokrotnego osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. attenuated total reflectance, ATR) to rodzaj techniki refleksyjnej, w której wykorzystuje się zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia dzięki zastosowaniu materiału o dużym współczynniku załamania światła (np. kryształ germanowy, kryształ diamentowy), przezroczystego dla IR. Wiązka promieniowania, która pada na jego wewnętrzną powierzchnię ulega wielokrotnemu odbiciu na granicy ośrodków, a także absorpcji przez przylegającą ściśle do zewnętrznej powierzchni materiału próbkę, poprzez co amplituda fali zanikającej powstającej w wyniku interferencji fali padającej i odbitej ulega dodatkowemu osłabieniu. Pomiarowi podlega intensywność fali w funkcji liczby falowej po jej wyprowadzeniu wiązki promieniowania z ośrodka. W trybie transfektancji, będącym połączeniem techniki odbiciowej i transmisyjnej, analizowane jest promieniowanie absorbowane, które zostało transmitowane przez próbkę, a następnie odbite za pomocą zwierciadła bądź powierzchni odbijającej dyfuzyjnie i ponownie transmitowane przez próbkę [51,54,57].

Zarejestrowane widma IR są wykresami zależności transmitancji lub absorpcji promieniowania od liczby falowej i zawierają charakterystyczne piki oraz pasma, którym przypisuje się biochemiczne odniesienia. Sprzężenie spektrometru FT-IR z mikroskopem pozwala dodatkowo na rejestrowanie widm przy jednoczesnej możliwości obserwacji małych próbek. Obraz dystrybucji przestrzennej dla tej próbki można otrzymać

wykonując pojedyncze pomiary bądź serie pomiarów punktowych lub liniowych za pomocą detektora rtęciowo-kadmowo-tellurkowego (ang. mercury-cadmium-telluride, MCT) oraz detektora ogniskowej matrycy (ang. focal plane array, FPA) przeznaczonego do obrazowania dwuwymiarowego [51,57].

1.2.2. Spektroskopia Ramana – podstawy teoretyczne

Spektroskopia Ramana zajmuje się badaniem nieelastycznego rozproszenia promieniowania z zakresu ultrafioletowego, widzialnego bądź podczerwonego. Gdy energia fotonów oddziałujących z materią nie odpowiada poziomom energetycznym cząsteczek ją budujących, dochodzi do wzbudzenia tzw. stanu wirtualnego tych cząsteczek. Fotony ulegają w większości rozproszeniu w sposób elastyczny (rozpraszanie Rayleigha), gdy energia promieniowania rozproszonego i energia promieniowania padającego (ν_0) są równe i cząsteczki po wzbudzeniu powracają na ten sam poziom energetyczny, a tylko niewielka jego frakcja w sposób nieelastyczny (efekt Ramana). Efekt Ramana występuje dla molekuł wykazujących zmienną polaryzowalność w trakcie drgania. Wyróżnia się dwa rodzaje pasm ramanowskich – pasma stokesowskie i antystokesowskie, pojawiające się równoległe do pasm Rayleigha. Pasma stokesowskie, pojawiające się przy liczbie falowej mniejszej niż dla promieniowania padającego (ν_0) i związane są z absorpcją fotonów o danej energii (ν_m) przez cząsteczki przenoszące się na wyższy poziom oscylacyjny w porównaniu do wyjściowego poziomu oscylacyjnego. Energia fotonu rozproszonego pomniejszona jest o różnicę energii poziomów oscylacyjnych $h(\nu_0 - \nu_m)$. Położone przy wyższych liczbach falowych pasma antystokesowskie powstają na wskutek wyemitowania przez cząsteczki fotonów o danej energii (ν_m) gdy te z wyjściowego wzbudzonego poziomu oscylacyjnego przechodzą na podstawowy poziom oscylacyjny. Energia fotonu rozpraszanego jest więc powiększona o energię poziomów oscylacyjnych $h(\nu_0 + \nu_m)$ [53,58-60]. Rycina 1. przedstawia schemat omówionych przejść pomiędzy poziomami energetycznymi.



Rycina 1. Schemat przejść pomiędzy poszczególnymi poziomami energetycznymi.

Zarówno intensywność rozpraszania Rayleigha jak i rozpraszania Ramana są odpowiednio tysiąc i milion razy mniejsze niż intensywność promieniowania wzbudzającego. W widmach ramanowskich nie rejestruje się pasm antystokesowskich, uważanych za mniej intensywne niż pasma stokesowskie, jako że większość cząsteczek znajduje się na podstawowym poziomie oscylacyjnym [61].

Dostępne są spektrometry dyspersyjne i fourierowskie, dla których podobnie jak w przypadku spektrometrów IR, jako główne części składowe wyróżnia się źródło promieniowania, komorę pomiarową, monochromator bądź interferometr oraz detektor. Rejestrowane widma Ramana są wykresami intensywności i przesunięcia Ramana wyrażonego w cm^{-1} . Istotna dla badania próbek biologicznych jest dostępność mikroskopów Ramana łączących konwencjonalną mikroskopię świetlną i spektroskopię Ramana dla analizy spektralnej i obrazowania wybranych struktur próbki. Wysokoczuła technika powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii ramanowskiej (ang. Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) pozwala na dostarczenie wysokiej rozdzielczości widma dla próbek o niskim stężeniu analitu, które przed pomiarem zostały zaabsorbowane na powierzchni metalu bądź koloidalnych zawiesin metali dla zwiększenia intensywności promieniowania [62-64].

II. Cel pracy

W diagnozowaniu ALL oraz ocenie czynników ryzyka, na podstawie których odbywa się stratyfikacja pacjentów do danych grup terapeutycznych, wykorzystuje się badania biologii molekularnej, cytogenetyki oraz cytometrię przepływową oceniającą antygeny powierzchniowe oraz cytoplazmatyczne komórek nowotworowych. Wykorzystano spektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera (FT-IR) oraz spektroskopię Ramana dla analizy spektralnej surowicy krwi obwodowej i lizatu komórkowego szpiku kostnego w celu śledzenia zmian molekularnych w przebiegu ALL, które potencjalnie mogą zostać wykorzystane w diagnostyce medycznej.

Cel pracy:

1. Zbadanie różnic molekularnych dla widm FT-IR i widm ramanowskich surowicy dzieci z ALL oraz grupy pacjentów zdrowych i z nienowotworowymi schorzeniami hematologicznymi.
2. Analiza zmian w widmach FT-IR i widmach ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego dzieci z ALL i pacjentów z nienowotworowymi zaburzeniami hematologicznymi.
3. Ocena wykorzystania uzyskanych widm FT-IR oraz ramanowskich surowicy i lizatu komórkowego szpiku kostnego dzieci z ALL jako potencjalnego markera diagnostycznego i rokowniczego.

III. Materiały i metody

3.1. Materiał

Komisja Bioetyczna pozytywnie zaopiniowała badania i wydała zgodę na ich przeprowadzenie następujących uchwałach:

- Uchwała nr 1/01/2020 Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim z dnia 30/01/2020 r. (Zastosowanie spektroskopii IR i spektroskopii Ramana w poszukiwaniu potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych w surowicy i szpiku kostnym pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)).
- Uchwała nr 2022/045/W Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim z dnia 04/05/2022 r. (Opracowanie widm referencyjnych i algorytmu analizy widm spektroskopowych celem implementacji w diagnostyce medycznej).

Do badań włączono 91 pacjentów Kliniki Onkohematologii Dziecięcej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie hospitalizowanych w latach 2016-2024. U 48 spośród tych pacjentów zdiagnozowano (ALL). W pozostałych przypadkach (N=43) obserwowano m.in. anemię z niedoboru żelaza (N=6), leukopenię (N=16) oraz pancytopenię (N=8) i małopłytkowość (N=13). W każdym przypadku uzyskano zgodę pacjenta > 15 roku życia oraz przedstawiciela ustawowego na wykorzystanie pobranego materiału biologicznego do analiz spektroskopowych. Krew obwodowa i szpik kostny były pobierane przy okazji rutynowej diagnostyki hematologicznej.

Badanie cytologiczne szpiku kostnego pobranego na drodze biopsji wraz z badaniem immunofenotypu komórek wskazało rozpoznanie ostrej białaczki limfoblastycznej z linii limfocytów B (B-ALL) u 43 pacjentów oraz ALL z linii limfocytów T (T-ALL) u 5 pacjentów. Średni odsetek komórek blastycznych w szpiku kostnym wynosił 79% i mieścił się w przedziale od 20% do 96%, przy czym mediana wynosiła 85%. Tylko u 9 pacjentów odsetek blastów w szpiku był niższy od 50%. Pacjenci poddani byli leczeniu w oparciu o następujące protokoły leczenia: ALL IC-BFM 2009 (N=14), EsPhALL2009 (N=2), AIEOP-BFM ALL 2017 (N=22) oraz AIEOP-BFM

ALL 2017 Poland (N=10). Do grupy wysokiego ryzyka zakwalifikowano 9 pacjentów. U 3 pacjentów stwierdzono niekorzystne czynniki rokownicze, tj. obecność genu fuzyjnego *BCR-ABL* (N=2), a u jednego była to rearanżacja w obrębie genu *KMT2A* (N=1). Ten ostatni wraz z 3 innymi, u których obserwowano wysoki poziom minimalnej choroby resztkowej, tj. PCR-MRD TP1 $> 5 \times 10^{-4}$ oznaczany po zakończeniu fazy indukcji chemioterapii zostali zakwalifikowani do grupy wczesnego wysokiego ryzyka. Trzech pacjentów nie osiągnęło remisji po 33 sobie leczenia (pacjenci leczeni przed 2017 rokiem), a u 2 pacjentów stwierdzono wysoki poziom minimalnej choroby resztkowej po fazie konsolidacji leczenia tj. PCR-MRD TP2 $> 5 \times 10^{-4}$.

Wznowę choroby zaobserwowano u trzech pacjentów, w tym u jednego pacjenta z grupy wysokiego ryzyka i u 2 pacjentów z grupy spoza wysokiego ryzyka. Odnotowano jeden zgon (pacjent ze wznową choroby, spoza grupy wysokiego ryzyka).

Grupę kontrolną stanowiło 15 pacjentów Działu Diagnostyki Laboratoryjnej w Przeworsku włączonych do badania w ramach realizowanego zadania grantowego pn. „Opracowanie widm referencyjnych i algorytmu analizy widm spektroskopowych celem implementacji w diagnostyce medycznej” realizowanego między czerwcem i listopadem 2022 r. finansowanego w ramach programu grantowego na prace B+R jednostek naukowych w ramach projektu pt. „Podkarpackie Centrum Innowacji” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Osi Priorytetowej nr I "Konkurencyjna i innowacyjna gospodarka" z Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podkarpackiego na lata 2014-2020 Nabór III (numer grantu N3_134).

Wszyscy pacjenci z grupy kontrolnej spełnili następujące kryteria włączenia do badania: wiek poniżej 18 lat, negatywny wywiad w kierunku ostrych stanów zapalnych na minimum dwa tygodnie przed pobraniem materiału, negatywny wywiad w kierunku chorób przewlekłych i leczenia farmakologicznego w związku z chorobą przewlekłą oraz negatywny wywiad w kierunku zachorowania na choroby nowotworowe w przeszłości. Oceny dokonano na podstawie ankiety dotyczącej stanu zdrowia oraz wywiadu lekarskiego.

Charakterystyka trzech grup badanych uwzględniająca płeć, wiek oraz liczbę dostępnych próbek została przedstawiona w tabeli poniżej (tabela 1.).

Tabela 1. Charakterystyka grup badanych.

Grupa badana	Liczba pacjentów Liczba kobiet Liczba mężczyzn	Wiek [lata] Średnia wieku Zakres	Liczba próbek Surowica/ Szpik
Zdrowi pacjenci (HC)	15 8 [53%] 7 [47%]	10,5 [0,5-18] 10,5 [3,5-18] 9,5 [0,5-17]	15/-
Pacjenci z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC)	43 20 [46,5%] 23 [53,5%]	10,5 [1,3-18,0] 11,2 [1,3-18] 10,1 [1,3-17,8]	40/30
Anemia (HEMC-E)	6 2 [33%] 4 [67%]	10,3 [1,3-18]	6/4
Małopłytkowość (HEMC-P)	13 8 [62%] 5 [38%]	12,5 [3,5-17,8]	13/12
Leukopenia (HEMC-L)	16 9 [56%] 7 [44%]	9,8 [1,3-18]	16/8
Pancytopenia (HEMC-W)	8 4 [50%] 4 [50%]	9,1 [2-16,8]	7/6
Pacjenci ALL (LEUK-PD)	48 20 [42%] 28 [58%]	7,2 [1-17,6] 5,4 [1,1-13,5] 8,5 [1-17,6]	48/29

Analizy zostały przeprowadzone dla surowicy oraz lizatu komórkowego szpiku kostnego, z wyjątkiem grupy pacjentów zdrowych, dla których ze względu na brak wskazania medycznego nie przeprowadzono biopsji szpiku kostnego i do analiz wykorzystano jedynie krew obwodową.

Surowicę krwi obwodowej uzyskano poprzez pobranie krwi żyłnej do probówkostrzykawek z aktywatorem wykrzepiania (S-Monovette, Sarstedt) i wirowanie w warunkach 3000g przez 10 minut, a następnie ponowne wirowanie odpipetowanej do probówek typu eppendorf surowicy w warunkach 5000 obrotów na minutę przez 5 minut,

celem uniknięcie interferencji składników morfotycznych krwi w wyniki analiz spektroskopowych. Szpik kostny pobierano na drodze aspiracji do probówko-strzykawek zawierających kwas wersenowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) jako antykoagulant (S-Monovette, Sarstedt).

Materiały procedowane były przed upływem dwóch godzin, a następnie przechowywane w temperaturze -80 stopni Celsjusza w zamrażarkach niskotemperaturowych do czasu pomiaru. Bezpośrednio przed pomiarem materiał rozmrażano w temperaturze pokojowej.

3.2. Aparatura badawcza i warunki pomiarów

Analizy FT-IR oraz spektroskopii Ramana zostały przeprowadzone w Centrum Innowacji i Transferu Wiedzy Techniczno-Przyrodniczej oraz Centrum Mikroelektroniki i Nanotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego odpowiednio w Pracowni Spektroskopii w Dalekiej Podczerwieni oraz Laboratorium Nanopreparatyki.

3.2.1. Analizy FT-IR

Do analiz wykorzystano spektrometr w podczerwieni z transformatą Fouriera (FT-IR) model Vertex 70v firmy Bruker, wyposażony w detektor MCT i jednoodbiciową przystawkę ATR z diamentowym kryształem.

Pomiary dokonywano w trybie osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR) dla zakresu od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} liczby falowej, z rozdzielczością spektralną 4 cm^{-1} , uśredniając 64 skany dla próbki badanej i tła. Pomiarów przeprowadzono w atmosferze powietrza z wykorzystaniem automatycznej kompensacji atmosferycznej dla dwutlenku węgla i pary wodnej w zakresie odpowiednio $2400\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$ i $2100\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$.

Surowicę w objętości $20\mu\text{l}$ nanoszono na szkiełka fluorku wapnia CaF_2 (Crystan, UK) i pozostawiano do wysuszenia w eksykatorze szafkowym wypełnionym żel krzemionkowym przez 3 godziny. Lizat komórkowy szpiku kostnego w objętości $8\mu\text{l}$

nanoszono bezpośrednio na przystawkę ATR i pozostawiano do wyschnięcia przez 40 minut. Objętość próbki niezbędną do pokrycia powierzchni kryształu oraz czas niezbędny do wyschnięcia próbki został ustalony empirycznie.

Dla każdej próbki pomiar dokonano w co najmniej trzech powtórzeniach. Uzyskane widma analizowano w zakresie od 3500 cm^{-1} do 900 cm^{-1} , z wyłączeniem zakresu 2800 cm^{-1} do 1800 cm^{-1} . Widma poddane zostały normalizacji wektorowej oraz korekcji linii bazowej (korekcja Rubberband, liczba punktów linii podstawy - 64) z wykorzystaniem oprogramowania OPUS (Bruker).

3.2.2. Spektroskopia Ramana

Dysponowano spektrometrem inVia Micro Raman Renishaw współpracującym z mikroskopem Leica DM 2500 M, wykorzystując w czasie pomiaru obiektyw o powiększeniu 50x i laser o długości fali 785 nm jako źródło wzbudzania (Renishaw, Wotton-under-Edge, UK). Rozdzielczość pomiaru wynosiła ok. 1 cm^{-1} . Na szkiełka krzemionkowe nanoszono surowicę ($2\mu\text{l}$) oraz lizat komórkowy szpiku kostnego ($2\mu\text{l}$) i pozostawiono do wysuszenia w eksykatorze szafkowym wypełnionym żelem krzemionkowym przez 10 minut. Dla każdej próbki wykonano mapę, na którą składały się co mniej 3 miejsca pomiaru. Pomiaru dokonywano w zakresie $1800\text{--}150\text{ cm}^{-1}$, z czasem ekspozycji wynoszącym 10 sekund i trzema akumulacjami. Widma analizowano w zakresie $1800\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ po korekcji linii bazowej, normalizacji (zakres normalizacji 0-1000) i wygładzeniu (algorytm wygładzania + 3 punkty) wykorzystując oprogramowanie Wire (Renishaw, Wotton-under-Edge, UK).

3.3. Analiza statystyczna

Wyznaczono pasma charakterystyczne dla widm FT-IR oraz widm ramanowskich dalej zwane maksimami oraz odpowiadające im wartości absorpcji i intensywności. Dla każdej próbki zarejestrowano minimum 3 widma FT-IR, które następnie zostały uśrednione oraz mapę spektralną dla spektroskopii Ramana z minimum 3 obszarami pomiaru. Widma reprezentatywne dla grup powstały na skutek uśrednienia wszystkich

widm otrzymanych dla przypadków z danej grupy. Na potrzeby niniejszej rozprawy widma te nazywane będą w dalszej części rozprawy uśrednionymi bądź reprezentatywnymi widmami dla danej grupy.

Uzyskane dane spektralne analizowano z wykorzystaniem testów nieparametrycznych po odrzuceniu hipotezy zerowej (test Shapiro-Wilka) zakładającej normalność rozkładu zmiennych. Wykorzystano nieparametryczny test U Manna-Whitneya (test UMW), test Anova Kruskala-Walisa (test KW ANOVA) oraz wielokrotne porównanie średnich rang dla wszystkich prób (Statistica, Polska). Wartość poziomu istotności statystycznej ustalono na $p < 0,05$. Wybór testów nieparametrycznych podyktowany jest również dysponowaniem prób o małej liczności. Czułość i specyficzność oraz wartość odcięcia (cut-off) i pole pod krzywą ROC (ang. area under the curve, AUC) dla danych zmiennych wyznaczono na podstawie krzywej charakterystyki operacyjnej odbiornika (ang. receiver operating characteristic curve, ROC) korzystając z oprogramowania Origin Pro2021 (Massachusetts, USA).

Dla widm FT-IR otrzymano drugą pochodną przy zastosowaniu 13 punktów wygładzania zgodnie z protokołem Savitzky-Golay. Przeprowadzono integrację na drugiej pochodnej widma FT-IR w zakresie Amidu I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) celem porównania składu pasma amidu I dla analizowanych grup. Dla poszczególnych struktur drugorzędowych wyznaczono zakres integracji, wyliczając pole powierzchni dla obszaru pomiędzy dwoma szczytami ograniczającymi zakres charakterystyczny dla danej struktury. Zawartość poszczególnych frakcji wyrażono jako udział procentowy w stosunku do sumy uzyskanej dla wszystkich frakcji.

Wykorzystano także wielowymiarowe analizy statystyczne tj. analizę głównych składowych oraz hierarchiczną analizę skupień. Analiza głównych składowych pozwala na redukcję liczby zmiennych objaśniających wielowymiarowych baz danych i wyodrębnienie nowych będących kombinacją liniową oryginalnych zmiennych wejściowych nazywanych głównymi składowymi. Składowe główne maksymalnie opisywać powinny wariancję danych wyjściowych. Pierwsza otrzymana składowa niesie ze sobą najistotniejszą informację, a następne dobierane są tak aby wyjaśniały te nieopisane przez poprzednią, maksymalizując zmienność i aby nie były skorelowane ze sobą. Hierarchiczna analiza skupień podobnie jak PCA, jest metodą nienadzorowanej klasyfikacji, skupiającą podobne do siebie obiekty w grupy (klastry) i tworzącą dla nich

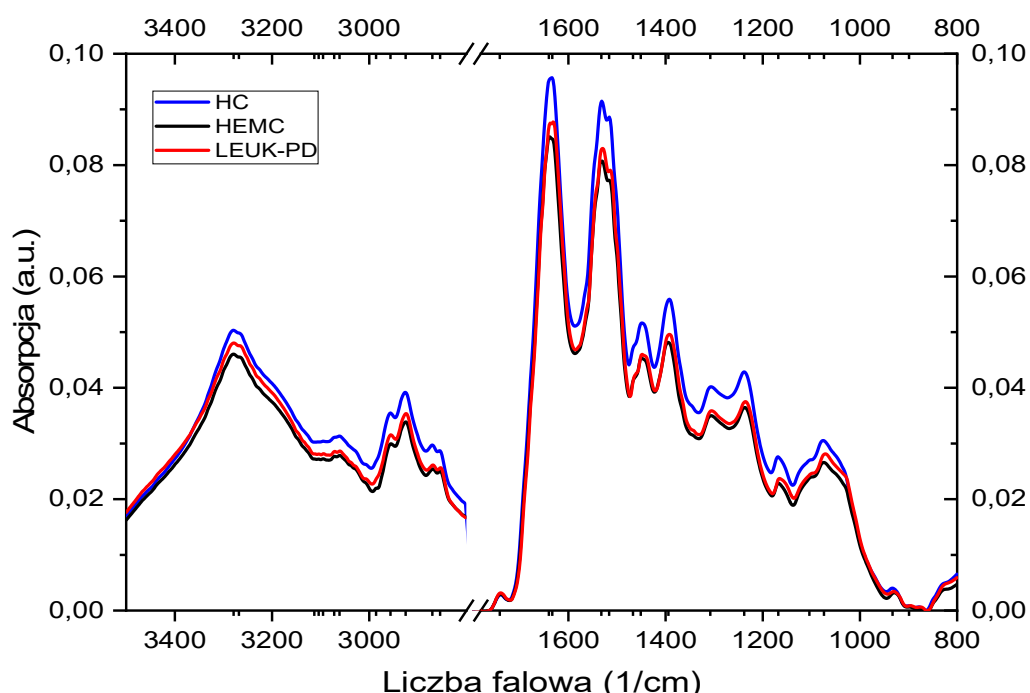
hierarchię klasyfikacji na podstawie cech zawartych w bazie danych wyjściowych. Wykorzystując częściej stosowane procedury aglomeracyjne HCA otrzymywany jest dendrogram, w którym obiekty coraz bardziej podobne łączone są kolejno ze sobą po utworzeniu macierzy podobieństwa klasyfikowanych tych obiektów [65-66]. W badaniu tym wykorzystano algorytm grupy parowanej (ang. unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) i euklidesowy indeks podobieństwa. W przypadku gdy wynik analizy HCA pozostawał w zgodności z wynikiem PCA i nie obserwowano wyraźnego klastrowania się wyników pacjentów z białaczką, dendrogramów nie publikowano.

IV. Wyniki

4.1. Analizy spektralne FT-IR– SUROWICA

4.1.1. Wyznaczenie pasm charakterystycznych dla widm FT-IR surowicy oraz porównanie wartości absorpcji

Na rycinach poniżej przedstawiono widma oryginalne (rycina 2.) surowicy uśrednione dla grupy zdrowych pacjentów (kolor niebieski - **HC**), pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi innymi niż choroby nowotworowe (kolor czarny - **HEMC**) oraz pacjentów z białaczką w momencie rozpoznania (kolor czerwony – **LEUK-PD**). Tabela 2. zawiera przypisy biochemiczne dla pików obserwowanych w widmach surowicy. W tabeli 3. zawarto położenia maksimów pików wraz z odpowiadającymi im wartościami absorpcji.



Rycina 2. Widma uśrednione dla surowicy zdrowej kontroli (**HC** – kolor niebieski), pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (**HEMC** – kolor czarny) oraz pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (**LEUK-PD** – kolor czerwony). Widma przedstawiono dla zakresu $3500\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ z pominięciem zakresu $2800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ wolnego od absorpcji podczerwieni dla próbek biologicznych.

Tabela 2. Przypisy biochemiczne dla pików obserwowanych w widmie FT-IR surowicy.

Pozycja maksimum [cm ⁻¹]	Przypisanie biochemiczne
3279	drgania rozciągające grup -NH: Amid A, białka, kwasy nukleinowe drgania rozciągające grup -OH: woda [67]
3113-3066	drgania rozciągające grup =CH: lipidy [67-68]
2988-2986	drgania asymetryczne rozciągające grup CH ₂ : lipidy [69]
2957-2956	drgania asymetryczne rozciągające grup CH ₂ : lipidy [70]
2926-2924	drgania asymetryczne rozciągające grup CH ₃ : lipidy [69]
2870-2869	drgania symetryczne rozciągające grup CH ₂ : lipidy [71]
2855-2854	drgania symetryczne rozciągające grup CH ₃ : lipidy [70-71]
1742-1739	drgania rozciągające C=O (estry): estry cholesterolu, fosfolipidy, trójglicerydy [72]
1640-1633	drgania rozciągające C=O: amid I, białka [73]
1532-1531	drgania zginające NH, rozciągające C-N: amid II, białka [74-75]
1517-1516	
1467-1466	drgania nożycowe grup CH ₂ : lipidy [76]
1451-1449	drgania zginające grup CH ₂ i CH ₃ : lipidy, białka [76-77]
1398-1395	drgania symetryczne rozciągające C=O grup COO ⁻ : białka/kwasy tłuszczowe [78-79]
1309-1306	drgania rozciągające C-N, zginające w płaszczyźnie NH: amid III, białka [80]
1239-1238	asymetryczne drgania rozciągające grup PO ₂ ⁻ : kwasy nukleinowe, fosfolipidy i białka fosforylowane [71,81]
1170-1168	drgania C=O: seryna, treonina, tyrozyna, białka [82-83]
1103-1102	drgania rozciągające grup C=O: węglowodany [84]
1078-1075	drgania rozciągające symetryczne grup PO ₂ ⁻ : DNA*, RNA**, fosfolipidy, białka fosforylowane [85]
934-931	lewoskrętna helisa kwasu DNA (Z-forma) [86]

*kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid, DNA); **kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid, RNA)

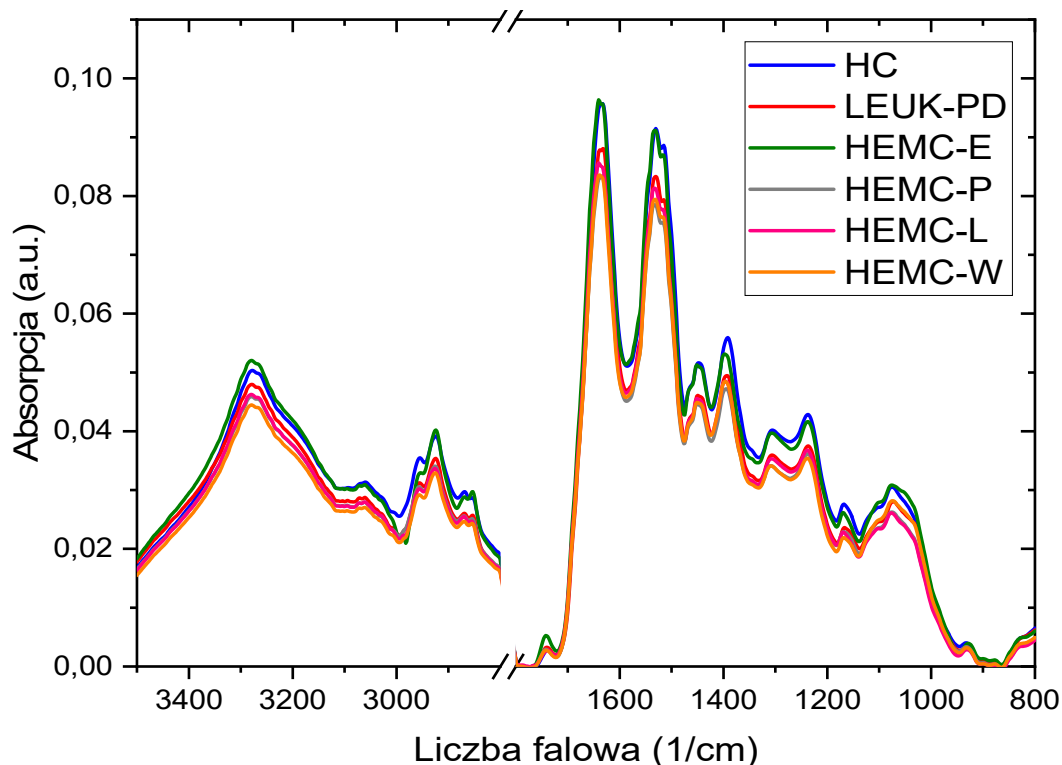
Tabela 3. Pozycja maksimów dla widm FT-IR surowicy zdrowej kontroli (**HC**), pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (**HEMC**) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (**LEUK-PD**) wraz z odpowiadającymi im wartościami absorpcji. Na czerwono zaznaczono piki, które nie były obserwowane w widmie dla co najmniej jednej z analizowanych grup.

Surowica HC		Surowica HEMC		Surowica LEUK-PD	
Pozycja Maks*	Absorpcja [a.u.]	Pozycja Maks*	Absorpcja [a.u.]	Pozycja maks*	Absorpcja [a.u.]
3279	0,05	3279	0,046	3279	0,048
3106	0,03	3105	0,027	3104	0,028
3094	0,03	3095	0,027	3095	0,028
3072	0,031	3072	0,028	3072	0,029
3067	0,031	3067	0,028	3067	0,029
2986	0,043	2986	0,022	2988	0,023
2956	0,035	2956	0,03	2957	0,032
2926	0,039	2925	0,034	2925	0,035
2870	0,03	2870	0,025	2870	0,026
2855	0,029	2854	0,025	2854	0,026
1739	0,003	1740	0,003	1742	0,003
-	-	1640	0,086	1640	0,088
1635	0,096	1633	0,086	1633	0,088
1531	0,091	1532	0,081	1532	0,083
1516	0,089	1517	0,077	1516	0,079
1467	0,047	1467	0,042	1467	0,042
1449	0,052	1451	0,045	1451	0,046
1395	0,056	1396	0,048	1395	0,05
1306	0,04	1308	0,035	1308	0,036
1238	0,043	1238	0,036	1239	0,038
1169	0,028	1169	0,023	1168	0,024
1103	0,027	1103	0,024	1103	0,024
1076	0,031	1076	0,027	1075	0,028
933	0,004	931	0,003	934	0,003
899	0,001	900	0,001	899	0,001

*Pozycja Maks – pozycja maksimum [cm⁻¹]

Dla grupy pacjentów **HEMC** sprawdzono czy istnieją różnice w wartości absorpcji dla wszystkich analizowanych zmiennych i ze względu na ich występowanie postanowiono wydzielić podgrupy ze względu na występujące zaburzenie hematologiczne, które analizowane będą jako oddzielne w dalszej części rozprawy.

Wyodrębniono 4 podgrupy zgodnie z obserwowanymi zaburzeniami, tj. anemia (**HEMC-E**), małopłytkowość (**HEMC-P**), leukopenia (**HEMC-L**) oraz pancytopenia (**HEMC-W**). Widma uśrednione dla podgrup **HEMC** przedstawiono na rycinie poniżej (rycina 3.).



Rycina 3. Widma uśrednione surowicy dla poszczególnych podgrup wydzielonych dla grupy **HEMC** (**HEMC-E** – kolor zielony, **HEMC-P** – kolor szary, **HEMC-L** – kolor różowy, **HEMC-W** – kolor pomarańczowy) oraz **HC** (kolor niebieski) i **LEUK-PD** (kolor czerwony). Widma przedstawiono dla zakresu 3500-800 cm^{-1} z pominięciem zakresu 2800-1800 cm^{-1} wolnego od absorpcji podczerwieni dla próbek biologicznych.

Tabela 4. zawiera pozycje maksimów wyznaczonych dla uśrednionych widm surowicy pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi wraz z odpowiadającymi im wartościami absorpcji.

Tabela 4. Pozycja maksimów dla widm FT-IR surowicy pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi **HEMC** z wyodrębnionymi podgrupami. Na czerwono zaznaczono piki, które nie obserwowano w widmie uśrednionym dla przynajmniej jednej z analizowanych podgrup.

Surowica HEMC-L		Surowica HEMC-W		Surowica HEMC-E		Surowica HEMC-P	
Max.*	Abs.**	Max.*	Abs.**	Max.*	Abs.**	Max.*	Abs.**
3279	0,046	3279	0,044	3279	0,052	3279	0,046
3106	0,027	3105	0,026	3105	0,03	3105	0,027
3096	0,027	3095	0,026	3095	0,03	3095	0,027
3071	0,028	3072	0,027	3072	0,031	3072	0,028
3067	0,028	3067	0,027	3067	0,031	3067	0,028
2986	0,022	-	-	2988	0,022	-	-
2956	0,03	2956	0,029	2954	0,033	2957	0,031
2926	0,034	2925	0,033	2924	0,04	2925	0,034
2870	0,025	2870	0,025	2869	0,029	2870	0,026
2855	0,025	2854	0,024	2854	0,03	2854	0,025
1740	0,003	1742	0,003	1742	0,005	1742	0,003
1640	0,086	1639	0,084	1640	0,096	-	-
1633	0,084	-	-	1633	0,096	1634	0,083
1532	0,081	1532	0,079	1531	0,091	1532	0,079
1517	0,077	1517	0,076	1516	0,087	1517	0,076
1467	0,042	1467	0,041	1467	0,047	1467	0,041
1451	0,045	1451	0,045	1451	0,051	1451	0,045
1396	0,048	1397	0,048	1398	0,053	1395	0,047
1307	0,035	1308	0,034	1307	0,04	1309	0,034
1238	0,037	1238	0,035	1238	0,042	1238	0,036
1170	0,023	1169	0,022	1170	0,026	1169	0,023
1103	0,023	1103	0,025	1103	0,028	1102	0,024
1078	0,026	1075	0,028	1076	0,031	1076	0,026
931	0,003	932	0,003	928	0,004	932	0,003
899	0	900	0	900	0,001	900	0,001

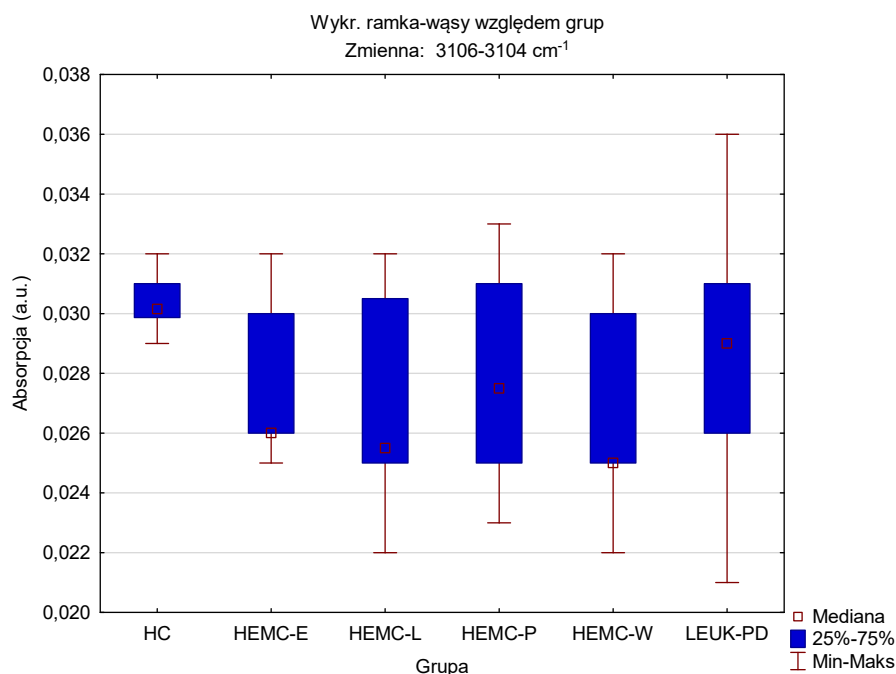
*Max. – pozycja maksimum [cm^{-1}]; **Abs. – absorpcja [a.u.]

Analizowano wykazywanie pasm absorpcji i wartość absorpcji w dwóch zakresach $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ oraz $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ nazywanym obszarem daktyloskopowym. Porównywano widma pod względem występujących pasm, położenia pików i wartości absorpcji odpowiadającej danemu maksimum. Analizując widma surowicy uśrednione dla wszystkich grup, zgodnie z oczekiwaniem, najwyższą absorpcję wykazano dla pasma amidu I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) oraz amidu II ($1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$). Dla pasm tych najwyższą absorpcję obserwowano dla widma grupy **HC** i **HEMC-E**, a najniższą dla widma grupy **HEMC-P**. Podobną zależność obserwowano dla zakresu $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, dla którego

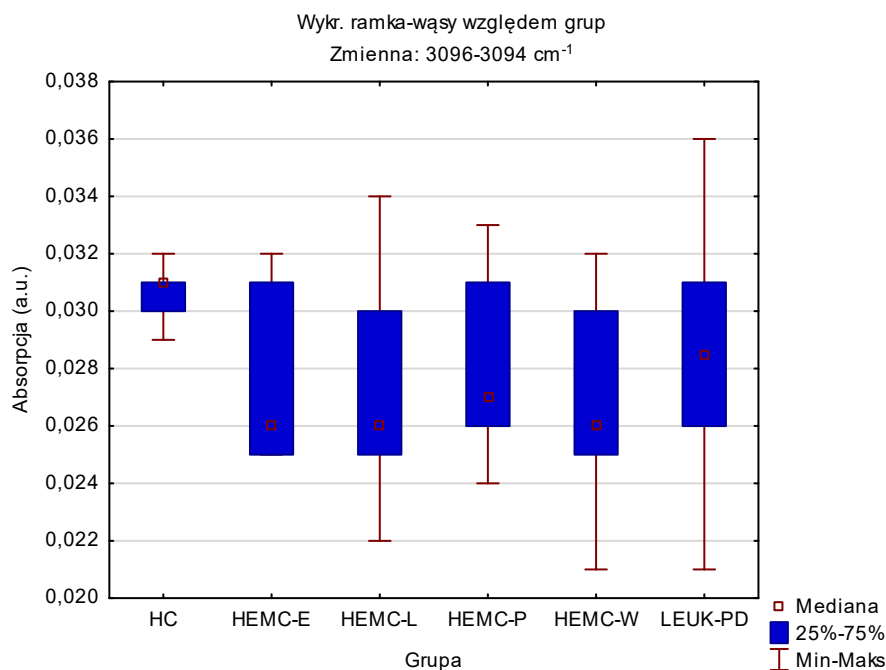
najwyższą absorpcję wykazano dla grupy **HC** i **HEMC-E**, przy czym najniższą dla grupy **HEMC-W**.

Dla zakresu $3300\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ przypisuje się drgania rozciągające grup -NH i grup hydroksylowych (-OH), amidu A (aminokwasy białkowe i kwasy nukleinowe) i wody. W zakresie tym zaobserwowano pik z maksimum przy pozycji 3279 cm^{-1} , dla którego wartość absorpcji nie różniła się istotnie statystycznie dla analizowanych grup.

Pasmu $3100\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ przypisywane są drgania grup metylenowych i olefinowych, obecnych w szczególności w długich łańcuchach kwasów tłuszczowych i głównie w lipidach [87]. Charakterystyczne dla drgań rozciągających grup =CH piki obserwowane są w zakresie $3100\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, natomiast dla grup -CH w zakresie $3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ liczby falowej. Dla pierwszego zakresu zaobserwowano piki z maksimum przy: $3106\text{--}3104\text{ cm}^{-1}$, $3096\text{--}3094\text{ cm}^{-1}$, $3072\text{--}3071\text{ cm}^{-1}$ i 3067 cm^{-1} . Dla piku z maksimum $3106\text{--}3104\text{ cm}^{-1}$ absorpcja dla **HEMC-L** była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do grupy **HC** ($p=0,048402$, rycina 4.). Dla piku z maksimum przy $3096\text{--}3094\text{ cm}^{-1}$ istotną różnicę zaobserwowano także dla grup **HEMC-L** i **HC** ($p=0,049788$, rycina 5.).

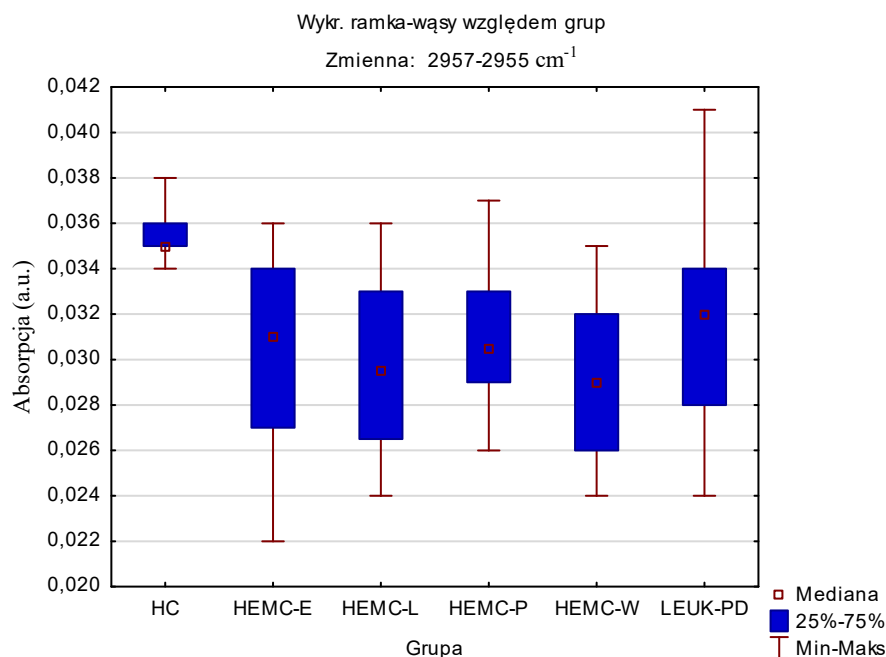


Rycina 4. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piku z maksimum przy pozycji $3106\text{--}3104\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0301$).

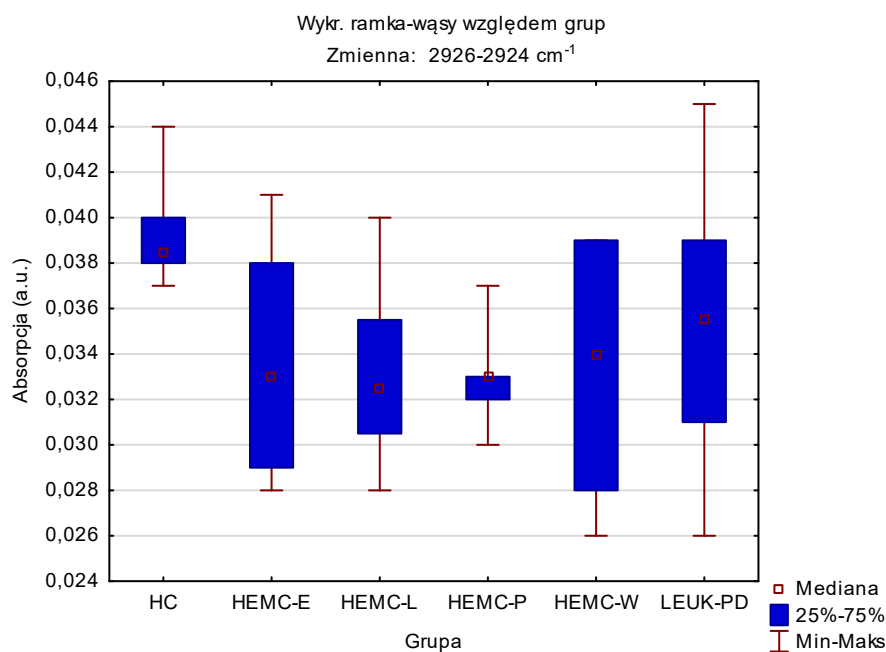


Rycina 5. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piku z maksimum przy pozycji 3096-3094 cm^{-1} widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0319$).

Przy około 3006 cm^{-1} obserwowane są pasma związane z rozciągającymi drganiami grup olefinowych ($=\text{CH}$) lipidów nienasyconych. Asymetrycznym drganiom rozciągającym grup CH_3 i CH_2 , w tej pracy, odpowiadają pasma z maksimami przy liczbach falowych 2926-2924 cm^{-1} i 2957-2956 cm^{-1} , przypisywane dla frakcji lipidów nasyconych i w mniejszym udziale dla białek, węglowodanów i kwasów nukleinowych. Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w wartości absorpcji dla grup **HC** i podgrupy **HEMC-L** (odpowiednio $p=0,002444$, $p=0,000596$) oraz **HC** i **LEUK-PD** ($p=0,029334$, $p=0,001943$) dla obydwu zmiennych. Dodatkowo dla piku z pozycją maksimum przy 2957-2956 cm^{-1} , absorpcja była istotnie statystycznie wyższa dla grupy **HC** w porównaniu z grupami **HEMC-W** i **HEMC-P** ($p=0,007270$, $p=0,042372$), a w przypadku piku przy 2926-2924 cm^{-1} dla **HC** i **HEMC-P** ($p=0,006436$)(ryciny 6-7.).

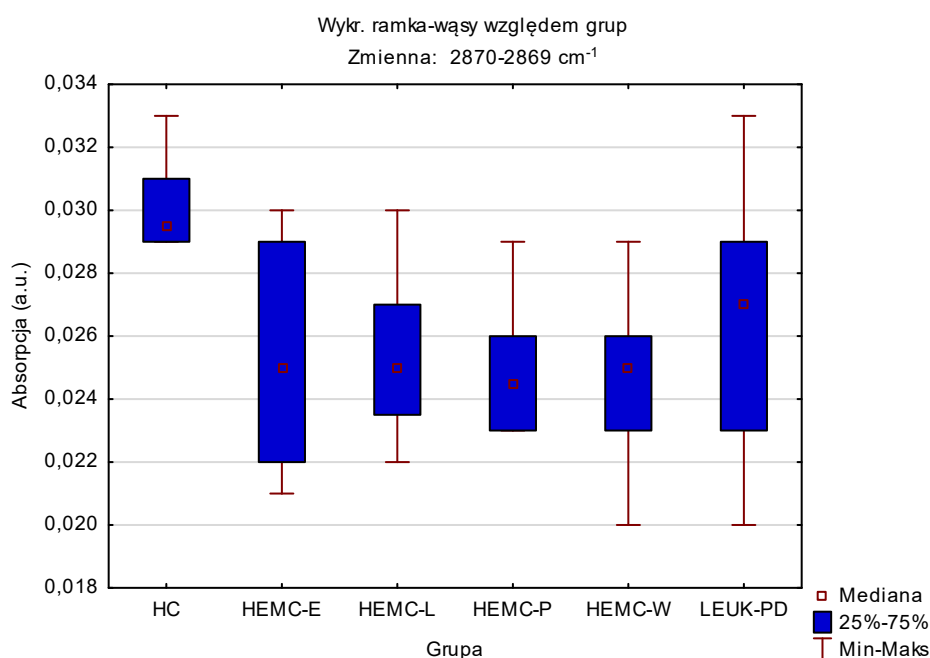


Rycina 6. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 2957-2956 cm^{-1} widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0003$).

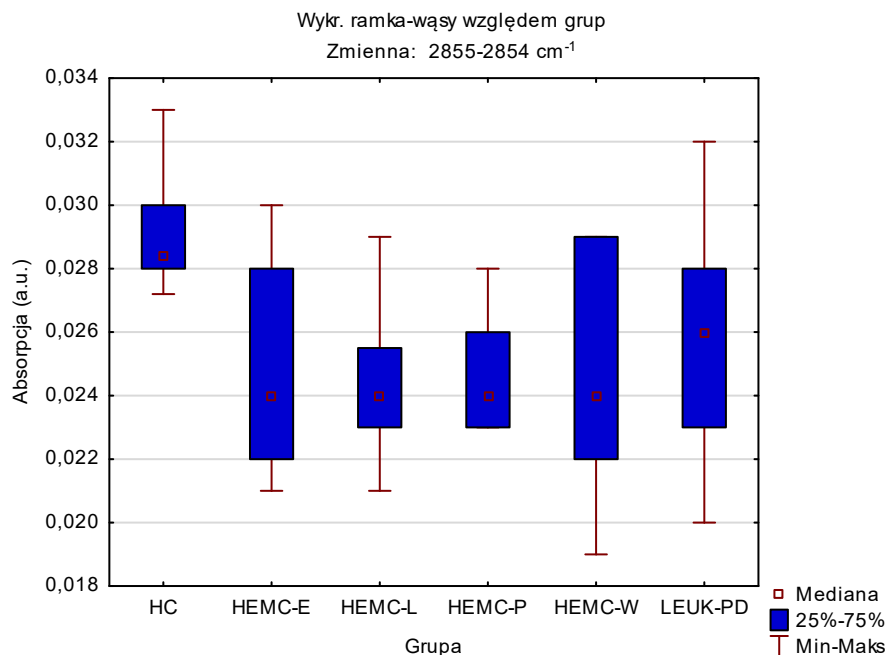


Rycina 7. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 2926-2924 cm^{-1} widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0013$).

Maksimum pasma powiązanego z symetrycznymi drganiami rozciągającymi grup CH_2 położone jest przy pozycji $2855\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$, natomiast z symetrycznymi drganiami rozciągającymi grup CH_3 maksimum obserwowano dla $2870\text{-}2869\text{ cm}^{-1}$ liczby falowej. Wartość absorpcji różniła się istotnie statystycznie pomiędzy **HC** i **LEUK-PD** ($2870\text{-}2869\text{ cm}^{-1}$ – $p=0,000906$; $2855\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$ – $p=0,013875$), a także dla zmiennej $2870\text{-}2869\text{ cm}^{-1}$ pomiędzy **HC** i wszystkimi podgrupami **HEMC** tj. **HEMC-E** ($p=0,035217$), **HEMC-L** ($p=0,000581$), **HEMC-P** ($p=0,002604$) i **HEMC-W** ($p=0,006713$) oraz dla zmiennej $2855\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$ pomiędzy **HC** i 3 podgrupami **HEMC** tj. **HEMC-W** ($p=0,044598$), **HEMC-L** ($p=0,000846$) i **HEMC-P** ($p=0,012007$)(ryciny 8-9.).

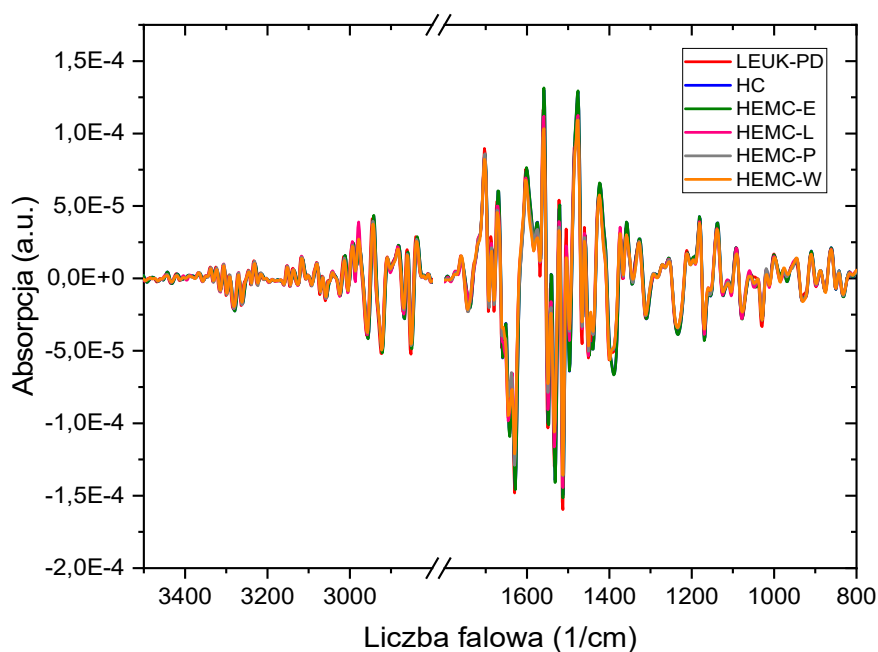


Rycina 8. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piku z maksimum przy pozycji $2870\text{-}2869\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0002$).



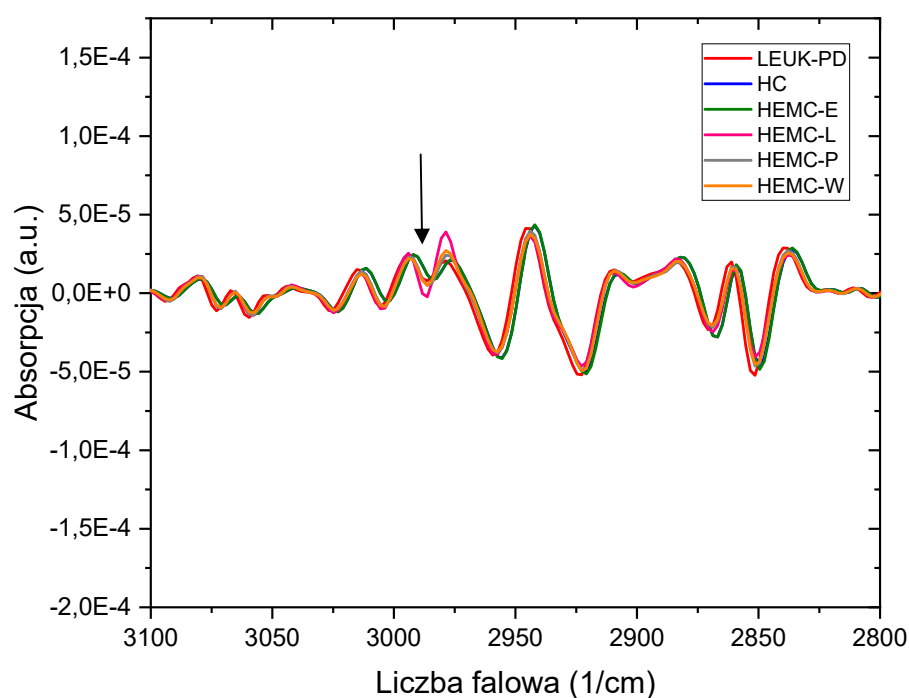
Rycina 9. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 2855-2854 cm^{-1} widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0009$).

Widmo drugiej pochodnej dla uśrednionych grup **HC** i **LEUK-PD** oraz podgrup **HEMC** przedstawiono na rycinie 10.



Rycina 10. Widmo drugiej pochodnej uzyskane dla surowicy dla zakresu 3500-800 cm^{-1} , z pominięciem zakresu 2800-1800 cm^{-1} pacjentów grupy **HC** (kolor niebieski) i **LEUK-PD** (kolor czerwony) oraz podgrup pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (**HEMC-E** – kolor zielony, **HEMC-P** – kolor szary, **HEMC-L** – kolor różowy, **HEMC-W** – kolor pomarańczowy).

Analizując widma oryginalne uśrednione dla grup dla zakresu 3300-2800 cm^{-1} stwierdzono, iż pik w zakresie 2988-2986 cm^{-1} dla podgrup **HEMC-W** i **HEMC-P** nie występuje bądź jest słabo zaznaczony. Uzyskano drugą pochodną dla widm oryginalnych i dla wszystkich próbek z sukcesem wyznaczona minima w zakresie 2988-2986 cm^{-1} (rycina 13.). Dla pozostałych pasm przesunięcia w kierunku wyższych bądź niższych liczba falowych mieściły się w przedziale od +3 do -3 cm^{-1} liczby falowej, a więc nie można je uznać za istotne ze względu na zastosowaną rozdzielczość 4 cm^{-1} .

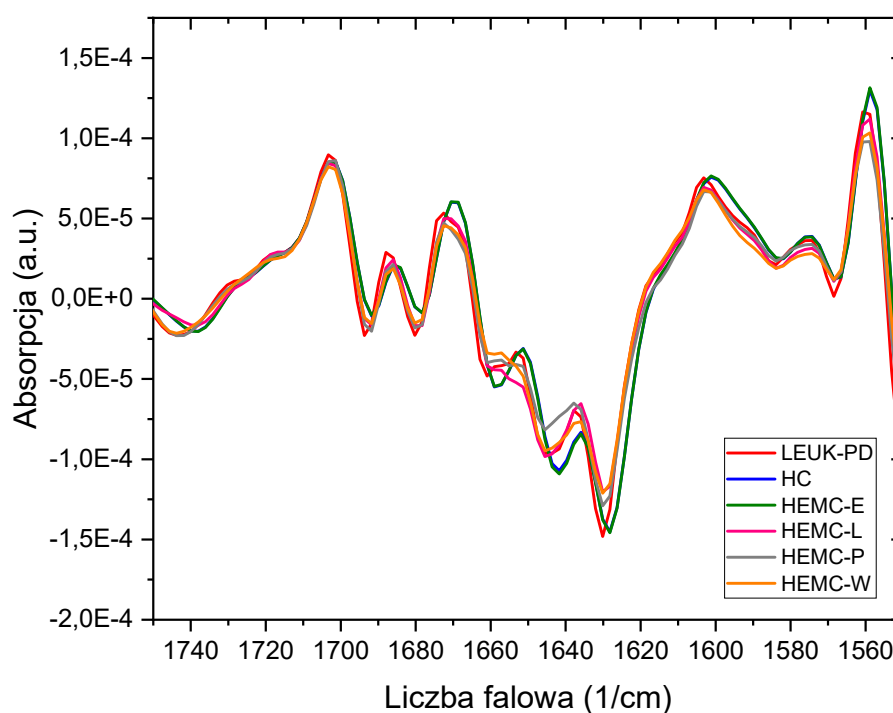


Rycina 11. Widmo drugiej pochodnej uzyskane dla surowicy dla zakresu 3100-2800 cm^{-1} . Strzałką wyznaczono minimum dla zakresu 2988-2986 cm^{-1} .

Przy pozycji 1742-1739 cm^{-1} obserwowano maksimum pasma powiązanego z drganiem rozciągającym wiązania grupy karbonylowej (C=O), występującymi m.in. w estrach cholesterolu, trógllicerydach i fosfolipidach.

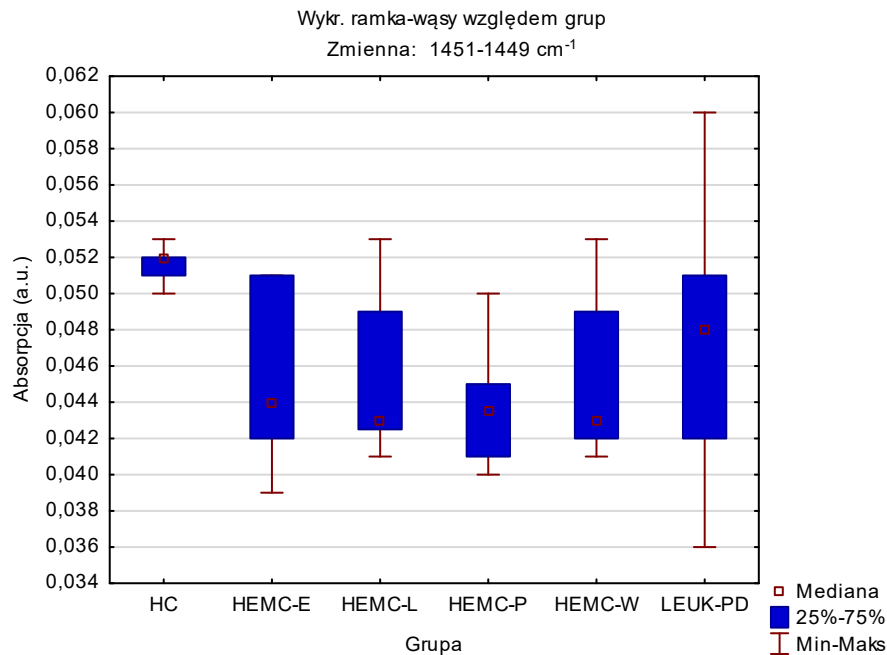
Dla pasma Amidu I (ok. 1700-1600 cm^{-1}) związanego z drganiami rozciągającymi grup C=O (białka) obserwowano dwa maksima: przy pozycji 1640-1639 cm^{-1} i 1635-1633 cm^{-1} , przy czym nie dla wszystkich uśrednionych widm uwidoczniono obydwa piki. Pik przy 1640-1639 cm^{-1} nie był obecny w widmie uśrednionym grup **HC** i **HEMC-P**, natomiast piku przy 1635-1633 cm^{-1} nie odnotowano dla uśrednionego widma

HEMC-W. Uzyskując widmo drugiej pochodnej dla zakresu 1700-1600 cm^{-1} wyznaczono minima, którym następnie przypisano na podstawie danych literaturowych drugorzędową strukturę białek. Wyniki analizy zostały przedstawione w dalszej części rozprawy. Widmo drugiej pochodnej dla zakresu 1700-1600 cm^{-1} przedstawia rycina 12.



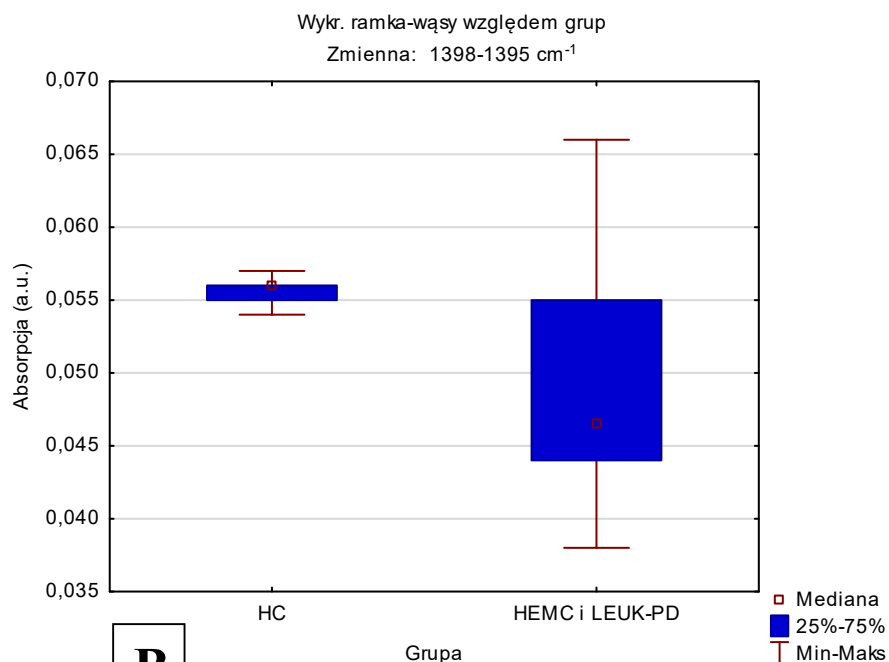
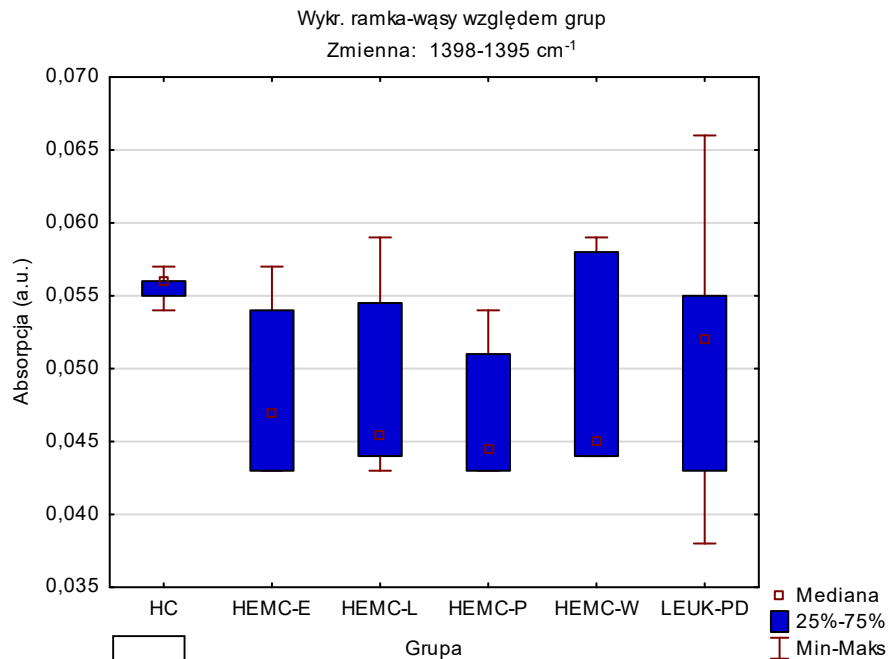
Rycina 12. Widmo drugiej pochodnej surowicy obejmujące zakres 1750-1550 cm^{-1} podgrup **HEMC** (**HEMC-E** – kolor zielony, **HEMC-P** – kolor szary, **HEMC-L** – kolor różowy, **HEMC-W** – kolor pomarańczowy) oraz grupy **HC** (kolor niebieski) i **LEUK-PD** (kolor czerwony).

Drgania zginające grup NH i drgania rozciągające C-N amidu drugorzędowego (białka) związane były z pikami o pozycji maksimum dla analizowanych próbek 1532-1531 cm^{-1} oraz 1517-1516 cm^{-1} , a dla zmiennych tych nie obserwowano żadnych istotnych statystycznie różnic w wartości absorpcji pomiędzy poszczególnymi grupami. Wartości absorpcji dla pików charakterystycznych dla drgań wychylających grup CH_2 i CH_3 (lipidy) z maksimum 1451-1449 cm^{-1} , była najwyższa dla **HC** i istotnie statystycznie różna pomiędzy **HC** i **LEUK-PD** ($p=0,001241$), a także **HC** i trzema podgrupami **HEMC**, tj. **HEMC-W** ($p=0,034907$), **HEMC-L** ($p=0,003492$) i **HEMC-P** ($p=0,000930$)(rycina 13.).



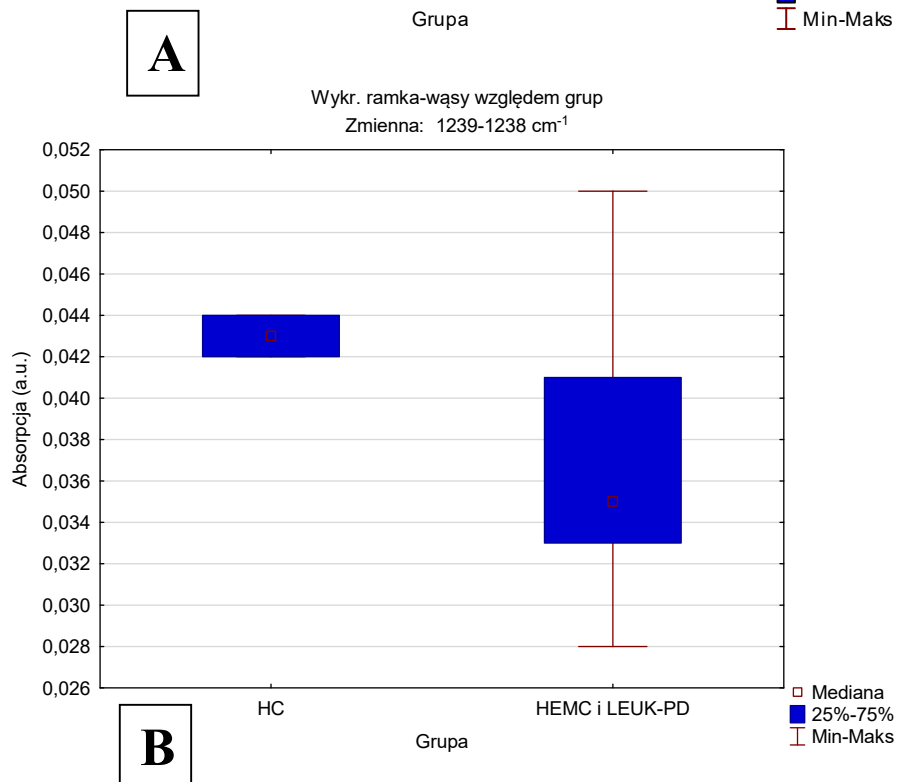
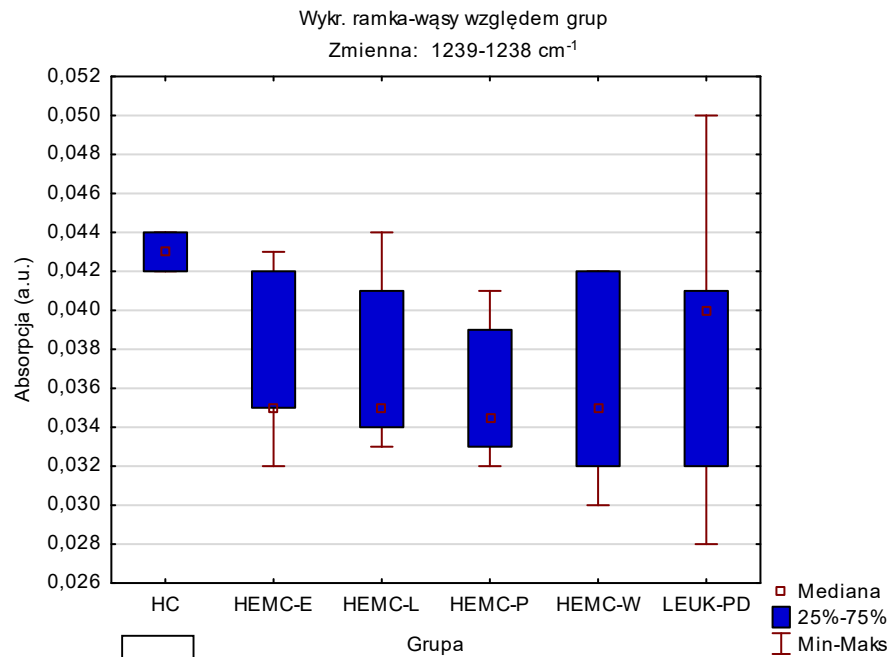
Rycina 13. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1451-1449 cm⁻¹ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - p=0,0004).

Powiązany dla drgań nożycowych grup CH₂ łańcuchów acylowych dwuwarstw lipidowych pik obserwowano przy 1467 cm⁻¹. Najwyższą wartość absorpcji stwierdzono dla uśrednionych widm grup **HC** i **HEMC-E**, a najniższą dla **HEMC-W** i **HEMC-P**. Wartość absorpcji dla pików charakterystycznych dla drgań rozciągających symetryczny C=O grup COO⁻ (białka, kwasy tłuszczowe) z maksimum przy 1398-1395 cm⁻¹ była najwyższa dla uśrednionego widma grupy **HC**, a najniższa dla grupy **HEMC-P**, a istotną statystycznie różnicę w wartości absorpcji stwierdzono dla **HC** i **HEMC-L** (p=0,012649) jak i **HEMC-P** (p=0,000921) oraz **LEUK-PD** (p=0,002332). Istotnie statystycznie różnicę wykazano także gdy porównano wartość absorpcji dla pików przy 1398-1395 cm⁻¹ dla grupy **HC** i pacjentów z wszystkimi zaburzeniami hematologicznym włącznie z białaczką (**HEMC** i **LEUK-PD**, czułość i specyficzność – 71,43 % i 81,40%, punkt odcięcia – 0,0555, AUC= 0,85507, p=0,000020)(rycina 14).

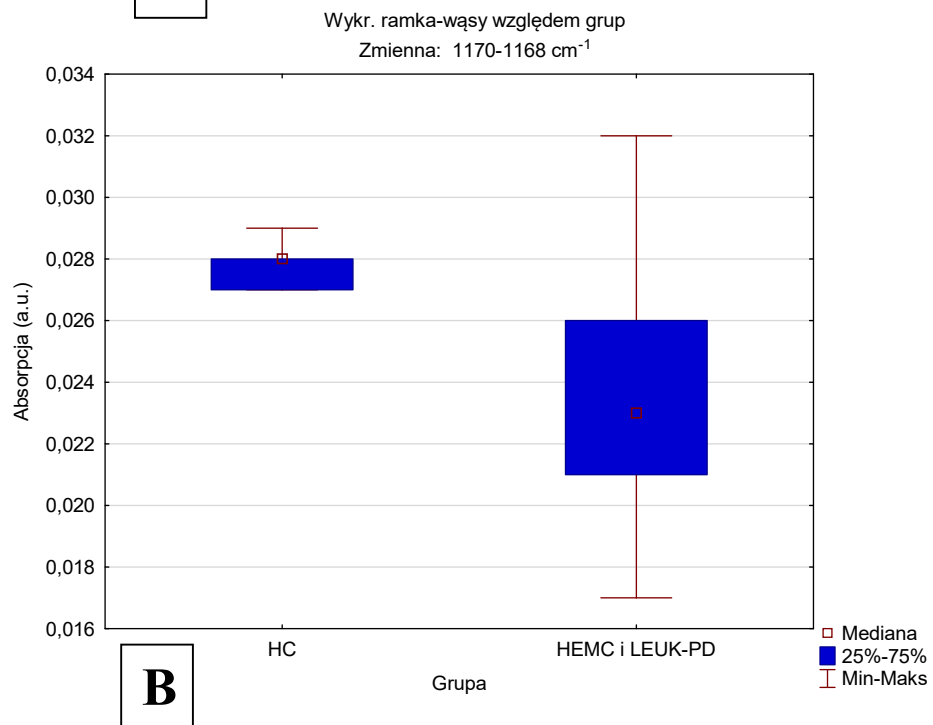
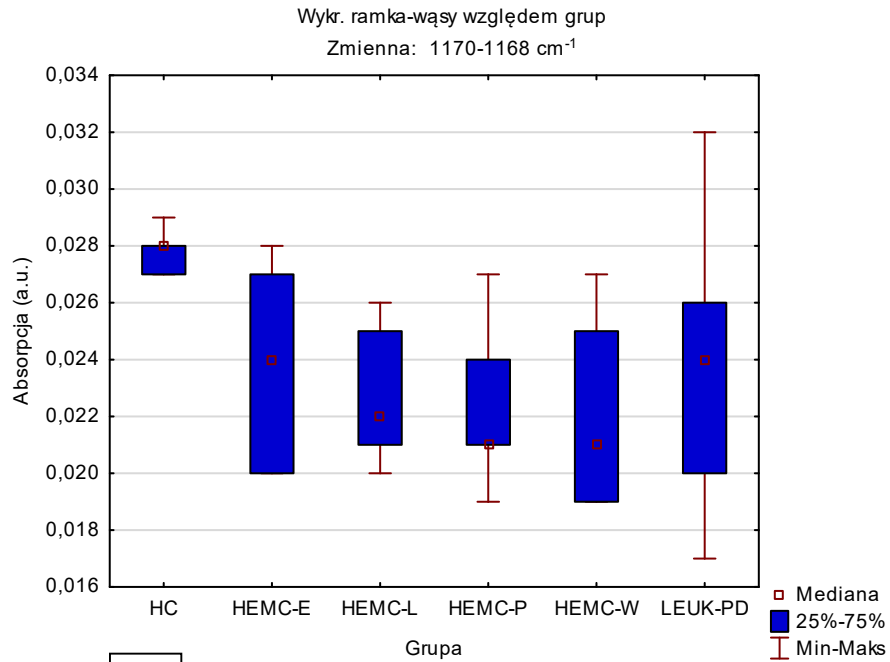


Rycina 14. A - Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1398-1395 cm^{-1} widma FT-IR surowicy (KW ANOVA, $p=0,0010$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla pików przy 1398-1395 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p=0,000020$). Różnice istotne statystycznie.

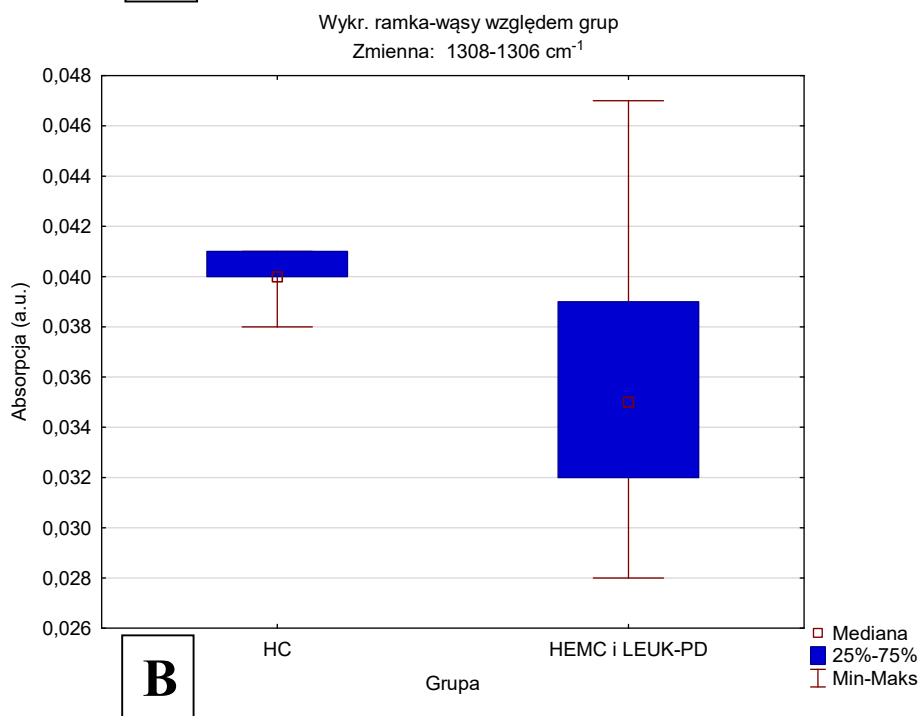
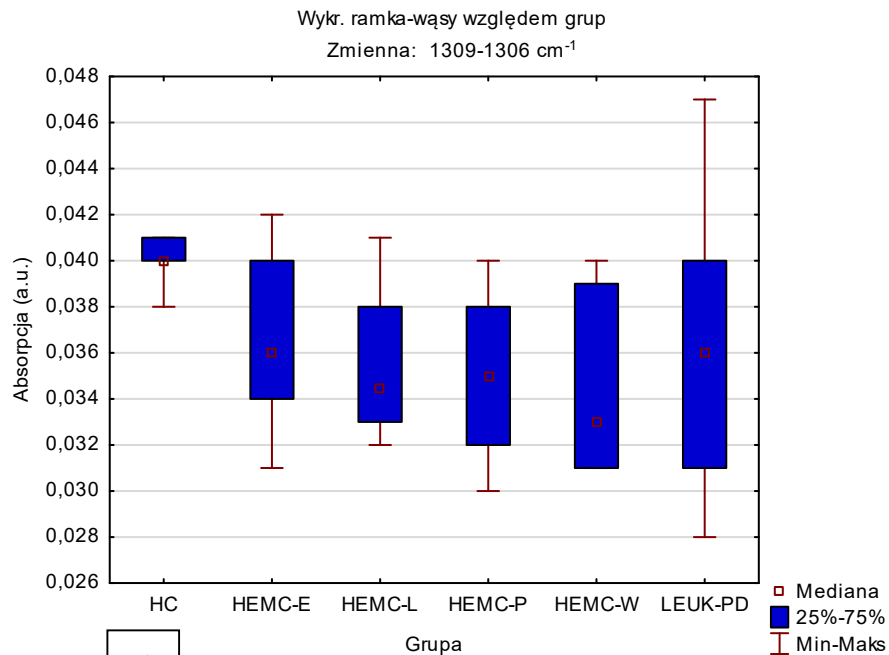
Dla zakresu odpowiadającemu drganiom rozciągającym asymetrycznym grup fosforanowych PO_2^- (kwasy nukleinowe, fosforylowane białka i fosfolipidy) maksimum pików położone było przy 1239-1238 cm^{-1} liczby falowej, a maksimum pasma charakterystycznego dla drgań grup C-O obecnych w aminokwasach białkowych takich jak tyrozyna, seryna, treonina, zaobserwowano przy pozycji 1170-1168 cm^{-1} . W zakresie tym najwyższą absorpcję wykazano dla uśrednionego widma **HC**, a najniższą dla widma podgrupy **HEMC-W**. Dla obydwu zmiennych istotnie statystycznie różnice w wartości absorpcji dotyczyły następujących grup: **HC** i **LEUK-PD** (zmienna 1239-1238 cm^{-1} – $p=0,000135$; zmienna 1170-1168 cm^{-1} – $p=0,000078$), **HC** i trzech podgrup **HEMC**: **HEMC-L** ($p=0,001255$; $p=0,000263$), **HEMC-P** ($p=0,000607$; $p=0,000563$) i **HEMC-W** ($p=0,008860$; $p=0,001673$). Maksimum pików powiązanego z drganiami charakterystycznymi dla amidu trzeciorzędowego (białka) zaobserwowano przy liczbie falowej 1309-1306 cm^{-1} . Podobnie jak dla pików z pozycjami maksimów przy 1239-1238 cm^{-1} i 1170-1168 cm^{-1} , dla pików przy 1309-1306 cm^{-1} wartość absorpcji różniła się pomiędzy **HC** i podgrup **HEMC**: **HEMC-L** ($p=0,013396$), **HEMC-P** ($p=0,008312$) oraz **HEMC-W** ($p=0,009675$), a także pomiędzy **HC** i **LEUK-PD** ($p=0,004032$). Dla pików przy 1309-1306 cm^{-1} , 1239-1238 cm^{-1} i 1170-1168 cm^{-1} widoczna różnica w wartości absorpcji dla pacjentów z grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi wyłącznie z ALL miała charakter istotnej statystycznie (odpowiednio $p=0,000034$, $p=0,000001$, $p<0,0001$)(ryciny 15-17). Czułość i specyficzność odróżnienia tych dwóch grup wynosiła 82,56% i 100% dla pików przy 1170-1168 cm^{-1} (punkt odcięcia - 0,0265, AUC=0,92982), 81,40% i 100% dla pików przy 1239-1238 cm^{-1} (punkt odcięcia - 0,0415, AUC=0,91113) oraz 78,57% i 76,74% dla pików przy 1309-1306 cm^{-1} (punkt odcięcia - 0,0395, AUC=0,8451).



Rycina 15. A - Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1239-1238 cm^{-1} (KW ANOVA - $p=0,0001$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla piksu przy 1239-1238 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p=0,000001$). Różnice istotne statystycznie.

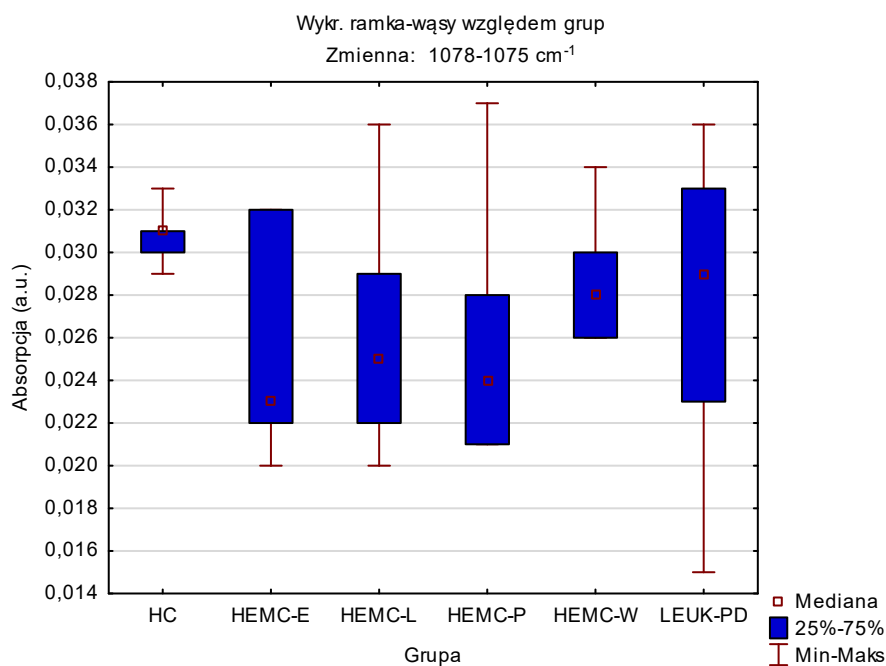


Rycina 16. A - Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1170-1168 cm^{-1} widma FT-IR surowicy (KW ANOVA - $p < 0,0001$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla piksu przy 1170-1168 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p < 0,0001$). Różnice istotne statystycznie.

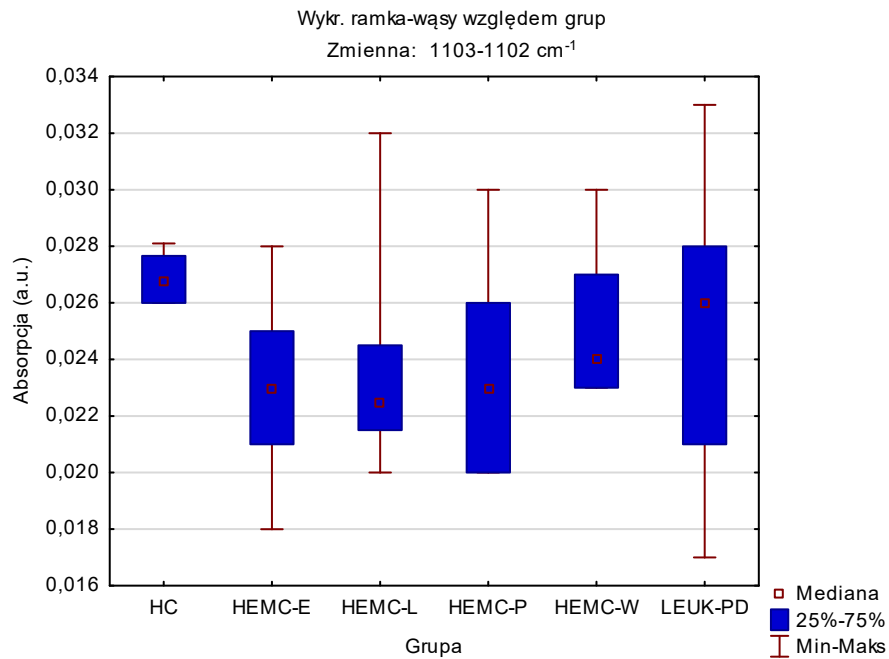


Rycina 17. A - Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1309-1306 cm^{-1} widma FT-IR surowicy (KW ANOVA - $p=0,0014$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla piksu przy 1309-1306 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p=0,000034$). Różnice istotne statystycznie.

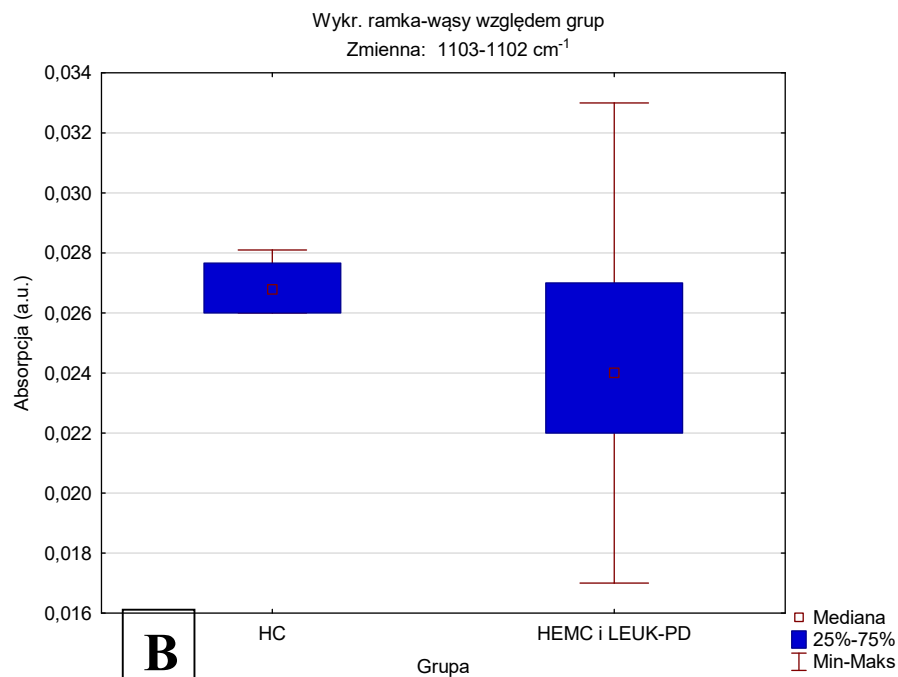
Dla pasma charakterystycznego dla drgań symetrycznych rozciągających grup fosforylowych DNA, RNA, fosfolipidów i białek fosforylowanych maksimum odnotowano w zakresie 1078-1075 cm^{-1} liczby falowej. Istotne statystycznie różnice w wartości absorpcji dla tego piku ograniczały się do grup **HC** i **HEMC-L** ($p=0,004396$, rycina 18.). Podobną zależność stwierdzono dla piku przy pozycji 1103-1102 cm^{-1} liczby falowej, przypisywanemu dla rozciągających drgań grup C=O ($p=0,020867$, rycina 19.). Istotną statystycznie różnicę obserwowano także gdy porównano wartość absorpcji dla pacjentów z grupy **HC** i pacjentów z wszystkimi zaburzeniami hematologicznymi włączając **LEUK-PD** ($p=0,001524$, czułość - 73,27 %, specyficzność - 71,42 %, punkt odcięcia - 0,02618, rycina 19.). Obserwowany przy pozycji 934-931 cm^{-1} liczby falowej pik przypisywany jest lewoskrętnej helisie DNA. Dla tego piku wartości absorpcji różniły się istotnie statystycznie dla grup **HC** i **HEMC-L** ($p=0,043127$), a także **HC** i **LEUK-PD** ($p=0,010131$)(rycina 20.).



Rycina 18. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piku z maksimum przy pozycji 1078-1075 cm^{-1} widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0159$).

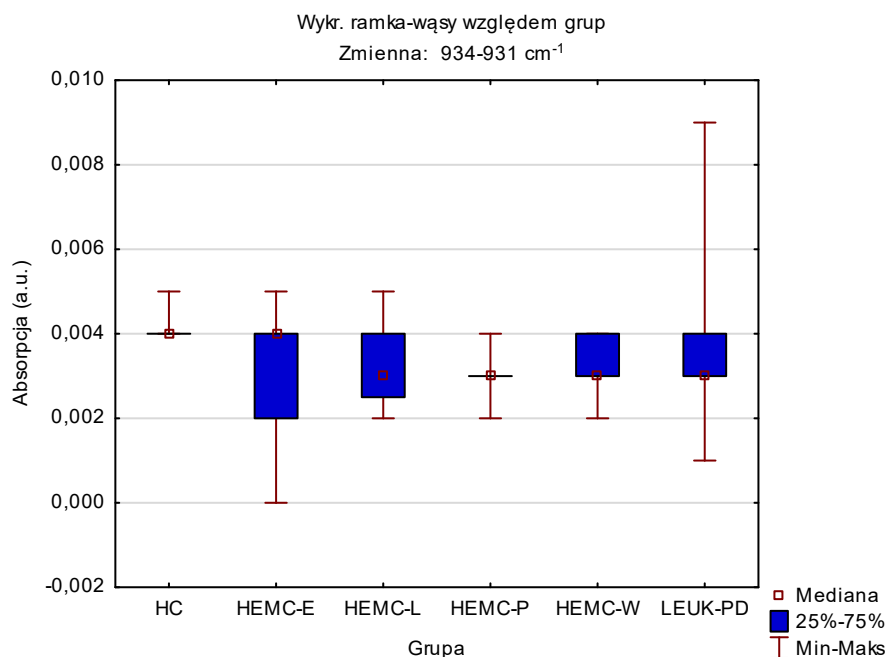


A



B

Rycina 19. A -Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1103-1102 cm^{-1} (KW ANOVA - $p=0,0156$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla piksu przy 1103-1102 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p=0,001524$). Różnice istotne statystycznie.



Rycina 20. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 934-931 cm⁻¹ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - p=0,0102).

Na podstawie krzywych ROC wyznaczono czułość i specyficzność dla wszystkich zmiennych, dla których stwierdzono istotną statystycznie różnicę w wartości absorpcji. Dane zawarto w tabeli poniżej (tabela 4.) Znakiem * oznaczono pik dla których czułość i specyficzność osiągnęły wartość co najmniej 80%.

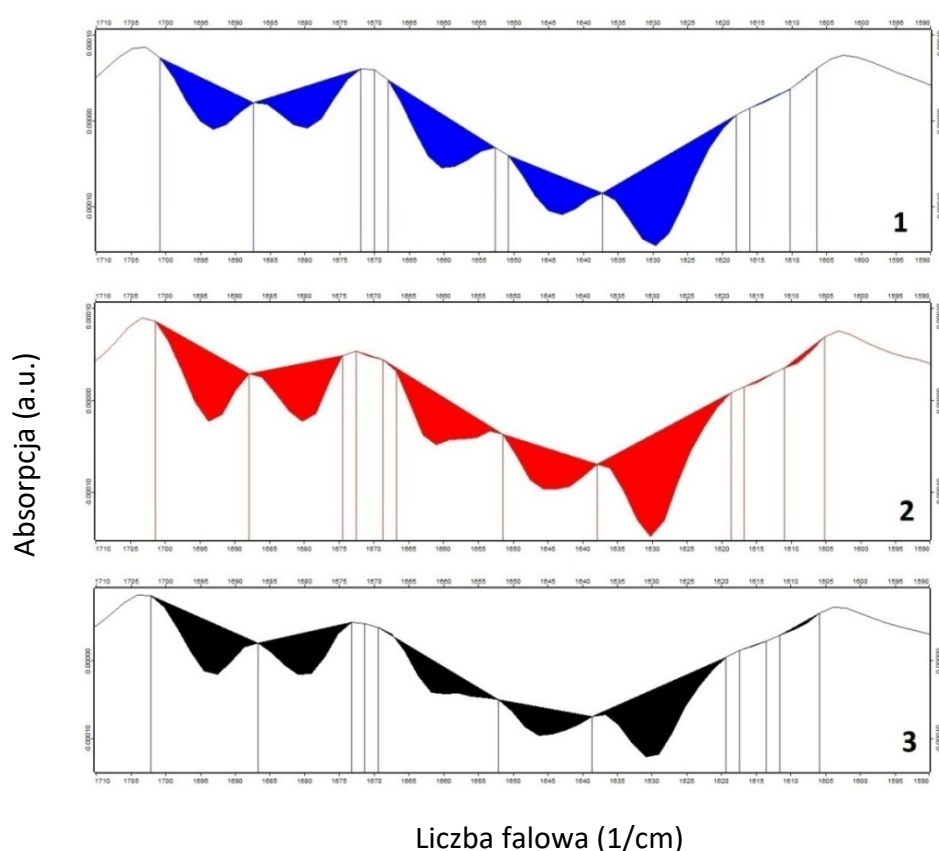
Tabela 4. Zestawienie wartości czułości i specyficzności oraz punktu odcięcia i AUC dla poszczególnych zmiennych dla widm FT-IR surowicy.

Pik [cm ⁻¹]	Grupa	Specyficzność [%]	Czułość [%]	Punkt odcięcia [a.u.]	AUC
3106-3104	HC vs. HEMC-L	85,71	68,75	0,02929	0,77902
3095-3094	HC vs. HEMC-L	100	68,75	0,0285	0,80357
2955-2954	HC vs. LEUK-PD	92,86	76,09	0,0345	0,84938
	HC vs. HEMC-L	100*	87,5*	0,0335	0,93527
	HC vs. HEMC-W	100*	85,71*	0,033	0,95408
	HC vs. HEMC-P	92,86*	88,89*	0,0345	0,89683
2927-2925	HC vs. LEUK-PD	92,86	63,04	0,0375	0,7632

	HC vs. HEMC-P	92,86*	100*	0,0375	0,99603
	HC vs. HEMC-L	100*	81,25*	0,0285	0,91966
2870	HC vs. LEUK-PD	100	71,74	0,0285	0,85248
	HC vs. HEMC-L	100*	87,5*	0,027	0,94643
	HC vs. HEMC-E	100	71,43	0,0285	0,87755
	HC vs. HEMC-P	100*	88,89*	0,0275	0,97222
	HC vs. HEMC-W	100*	85,71*	0,0275	0,96429
2855-2854	HC vs. LEUK-PD	100	67,39	0,0271	0,84938
	HC vs. HEMC-L	100*	87,5*	0,0266	0,94196
	HC vs. HEMC-W	100	71,43	0,0261	0,82653
	HC vs. HEMC-P	100*	88,89*	0,0266	0,96429
1451-1449	HC vs. LEUK-PD	78,57	67,39	0,5050	0,84938
	HC vs. HEMC-L	100	75	0,049	0,89063
	HC vs. HEMC-W	100*	85,71*	0,0495	0,86735
	HC vs. HEMC-P	100*	88,89*	0,0490	0,9881
1398-1395	HC vs. LEUK-PD	71,43	76,09	0,0555	0,8354
	HC vs. HEMC-L	92,86	75	0,051	0,87946
	HC vs. HEMC-P	92,86*	100*	0,0545	0,99603
1308-1306	HC vs. LEUK-PD	78,57	69,57	0,037	0,79348
	HC vs. HEMC-L	92,86*	81,82*	0,0365	0,91295
	HC vs. HEMC-P	92,86*	100*	0,0385	0,99206
	HC vs. HEMC-W	78,57	85,71	0,0395	0,92347
1239-1238	HC vs. HEMC-P	100*	100*	0,0415	1
	HC vs. LEUK-PD	100	76,09	0,0415	0,87578
	HC vs. HEMC-L	100*	93,75*	0,0415	0,94643
	HC vs. HEMC-W	100	71,43	0,0380	0,94898
1170-1168	HC vs. LEUK-PD	100	76,09	0,0265	0,89752
	HC vs. HEMC-L	100*	100*	0,0265	1
	HC vs. HEMC-P	100*	100*	0,0260	1
	HC vs. HEMC-W	100*	85,71*	0,0260	0,96939
1103-1102	HC vs. HEMC-L	100*	81,25*	0,0255	0,86607
1078-1075	HC vs. HEMC-L	100	75	0,0285	0,85714
934-931	HC vs. HEMC-L	100	68,75	0,0035	0,80357
	HC vs. LEUK-PD	100	67,39	0,0035	0,79193

4.1.2. Określenie drugorzędowej struktury białek – analiza pasm składowych zakresu amidu I widm FT-IR surowicy

Widmo drugiej pochodnej w zakresie $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ poddano integracji dla ustalenia procentowej zawartość poszczególnych struktur drugorzędowych białek. Rycina poniżej przedstawia zakresy integracji dla widm uśrednionych grupy kontrolnej (kolor niebieski, oznaczenie – 1), pacjentów z białaczką (kolor czerwony – 2) i pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (kolor czarny – 3). Pionowe dyskryminatory wyznaczają obszar integracji dla poszczególnych zmiennych (rycina 21.).



Rycina 21. Schemat integracji widma FT-IR surowicy w zakresie $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ na przykładzie uśrednionych widm **HC** (oznaczone na rycinie numerem 1), **HEMC** (numer 2) i **LEUK-PD** (numer 3).

Pozycje minimum dla poszczególnych uśrednionych widm **HC**, podgrup **HEMC** i **LEUK-PD** uwzględniono w tabeli 5. Dla uśrednionych widm nie odnotowano istotnych statystycznie przesunięć w położeniu minimum, które mieściły się w przedziale $\pm 2\text{ cm}^{-1}$.

Tabela 5. Wyznaczone pozycje minimum w zakresie 1700-1600 cm^{-1} widma FT-IR surowicy uśrednionych dla analizowanych grup.

Struktura drugorzędowa		Pozycja minimum [cm^{-1}]							
		β -karta / β -harmonijka	β -zakręt	β -zakręt	α -helisa	nieuporządkowana	β -karta / β -harmonijka	grupy boczne aminokwasów	agregaty β
Grupa	HC	1692	1679	1671	1660	1646	1631	1615	1608
	LEUK-PD	1694	1680	1671	1661	1645	1630	1615	1608
	HEMC-E	1692	1680	1670	1660	1644	1629	1615	1608
	HEMC-P	1693	1680	1671	1661	1646	1631	1615	1608
	HEMC-L	1693	1680	1671	1661	1645	1630	1614	1608
	HEMC-W	1693	1679	1671	1661	1644	1630	1614	1608

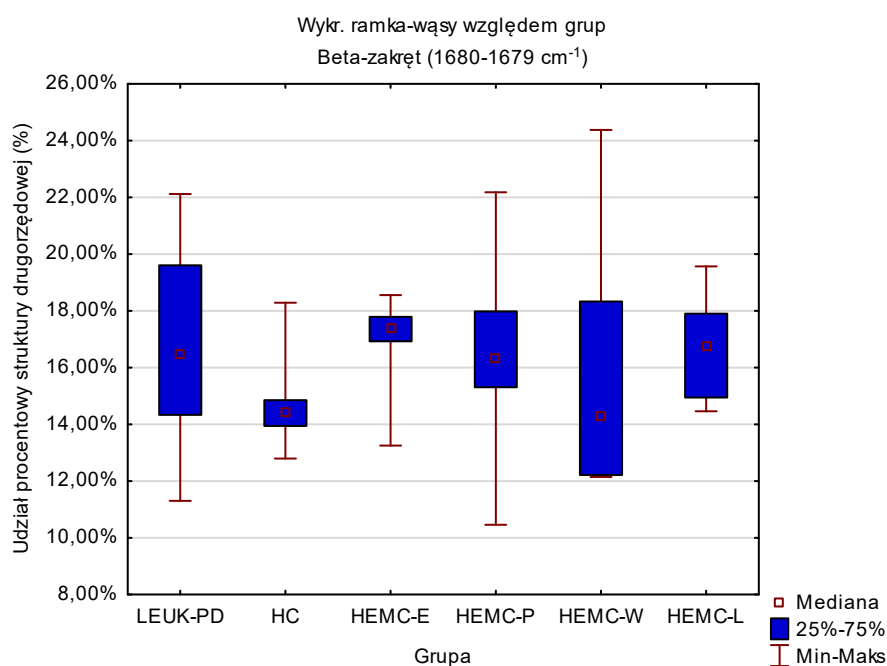
W analizowanym zakresie ujawniono osiem minimów, którym na podstawie danych literaturowych, przypisano odpowiednie struktury [75,88]. Minima charakterystyczne dla struktury drugorzędowej β -karki obserwowano w badanych widmach uśrednionych dla grup przy liczbach falowych 1694-1692 cm^{-1} i 1631-1629 cm^{-1} . Strukturze β -zakrętu odpowiadały dwa zakresy z minimami w zakresach 1680-1679 cm^{-1} i 1671-1670 cm^{-1} . Dodatkowo przy 1609-1608 cm^{-1} obserwowano minima, które przypisuje się zagregowanej strukturze β oraz przy 1615-1614 cm^{-1} odpowiadającym grupom bocznym reszt aminokwasów. Dla struktury α -helisy minima obserwowano przy 1661-1660 cm^{-1} , a przypisywane nieuporządkowanym strukturom przy 1646-1644 cm^{-1} . Dla wszystkich próbek dane uzyskane po integracji zostały przeliczone na procentowy udział w odniesieniu do sumy zintegrowanych powierzchni wszystkich konformacji i dla nich też dokonano dalszych analiz. W tabeli poniżej przedstawiono zestawienie udziału procentowego poszczególnych struktur obliczonych dla uśrednionych widm grup (tabela 6.)

Tabela 6. Zestawienie procentowego udział poszczególnych struktur drugorzędowych dla uśrednionych widm analizowanych grup.

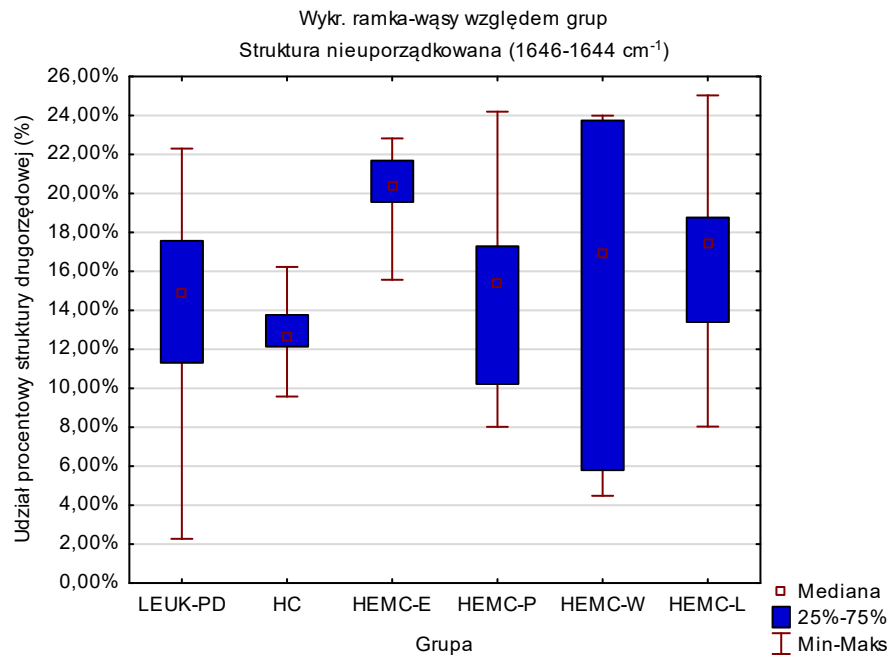
Grupa	Średni procentowy udział struktury drugorzędowej białek [%]					
	β -kartka (1694-1692 cm^{-1})	β -zakręt (1680-1679 cm^{-1})	β -zakręt (1671-1670 cm^{-1})	α -helisa (1661-1660 cm^{-1})	Struktura nieuporządkowana (1646-1644 cm^{-1})	β -kartka (1631-1629 cm^{-1})
LEUK-PD	19,56%	15,46%	0,02%	17,46%	14,44%	32,83%
HC	16,06%	14,76%	0,00%	20,28%	13,87%	34,73%
HEMC-E	18,55%	17,82%	0,05%	16,88%	15,01%	30,49%
HEMC-P	18,50%	18,64%	0,00%	15,20%	10,02%	37,15%
HEMC-W	18,17%	19,24%	0,00%	13,12%	15,01%	34,14%
HEMC-L	22,31%	18,99%	0,00%	13,43%	14,73%	30,18%

Dla wszystkich analizowanych widm uśrednionych dla grup dominujący udział procentowy spośród wszystkich struktur drugorzędowych zaobserwowano dla struktury β -kartki z minimum przy 1631-1629 cm^{-1} , przy czym najwyższą średnią wartość odnotowano dla **HEMC-W** (37,15%), a najniższą dla **HEMC-L** (30,18%). Dla struktury β -kartki z minimum przy 1694-1692 cm^{-1} średni udział procentowy mieścił się w zakresie od 16,06% do 22,31%, najwyższą średnią odnotowano dla grupy **HEMC-L**, a najniższą dla grupy **HC**. Z kolei dla struktury β -zakrętu (minimum przy 1680-1679 cm^{-1}) zakres ten mieścił się w przedziale od 14,76% do 19,24%, najwyższą wartość odnotowano dla grupy **HEMC-W**, najniższą dla **HC**, a różnica w procentowej zawartości tej struktury była bliska istotności statystycznej dla grup **HC** i **LEUK-PD** ($p=0,061787$)(rycina 22.). Wartość udziału procentowego struktury nieuporządkowanej różniła się istotnie statystycznie pomiędzy **HEMC-E** i **LEUK-PD** ($p=0,030408$, czułość i specyficzność dla punktu odcięcia 19,40% - 85,71% i 90,91%, $\text{AUC}=0,89935$), a także **HEMC-E** i **HC** ($p=0,002077$, punkt odcięcia - 17,89% - czułość i specyficzność - 85,71% i 100%, $\text{AUC}=0,97959$, rycina 23.), przy czym najwyższą średnią cechowała grupy **HEMC-E** i **HEMC-W** (15,01%), a najniższą grupę **HEMC-P** (10,02%). Najwyższy średni udział procentowy dla struktury α -helisy odnotowano dla widma **HC** (20,28%), a najniższy dla **HEMC-W** (13,12%). Pomimo, iż różnica w udziale struktury alfa-helisy pomiędzy **HEMC-W** i **LEUK-PD** nie osiągnęła istotności statystycznej uzyskano czułość i specyficzność odróżnienia tych dwóch grup wynosiły odpowiednio 75% i 85,71% ($\text{AUC}=0,77273$) dla wartości odcięcia 11,663%. Istotną statystycznie różnicę w wartości procentowego udziału tej struktury stwierdzono dla **HC** i **HEMC-L** ($p=0,022267$, punkt

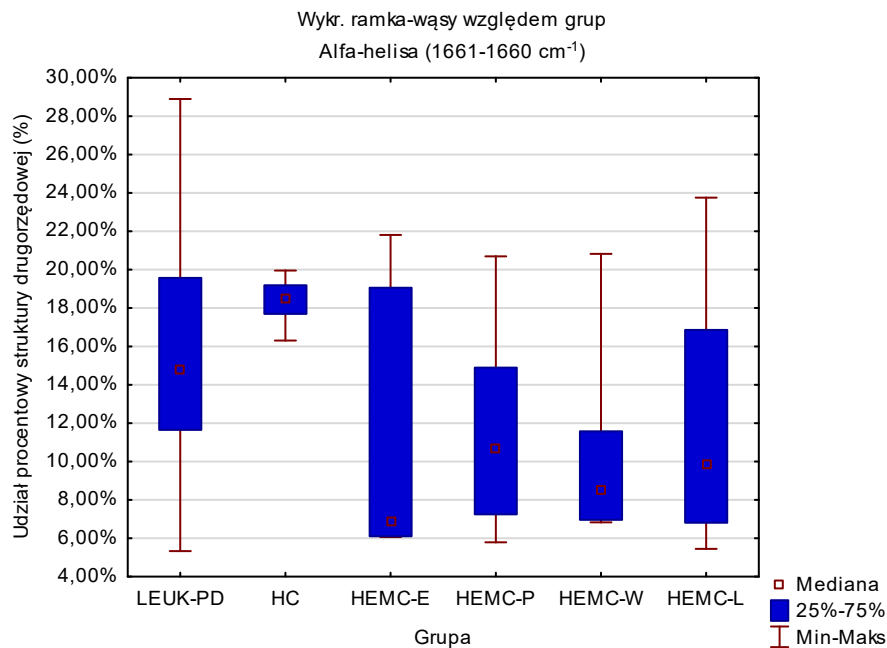
odcinka 14,84%, czułość i specyficzność – 66,67% i 100%, AUC=0,8381)(rycina 24.). Dla wszystkich grup strukturą drugorzędową o najniższej wartości udziału był β -zakręt z minimum przy 1671-1670 cm^{-1} , z wartością poniżej 1% przy czym dla grup **HC**, **HEMC-P**, **HEMC-W** i **HEMC-L** był najniższy i zbliżony do 0%, a najwyższy dla **HEMC-E** (0,05%). Zauważono iż, średni udział procentowy α -helisy dla grupy **HC** był wyższy od tego wyznaczonego dla β -zakrętu (minimum 1680-1679 cm^{-1}) i β -kartki, a dla grupy **LEUK-PD** wyższy niż dla struktury β -zakrętu (minimum 1680-1679 cm^{-1}). Dodatkowo dla grupy **HEMC-W**, w odróżnieniu od pozostałych grup, średni procentowy udział struktury nieuporządkowanej był wyższy od struktury α -helisy. Gdy porównano średni procentowy udział struktury β -zakrętu (minimum 1680-1679 cm^{-1}) tylko dla grup **HEMC-P** i **HEMC-W** był on wyższy od β -kartki (minimum 1694-1692 cm^{-1}). Brak istotnych statystycznych różnic wynikających z wyżej opisanych zależności może tłumaczyć znaczący rozrzut danych dla pojedynczych prób w grupach co zobrazowano na rycinie 25.



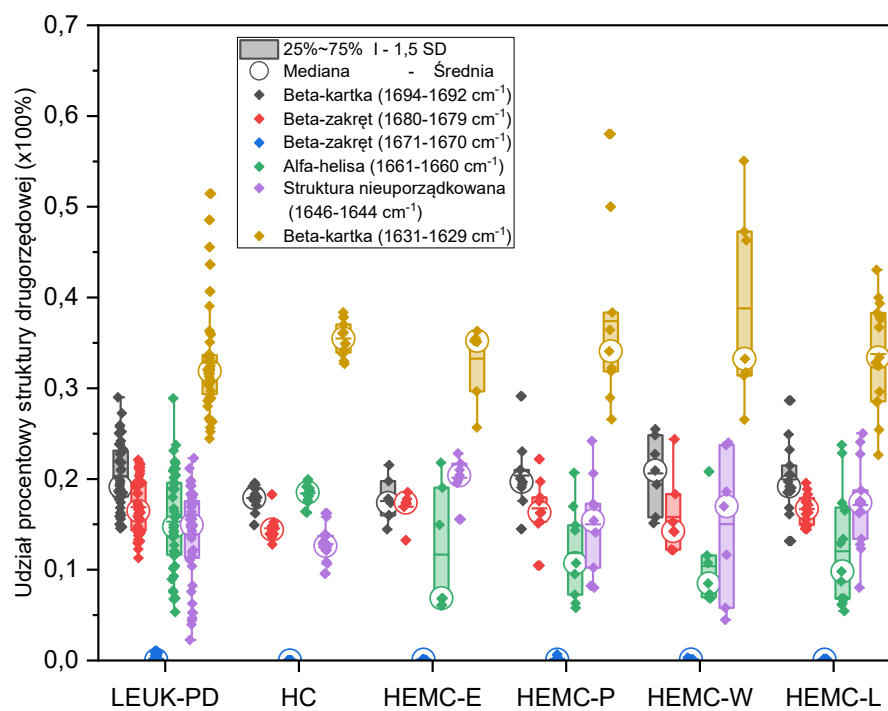
Rycina 22. Wykres porównujący procentowy udział struktury drugorzędowej β -zakrętu dla grup z minimum przy pozycji 1680-1679 cm^{-1} . Różnica bliska istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0378$).



Rycina 23. Wykres porównujący procentowy udział struktury nieuporządkowanej dla grup z minimum przy pozycji 1646-1644 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0028$).



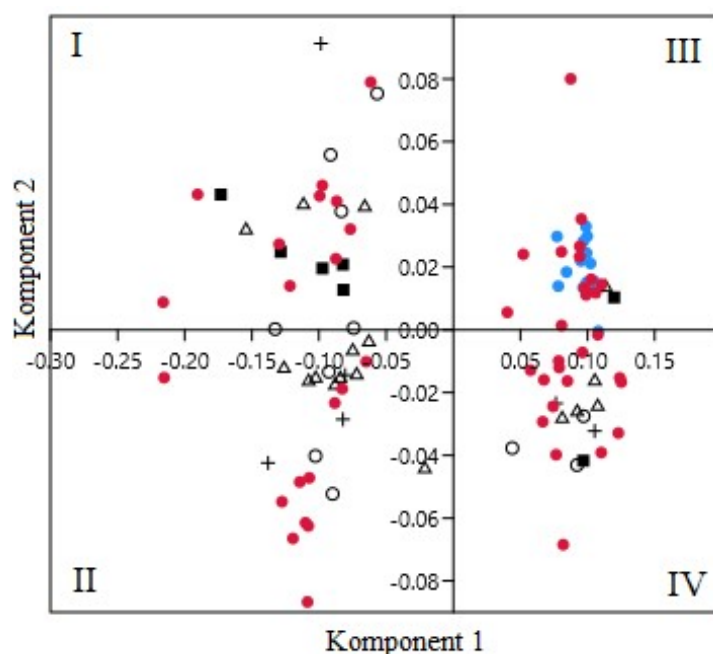
Rycina 24. Wykres porównujący procentowy udział struktury α -helisy dla grup z minimum przy pozycji 1661-1660 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0035$).



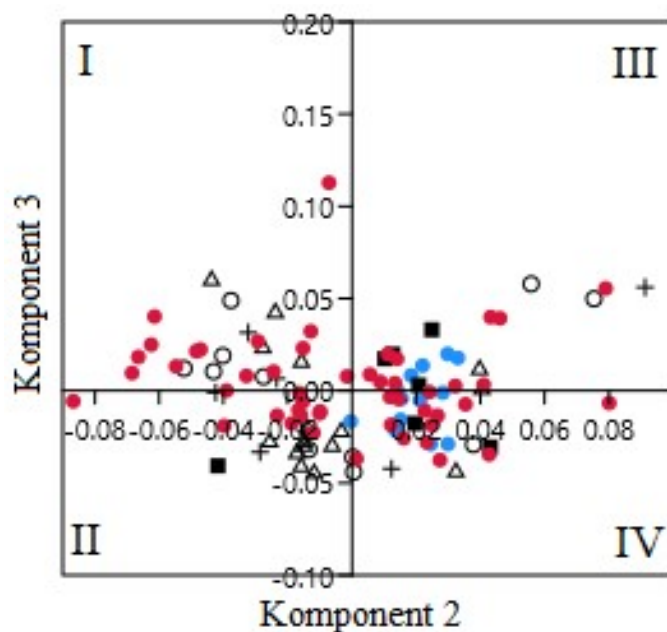
Rycina 25. Zestawienie udziału procentowego struktur drugorzędowych białek dla poszczególnych grup **HEMC**, **HC** i **LEUK-PD**. Wyniki dla pacjentów w grupie zaznaczono kształtem rombu ◆.

4.1.3. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm FT-IR surowicy

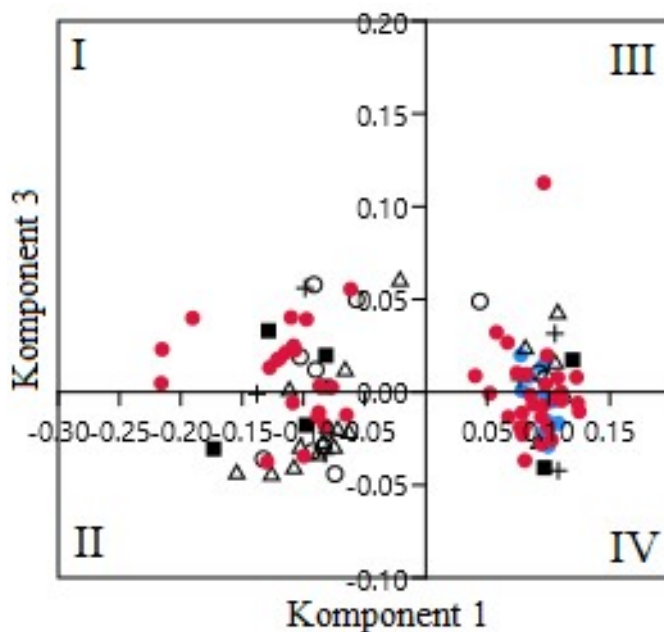
Rezultaty analiz HCA i PCA dla surowicy uwzględniające grupy **HC** (kolor niebieski), **HEMC** (kolor czarny) i **LEUK-PD** (kolor czerwony) przedstawiono na wykresach wyników. (ryciny 26-28.). Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).



Rycina 26. Wykres wyników PCA względem składowych głównych PC1 i PC2 dla podgrup **HEMC**, **HC** i **LEUK-PD** w zakresie $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ i $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ widm FT-IR surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).

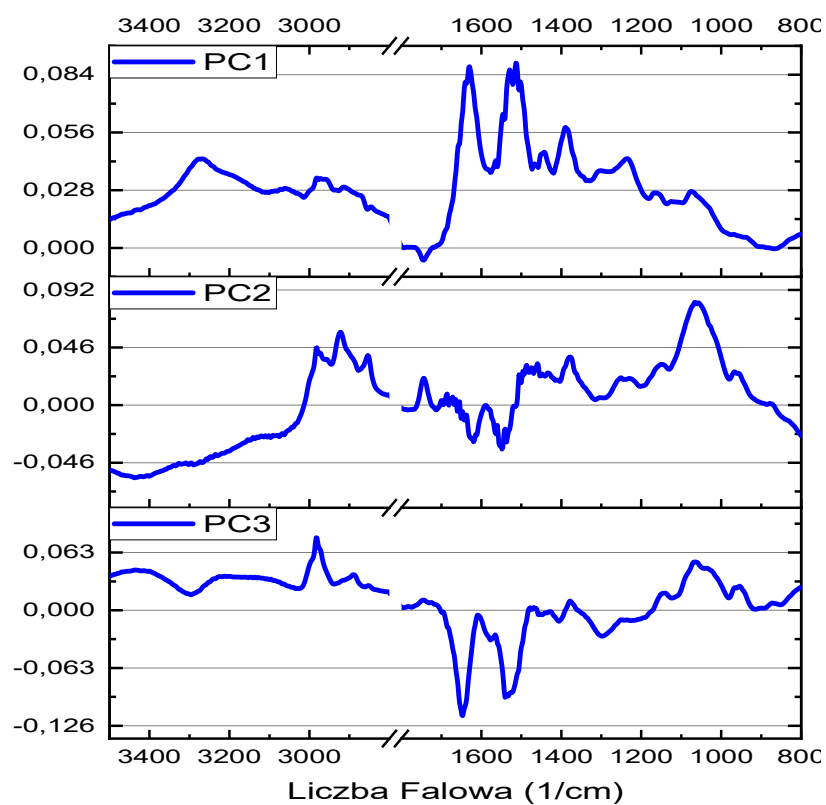


Rycina 27. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 dla podgrup **HEMC** (kolor czarny), **HC** (kolor niebieski) i **LEUK-PD** (kolor czerwony) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (o), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).



Rycina 28. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 dla podgrup **HEMC** (kolor czarny), **HC** (kolor niebieski) i **LEUK-PD** (kolor czerwony) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (o), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).

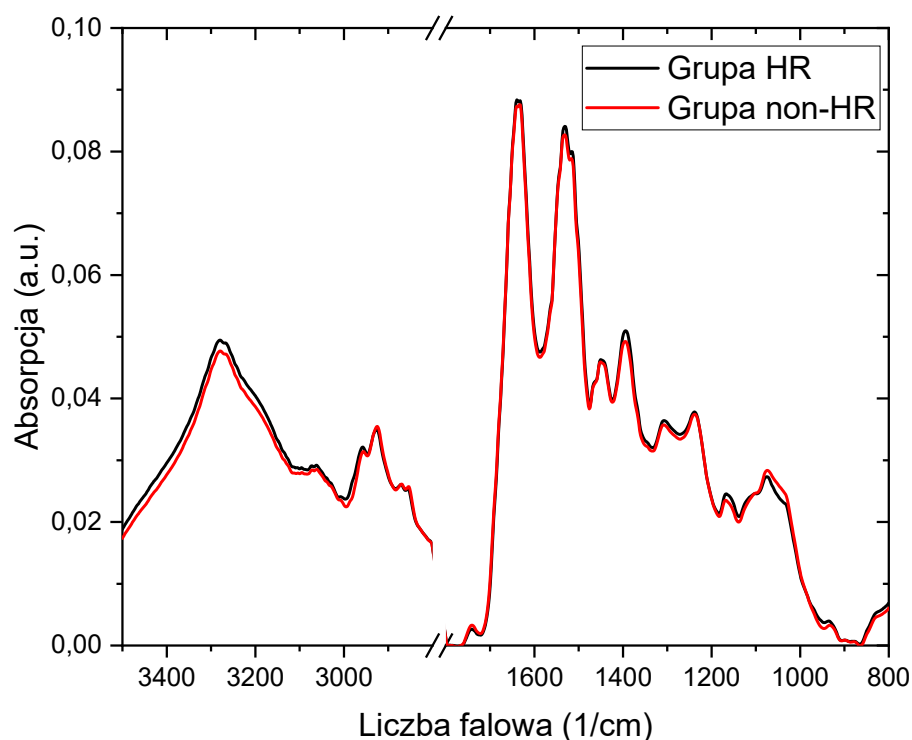
Uwzględniając trzy grupy badane: **HC**, oznaczoną na wykresie niebieskim kolorem, grupę **HEMC** (kolor czarny) i grupę **LEUK-PD** (kolor czerwony) zauważyć można, iż wyniki dla pojedynczych prób grupują się względem komponentu pierwszego (PC1), wyjaśniającego 76,77% wariancji dla wyjściowych danych spektralnych, ale nie tworzą oczekiwanych klastrów ze względu na przynależność do danej grupy. Zarówno względem PC1, PC2 oraz PC3, uwidoczniono dla pacjentów z białaczką, pacjentów z leukopenią i małopłytkowością znaczne rozproszenie, podczas gdy dla grupy pacjentów zdrowych oraz pacjentów z anemią i pancytopenią obserwuje się ich grupowanie względem PC1 i PC2. Wyniki dla grupy **HC** tworzą zwarty klaster w obrębie III kwadratu, odpowiadającemu dodatnim wartościom PC1 i PC2 (rycina 26.). Wartości ujemne obciążeń PC1 odpowiadały drganiom rozciągającym estrowych grup karbonylowych (1743 cm^{-1}), a ujemne obciążenia PC2 głównie amidowi I-rzędowemu (1620 cm^{-1}) i amidowi II-rzędowemu (1549 cm^{-1}) oraz charakterystycznemu dla drgań rozciągających grup -NH , -OH amidu A i cząsteczek wody jak również asymetrycznych i symetrycznych drgań rozciągającym grup CH_2 i CH_3 z zakresu $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$. Analizując wyniki względem PC2 wyjaśniającej 8,55% wariancji, zauważono, iż dla wyników dla grupy pacjentów z pancytopenią większość wyników usytuowana jest w I i III kwadracie, odpowiadającym wartościom ujemnym PC2. Tylko dla jednego pacjenta wynik znajduje się w kwadracie IV odpowiadającym dodatnim wartościom PC2. Wyniki dla pacjentów z anemią (z wyjątkiem jednego) klastrują się w kwadracie II i IV odpowiadającym ujemnym wartościom PC2, możliwym do wytłumaczenia dodatnimi wartościami obciążeń PC2 (rycina 26.). Wartości dodatnie obciążeń PC2 odpowiadają symetrycznym i asymetrycznym drganiom rozciągającym grup CH_3 i CH_2 (2981 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1}), drganiom estrowych grup karbonylowych (1743 cm^{-1}) i drganiom rozciągającym szkieletu węglowego struktur randomowych (1066 cm^{-1}). Z uwagi na duże rozproszenie wyników **LEUK-PD** jak i pozostałych podgrup **HEMC** nie można potwierdzić skuteczności analizy PCA dla grupy **HC**, **HEMC-E** i **HEMC-W**. Analizując wykres wyników względem PC3, objaśniającej 5,87% wariancji, zauważalne jest większe skupienie wyników wzdłuż osi poziomej, co potwierdza iż wnosi niewiele informacji. Dla analizy HCA, której wynik pozostawał w zgodności z wynikiem analizy PCA, nie publikuje się wykresu. Wykresy obciążeń przedstawiono na rycinie 29.



Rycina 29. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 w zakresie 3500-2800 cm^{-1} oraz 1800-800 cm^{-1} widma FT-IR surowicy podgrup **HEMC**, **HC** i **LEUK-PD**.

4.1.4. Ocena różnic spektralnych dla widm FT-IR surowicy pacjentów z ALL uwzględniająca grupy ryzyka

Uśrednione widma FT-IR surowicy dla pacjentów zakwalifikowanych do grupy wysokiego ryzyka (ang. high risk, **HR**) i pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka (ang. non-high risk, **non-HR**) przedstawiono na rycinie 30. Pozycje wyznaczonych pików wraz z odpowiadającymi im wartościami absorpcji umieszczono w tabeli 7.



Rycina 30. Widma oryginalne surowicy reprezentatywne dla pacjentów z białaczką z **grupy HR** (kolor czarny) oraz **grupy non-HR** (kolor czerwony). Widma FT-IR surowicy przedstawiono dla zakresu 3500-800 cm^{-1} z pomięciem zakresu 2800-1800 cm^{-1} .

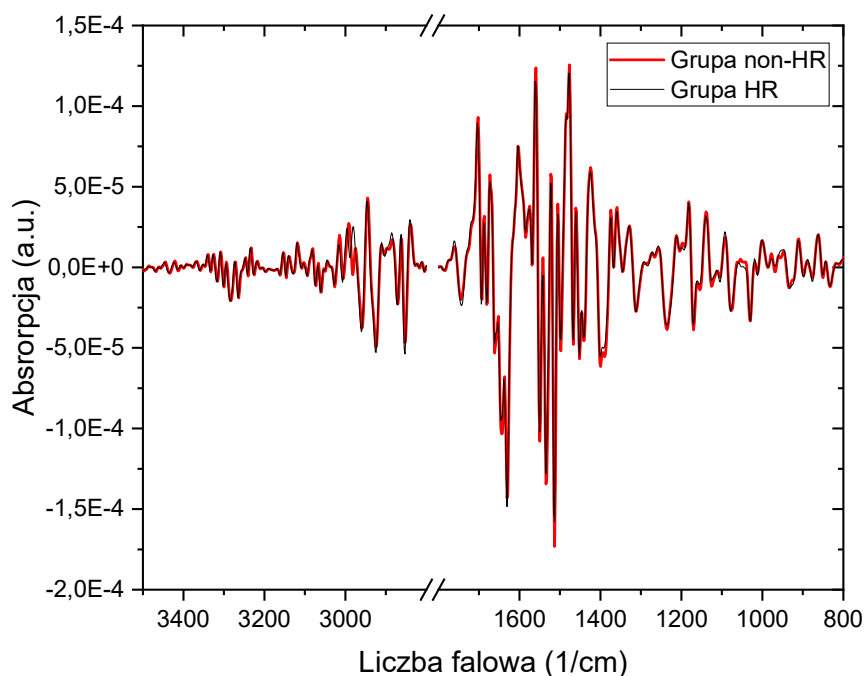
Tabela 7. Wyznaczona pozycja pików wraz z odpowiadającą im wartością absorpcji wyznaczona dla widma FT-IR surowicy pacjentów z grupy HR i non-HR.

Grupa non-HR		Grupa HR	
Maksimum piku [cm⁻¹]	Absorpcja [a.u.]	Maksimum piku [cm⁻¹]	Absorpcja [a.u.]
3279	0,047	3279	0,049
3104	0,028	3104	0,030
3095	0,028	3095	0,030
3072	0,029	3074	0,030
3067	0,029	3067	0,030
2986	0,023	2986	0,023
2956	0,031	2957	0,032
2925	0,035	2925	0,035
2870	0,026	2871	0,026
2854	0,026	2856	0,026
1742	0,003	1742	0,003
1640	0,088	1640	0,090
1634	0,088	1632	0,090
1532	0,083	1532	0,083
1516	0,081	1516	0,085
1447	0,045	1447	0,049
1395	0,049	1395	0,051
1308	0,035	1308	0,037
1238	0,037	1238	0,038
1168	0,023	1168	0,024
1103	0,025	1103	0,025
1075	0,028	1075	0,028
935	0,003	934	0,003
899	0,001	899	0,001

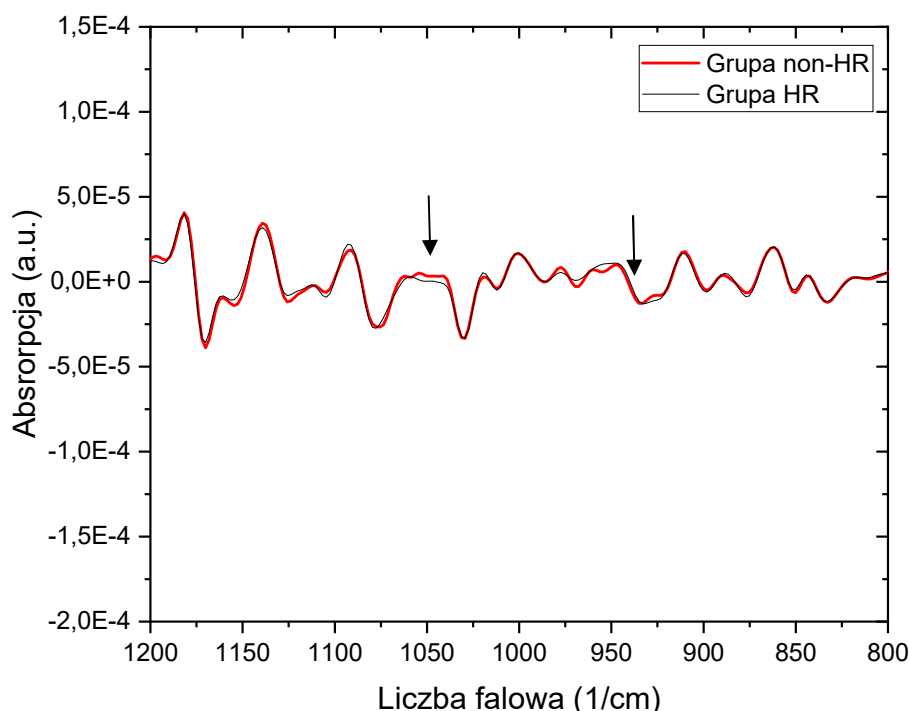
Położenia pasm oraz maksima pików położone były dla całego analizowanego zakresu przy liczbach falowych zbliżonych dla tych wyznaczonych dla uśrednionego widma LEUK-PD. Nie wykazano istotnych statystycznie przesunięć w pozycji maksimów, które mieściły się w przedziale $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ i dotyczyły tylko pików przy $3074\text{-}3072 \text{ cm}^{-1}$, $2957\text{-}2956 \text{ cm}^{-1}$, $2871\text{-}2870 \text{ cm}^{-1}$, $2856\text{-}2854 \text{ cm}^{-1}$, $1634\text{-}1632 \text{ cm}^{-1}$ i $935\text{-}934 \text{ cm}^{-1}$. Nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w absorpcji uwzględniając grupę ryzyka, pomimo iż dla uśrednionych widm widoczne są różnice w wartości absorpcji dla danych zakresów, w szczególności wyższa absorpcja w zakresie

ok. $3500\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ i $1450\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ dla **grupy HR** i w zakresie $1150\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ dla **grupy non-HR**.

Analizując widmo drugiej pochodnej zauważono, iż pik przy pozycji minimum 924 cm^{-1} obserwowano tylko w przypadku uśrednionego widma **grupy HR**. Pik charakterystyczny dla drgań rozciągających C=O (węglowodany, glikogen, deoksyryboza i ryboza kwasów nukleinowych) w przypadku **grupy non-HR** obserwowano przy pozycji minimum 1051 cm^{-1} , podczas gdy dla **grupy HR** przy 1049 cm^{-1} , przy czym dodatkowo w widmie **grupy HR** obecny był pik z minimum przy 1059 cm^{-1} [89]. Gdy przeanalizowano widma pojedynczych próbek pacjentów, zauważono iż dla zarówno pik z minimum przy 924 cm^{-1} , 1059 cm^{-1} , jak i przesunięcia w kierunku niższych bądź wyższych liczb falowych w opisywanych regionach pojawiają się niezależne od grupy ryzyka, co może być związane z wykazywaniem przez drugą pochodną czułości na szumy. Dla pozostałych zakresów stwierdzono przesunięcia w zakresie $\pm 3\text{ cm}^{-1}$, nie były więc istotne statystycznie. Widmo drugiej pochodnej dla całego analizowanego zakresu oraz dla zakresu $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, w którym zaobserwowano istotne przesunięcia umieszczono na rycinach poniżej (ryciny 31-32).



Rycina 31. Widma drugiej pochodnej surowicy reprezentatywne dla pacjentów z białaczką z **grupy HR** (kolor czarny) oraz **grupy non-HR** (kolor czerwony). Widma FT-IR surowicy przedstawiono dla zakresu $3500\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ z pomięciem zakresu $2800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$.



Rycina 32. Widma drugiej surowicy reprezentatywne dla pacjentów z białaczką z **grupy HR** (kolor czarny) oraz **grupy non-HR** (kolor czerwony). Widma FT-IR surowicy przedstawiono dla zakresu 1200-900 cm^{-1} . Strzałkami wskazano zakres, w którym obserwowano przesunięcia bądź dodatkowe minima.

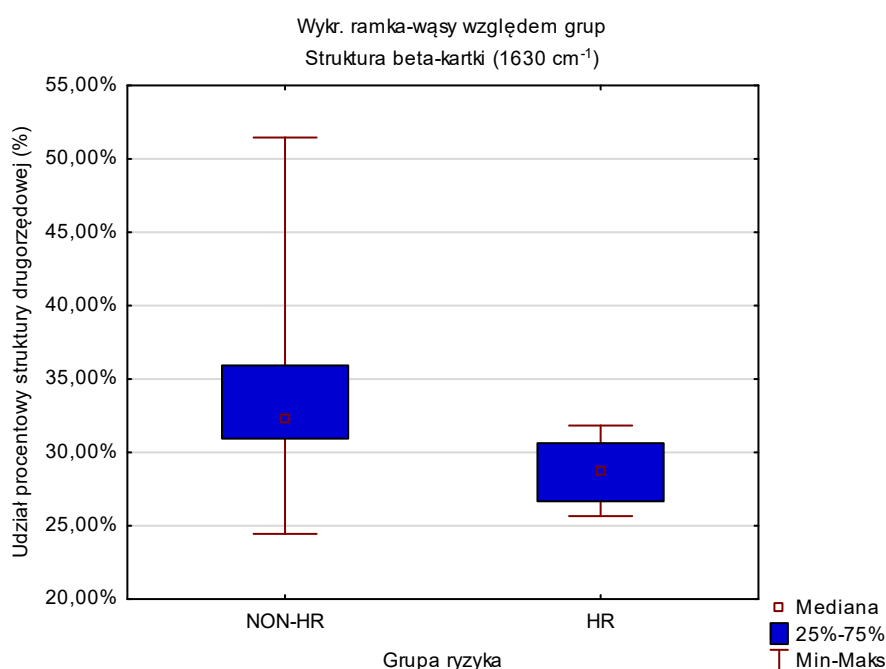
4.1.5. Określenie drugorzędowej struktury białek – analiza pasm składowych zakresu amidu I widm FT-IR surowicy pacjentów z ALL uwzględniająca grupę ryzyka

Analizując widma uśrednione udział poszczególnych konformacji białek dla grup wysokiego ryzyka i pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka był zbliżony przy czym największą różnicę zaobserwowano dla udziału struktury β -kardki (minimum przy 1630 cm^{-1} dla obydwu grup), który wynosił średnio 28,74% dla **grupy HR** i 31,45% dla **grupy non-HR**, a różnica ta miała charakter istotnej statystycznie ($p=0,001240$, czułość i specyficzność dla punktu odcięcia 30,865% - 77,14% i 88,89%, $\text{AUC}=0,85397$)(rycina 33.). Dla drugiego zakresu charakterystycznego dla beta-harmonijki (1694 cm^{-1} dla **grupy non-HR** i 1693 cm^{-1} dla **grupy HR**), beta-zakrętu (I zakres - 1680 cm^{-1} /1679 cm^{-1} ; II – 1671 cm^{-1} /1671 cm^{-1}), alfa-helisy (1661 cm^{-1} /1660 cm^{-1}) oraz struktury nieuporządkowanej (1645/1644 cm^{-1}) stwierdzono wyższy udział procentowy poszczególnych struktur dla **grupy HR**, ale różnice te nie były istotne statystycznie, co

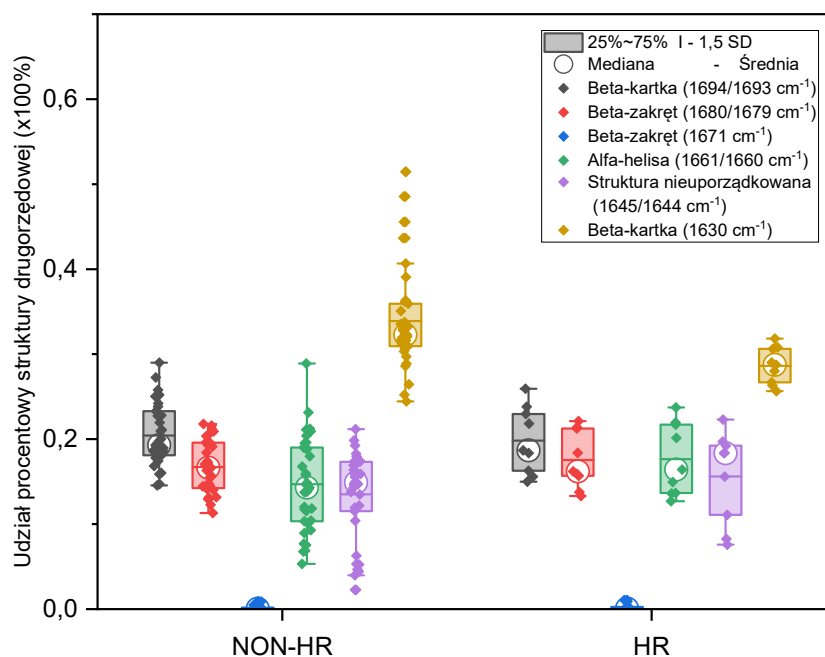
może wynikać z rozrzutu danych, który zaprezentowano na rycinie 34. Minima dla bocznych grup aminokwasów wystąpiły przy 1615/1614 cm^{-1} , a agregatów przy 1608 cm^{-1} dla obydwu grup. Udziały procentowe dla poszczególnych struktur umieszczono w tabeli poniżej (tabela 8.).

Tabela 8. Udział procentowy poszczególnych struktur drugorzędowych dla uśrednionych widm surowicy FT-IR pacjentów z białaczką zakwalifikowanych do grup wysokiego ryzyka (**grupa HR**) i pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka (**grupa non-HR**).

Grupa/Struktura drugorzędowa	Średni procentowy udział struktury drugorzędowej białek [%]					
	β -kardka (1694/1693 cm^{-1})	β -zakręt (1680/1679 cm^{-1})	β -zakręt (1671 cm^{-1})	α -helisa (1661/1660 cm^{-1})	Struktura nieuporządkowana (1645/1644 cm^{-1})	β -kardka (1630 cm^{-1})
Grupa non-HR	21,78%	17,13%	0,00%	16,99%	14,06%	31,45%
Grupa HR	18,05%	15,23%	0,24%	18,57%	17,47%	28,74%



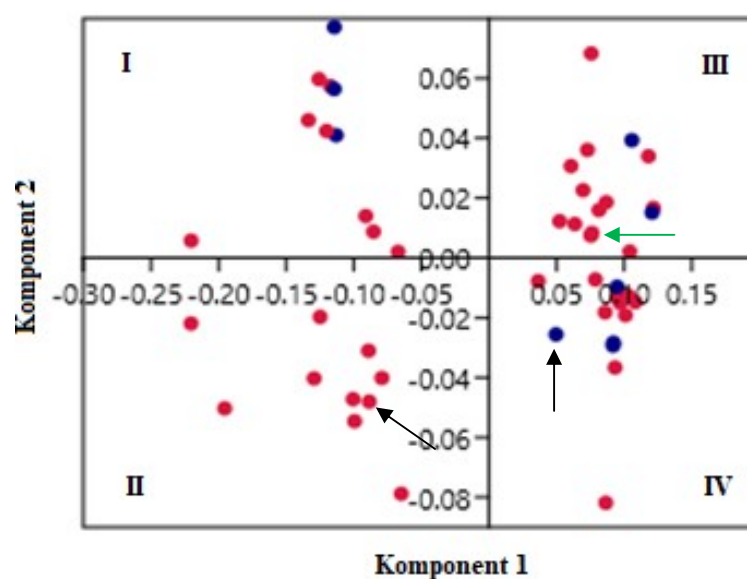
Rycina 33. Wykres porównujący procentowy udział struktury drugorzędowej struktury β -kardki z minimum przy pozycji 1630 cm^{-1} widma FT-IR surowicy dla grup **HR** i **non-HR**. Różnica istotna statystycznie ($p=0,001240$).



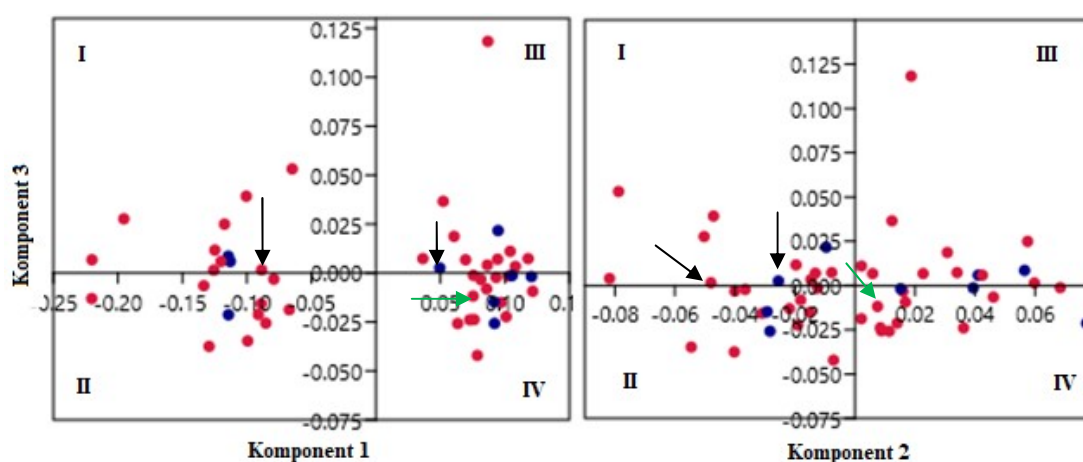
Rycina 34. Zestawienie udziału procentowego struktur drugorzędowych białek dla **grup HR i non-HR**.

4.1.6. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm FT-IR surowicy pacjentów z ALL uwzględniające grupę ryzyka

Wyniki analiz PCA i HCA dla pacjentów LEUK-PD z uwzględnieniem grupy ryzyka przedstawiono na rycinach 35-36. Pacjenci z **grupy HR** oznaczeni są na wykresach kolorem niebieskim, a pacjenci z **grupy non-HR** kolorem czerwonym. Czarnymi strzałkami wskazano wyniki dla pacjentów, u których obserwowano wznowę. Zieloną strzałką wskazano pacjenta, u którego obserwowano wznowę i odnotowano zgon.



Rycina 35. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grupy HR (kolor niebieski) i grupy non-HR (kolor czerwony) LEUK-PD w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR surowicy. Czarnymi strzałkami wskazano wyniki dla pacjentów, u których obserwowano wznowę. Zieloną strzałką wskazano pacjenta, u którego obserwowano wznowę i odnotowano zgon.



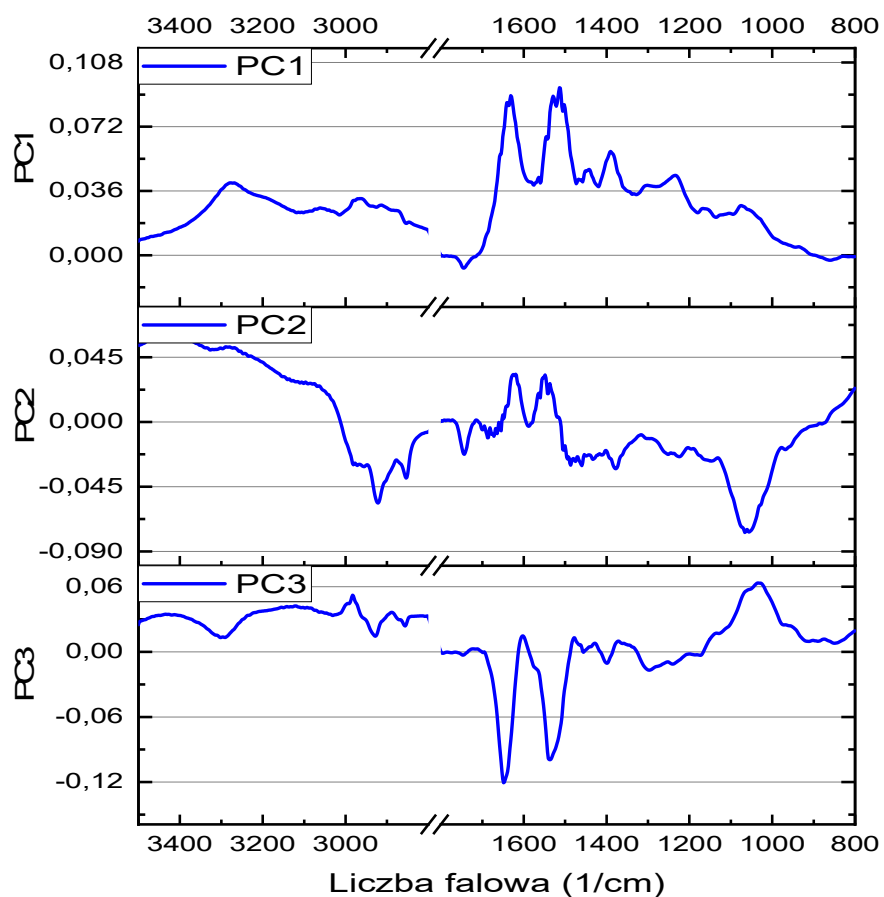
Rycina 36. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 (wykres po prawej stronie) oraz PC1 i PC3 (wykres po lewej stronie) dla grupy HR (kolor niebieski) i grupy non-HR (kolor czerwony) LEUK-PD w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR surowicy. Czarnymi strzałkami wskazano wyniki dla pacjentów, u których obserwowano wznowę. Zieloną strzałką wskazano pacjenta, u którego obserwowano wznowę i odnotowano zgon.

Porównując wyniki względem komponentu pierwszego, wyjaśniającego 79,33% wariancji wyjściowych danych spektralnych, zauważono iż wyniki grupują się w dwa klastry, nie powiązane jednak z grupą ryzyka - obserwacje dla **grupy HR** jak i **non-HR** są rozproszone na wykresach. Wyniki dla trzech pacjentów z **grupy HR** położone są w kwadracie I odpowiadającym ujemnym wartościom PC1, a pozostałe w kwadratach III i IV, czyli w zakresie dodatnich wartości PC1 (rycina 35.). Ujemne wartości wyjaśniają dodatnie obciążenia, związane z drganiami grup karbonylowych estrów (1745 cm^{-1}), podczas gdy dla dodatnich wartości PC1 objaśniające są wartości ujemnych obciążeń, powiązane głównie z amidem I (1631 cm^{-1}) i amidem II (1531 cm^{-1} i 1514 cm^{-1}), jak również z drganiami zginającymi grup CH_2 i CH_3 (1451 cm^{-1}) i drganiami rozciągającymi symetrycznymi C=O grup COO^- białek i kwasów tłuszczowych (1396 cm^{-1}). Podobne wnioski uzyskano analizując wyniki względem PC2 wyjaśniającej 9,45% wariancji – dla 4 pacjentów wyniki usytuowane były w I i II kwadracie odpowiadającym wartościom ujemnym PC2, a 5 wyników w kwadratach III i IV, odpowiadającym wartościom dodatnim PC2 (rycina 36.). Wartości ujemne objaśniane są przez dodatnie obciążenia, dla których przypisuje się drgania powiązane z amidem I (1629 cm^{-1}) i amidem II (1554 cm^{-1}), podczas gdy wartości dodatnie tłumaczone są ujemnymi obciążeniami charakterystycznymi dla drgań rozciągających asymetrycznych grup CH_3 lipidów (2925 cm^{-1}) i drgań symetrycznych rozciągających grup PO_2^- kwasów nukleinowych, fosfolipidów i białek fosforylowanych (1068 cm^{-1}). Takie wyniki wskazują iż dla wymienionych pików występują różnice pomiędzy poszczególnymi widmami pacjentów z **grupy HR**. Nie było jednak możliwe powiązanie tych różnic z klinicznymi cechami biorąc pod uwagę m.in. cechy wczesnego wysokiego ryzyka czy poziom MRD, a położenie wyników dla pacjentów z **grupy HR** w bliskiej odległości od wyników dla pacjentów z **grupy non-HR** świadczy o ich podobieństwie względem analizowanych cech, przez co też nie można potwierdzić skuteczności analizy PCA. Komponent 3, wyjaśniający 4,67% wariancji dla danych wyjściowych także nie wносił istotnych informacji.

Z uwagi na fakt, iż nie zaobserwowano klastrowania się wyników pacjentów względem wystąpienia u nich wznowy, a które to wyniki podobnie jak wynik pacjenta, u którego wystąpił zgon, znajdowały się w bliskiej odległości od pozostałych wyników, nie jest możliwe potwierdzenie skuteczności analizy PCA.

Wynik analiz HCA pozostawał w zgodności z analizą PCA, dlatego też nie publikuje się dendrogramu dla HCA.

Rycina 37. przedstawia uzyskane wyniki obciążeń PCA względem PC1, PC2 oraz PC3 w zakresie $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ i $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ widm surowicy pacjentów z **grupy HR** i **grupy non-HR**.

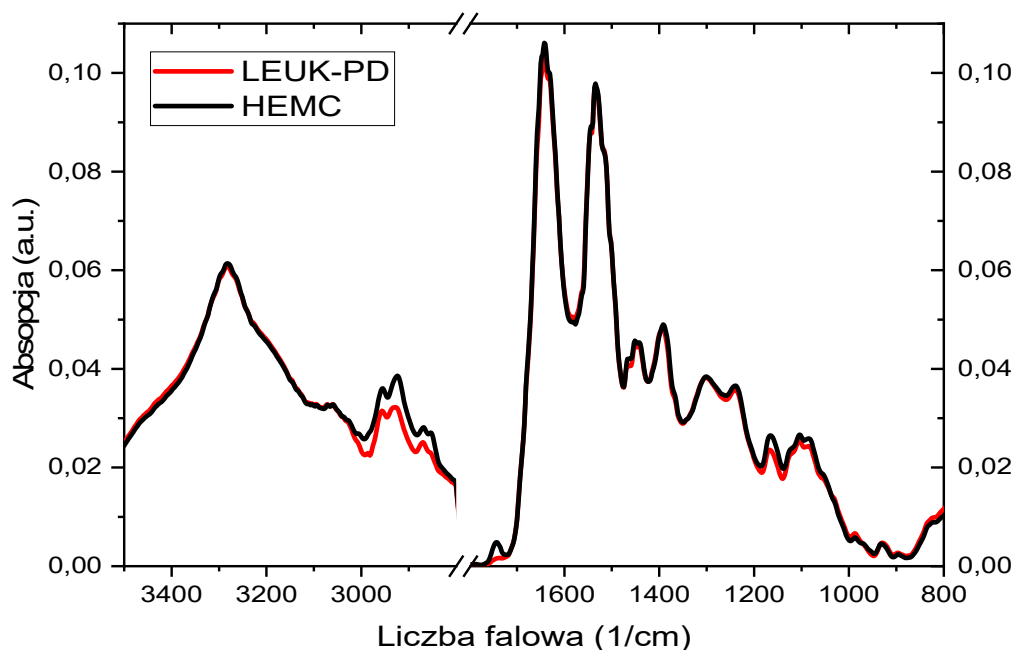


Rycina 37. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 w zakresie $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ oraz $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ widm FT-IR surowicy **grupy HR** i **grupy non-HR**.

4.2. Analizy spektralne FT-IR – SZPIK KOSTNY

4.2.1. Wyznaczenie pasm charakterystycznych dla widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego oraz porównanie wartości absorpcji

Na rycinie poniżej przedstawiono widma oryginalne reprezentatywne dla szpiku kostnego pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (kolor czarny - **HEMC**) oraz pacjentów z białaczką w momencie rozpoznania (kolor czerwony – **LEUK-PD**) (rycina 38.). W tabeli 9. umieszczono pozycje maksimów dla **HEMC** i **LEUK-PD** wraz z wartościami absorpcji i przypisami biochemicznymi.



Rycina 38. Widma reprezentatywne dla lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (**HEMC** – kolor czarny) oraz pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (**LEUK-PD** – kolor czerwony). Widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego przedstawiono dla zakresu 3500-800 cm^{-1} z pominięciem zakresu 2800-1800 cm^{-1} wolnego od absorpcji podczerwieni dla próbek biologicznych.

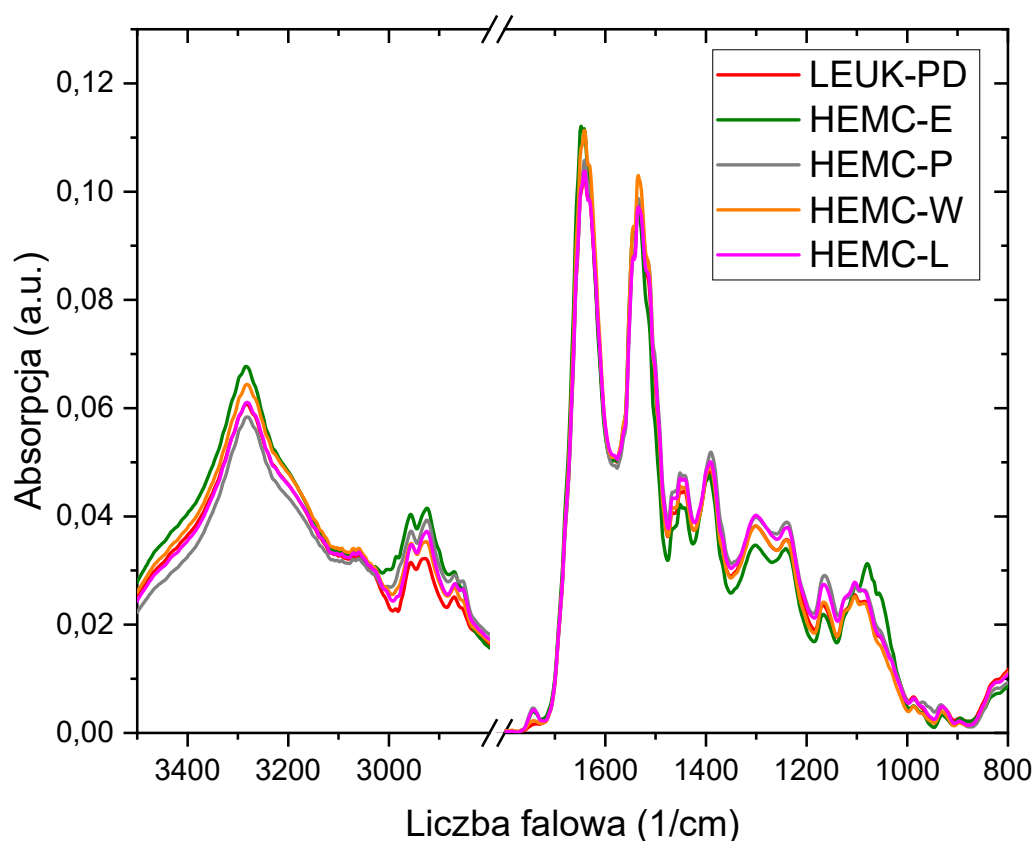
Tabela 9. Pozycja maksimów dla widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (**HEMC**) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (**LEUK-PD**) wraz z odpowiadającymi im wartościami absorpcji i przypisami biochemicznymi.

Szpik HEMC		Szpik LEUK-PD		Przypis biochemiczny
Pozycja max.*	Abs.**	Pozycja max.	Abs.**	
3284	0,061	3283	0,061	drżania rozciągające grup -NH: Amid A, białka, kwasy nukleinowe drżania rozciągające grup -OH: woda [67]
3104	0,033	3104	0,033	drżania rozciągające grup =CH: lipidy [67-68]
3095	0,033	3095	0,033	
3072	0,033	3072	0,033	
3061	0,028	3061	0,033	
2986	0,027	2986	0,023	drżania asymetryczne rozciągające grup CH ₂ :lipidy [69,70]
2957	0,036	2956	0,032	
2925	0,039	2928	0,032	drżania asymetryczne rozciągające grup CH ₃ : lipidy [69]
2870	0,028	2870	0,025	drżania symetryczne rozciągające grup CH ₂ : lipidy [71]
2855	0,027	2855	0,023	drżania symetryczne rozciągające grup CH ₃ : lipidy [70-71]
1743	0,005	1743	0,001	drżania rozciągające C=O (estry): estry cholesterolu, fosfolipidy, trójglicerydy [72]
1642	0,106	1642	0,104	drżania rozciągające C=O: amid I, białka [73]
1632	0,01	1632	0,099	
1545	0,089	1545	0,088	drżania zginające N-H, drżania rozciągające C-N: amid II, białka [74-75]
1535	0,098	1535	0,097	
1516	0,083	1515	0,084	
1467	0,042	1467	0,041	drżania nożycowe grup CH ₂ : lipidy [76]
1452	0,046	1451	0,045	drżania zginające grup CH ₂ i CH ₃ : lipidy, białka [76-77]
1392	0,049	1392	0,048	drżania symetryczne rozciągające C=O grup COO ⁻ : białka/kwasy tłuszczowe [78-79]
1301	0,038	1302	0,038	drżania skręcające grup CH ₂ : kwasy tłuszczowe [90]
1240	0,027	1239	0,036	asymetryczne drżania rozciągające grup PO ₂ ⁻ :kwasy nukleinowe, fosfolipidy i białka fosforylowane [71,81]
1166	0,023	1168	0,024	drżania C=O: seryna, treonina, tyrozyna, białka [82-83]

1104	0,027	1105	0,026	drgania rozciągające grup C=O: węglowodany [84]
1082	0,027	1085	0,024	drgania rozciągające symetryczne grup PO ₂ : DNA, RNA, fosfolipidy, białka fosforylowane [91]
988	0,006	988	0,007	drgania rozciągające C-O: ryboza (RNA), węglowodany [89]
932	0,005	930	0,005	lewoskrętna helisa kwasu DNA (Z-forma) [92]

*Pozycja max. – pozycja maksimum [cm⁻¹]; **Abs. – wartość absorpcji [a.u.]

Dokonano podziału grupy **HEMC** podobnie jak w przypadku surowicy na 4 podgrupy. Rycina 39. przedstawia widma reprezentatywne dla lizatu komórkowego szpiku kostnego podgrup **HEMC** i **LEUK-PD**.



Rycina 39. Widma reprezentatywne dla szpiku kostnego dla poszczególnych podgrup utworzonych dla podgrup pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (**HEMC-E** – kolor zielony, **HEMC-P** – kolor szary, **HEMC-L** – kolor różowy, **HEMC-W** – kolor pomarańczowy) i **LEUK-PD** (kolor czerwony). Widma FT-IR przedstawiono dla zakresu 3500-800 cm⁻¹ z pominięciem zakresu 2800-1800 cm⁻¹ wolnego od absorpcji IR dla próbek biologicznych.

Dla uśrednionych widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego podgrup **HEMC** i **LEUK-PD** pozycję pików oraz odpowiadające im wartości absorpcji umieszczono w tabeli 10.

Tabela 10. Pozycja maksimów dla widm FT-IR lizatu szpiku kostnego pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi z wydzielonymi podgrupami

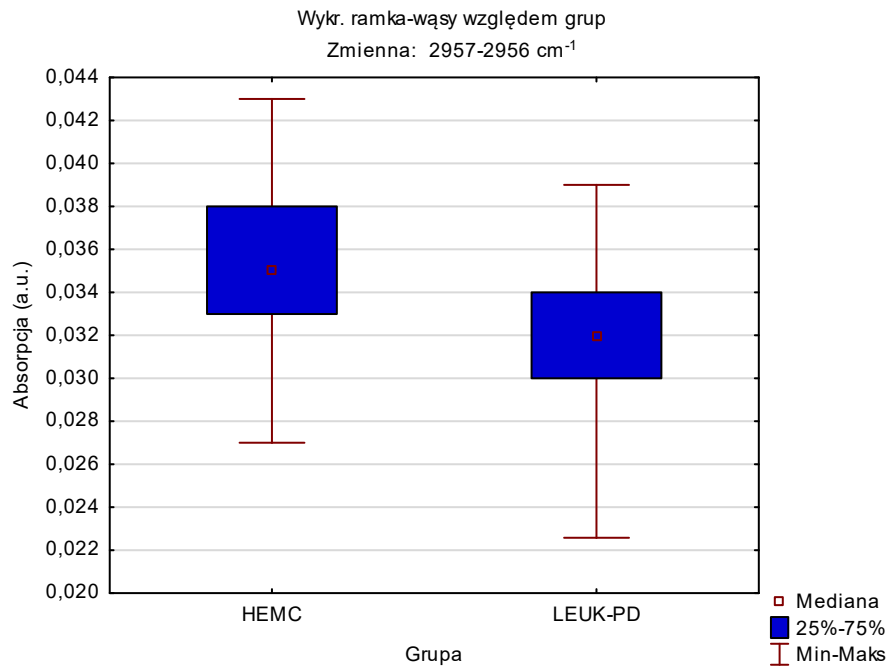
Szpik HEMC		Szpik HEMC-L		Szpik HEMC-W		Szpik HEMC-E		Szpik HEMC-P		Szpik LEUK-PD	
Max.*	Abs.**	Max.*	Abs.**	Max.*	Abs.**	Max.*	Abs.**	Maks.*	Abs.**	Max.*	Abs.**
3284	0,061	3283	0,058	3284	0,064	3285	0,068	3283	0,058	3283	0,061
3104	0,033	3105	0,033	3105	0,034	3105	0,034	3105	0,027	3104	0,033
3095	0,033	3095	0,033	3095	0,034	3095	0,034	3095	0,027	3095	0,033
3072	0,033	3072	0,033	3072	0,034	3072	0,033	3072	0,028	3072	0,033
3061	0,028	3061	0,033	3061	0,034	3061	0,03	3061	0,028	3061	0,033
2986	0,027	2986	0,025	-	-	2986	0,03	2982	0,031	2986	0,023
2957	0,036	2956	0,035	2957	0,025	2958	0,04	2957	0,031	2956	0,032
2925	0,039	2925	0,037	2927	0,035	2925	0,042	2925	0,034	2928	0,032
2870	0,028	2870	0,028	2871	0,027	2871	0,03	2870	0,029	2870	0,025
2855	0,027	2855	0,026	2854	0,024	2854	0,027	2857	0,028	2855	0,023
1743	0,005	1743	0,004	1743	0,002	1744	0,004	1744	0,005	1743	0,001
1642	0,106	1642	0,104	1642	0,111	1640	0,112	1642	0,106	1642	0,104
1632	0,01	1632	0,098	1633	0,11	1633	0,112	1633	0,101	1632	0,099
1545	0,089	1545	0,088	1545	0,094	1545	0,093	1545	0,088	1545	0,088
1535	0,098	1535	0,097	1535	0,103	1536	0,098	1535	0,099	1535	0,097
1516	0,083	1514	0,084	1514	0,086	1514	0,076	1514	0,076	1515	0,084
1467	0,042	1467	0,043	1467	0,042	1467	0,038	1467	0,045	1467	0,041
1452	0,046	1452	0,047	1452	0,046	1452	0,042	1452	0,048	1451	0,045
1392	0,049	1391	0,05	1392	0,048	1394	0,048	1391	0,052	1392	0,048

1301	0,038	1302	0,04	1302	0,038	1302	0,035	1301	0,04	1302	0,038
1240	0,027	1239	0,038	1241	0,036	1242	0,034	1240	0,039	1239	0,036
1166	0,023	1165	0,027	1167	0,024	1168	0,022	1165	0,029	1168	0,024
1104	0,027	1104	0,027	1105	0,025	1103	0,027	1104	0,027	1105	0,026
1082	0,027	1084	0,027	1085	0,028	1081	0,031	1087	0,026	1085	0,024
988	0,006	988	0,006	988	0,005	988	0,005	970	0,006	988	0,007
932	0,005	931	0,005	932	0,004	931	0,002	934	0,005	930	0,005
896	0,002	896	0,002	896	0,002	900	0,001	896	0,002	897	0,003

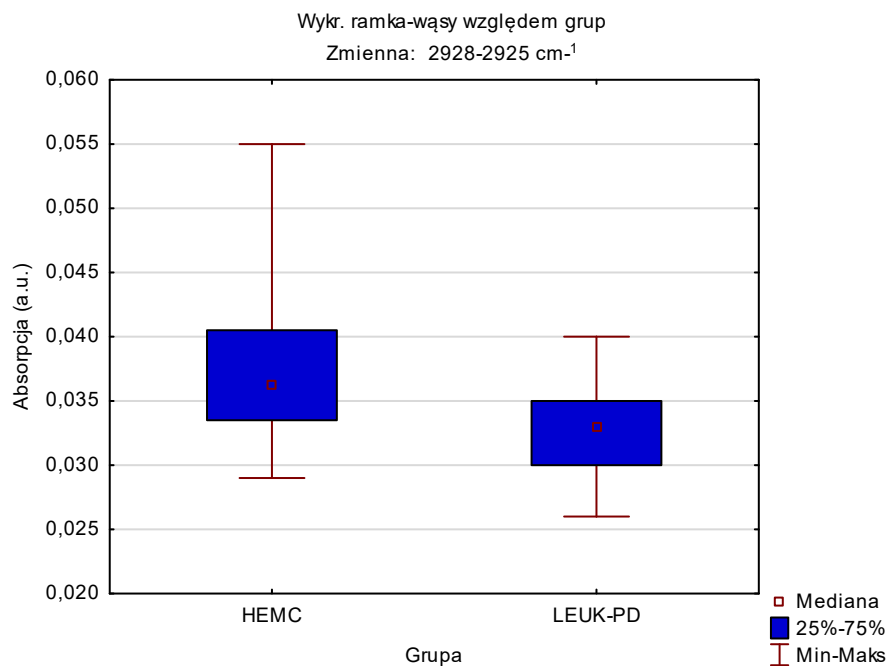
*Max. – pozycja maksimum [cm^{-1}]; **Abs. – wartość absorpcji [a.u.]

Widma lizatu komórkowego szpiku kostnego wykazywały pasma i piki charakterystyczne dla związków lipidowych, białek, węglowodanów i kwasów nukleinowych DNA oraz RNA w zakresach liczb falowych zbliżonych do tych obserwowanych dla surowicy. Z uwagi na małe liczebności podgrup **HEMC**, w analizach uwzględniono także porównanie grupy **LEUK-PD** i **HEMC** bez wydzielania podgrup.

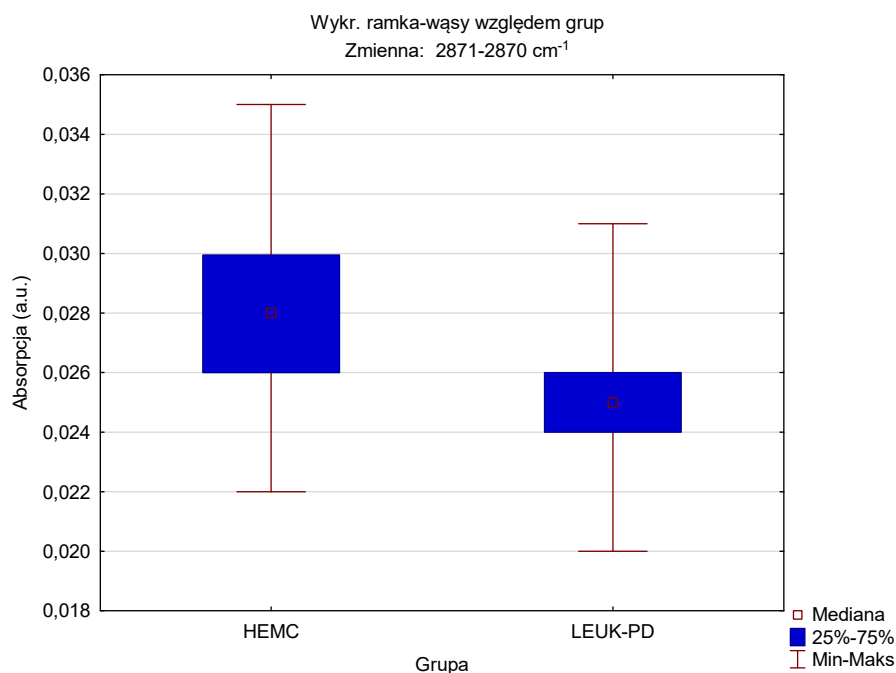
W regionie $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ odnotowano piki charakterystyczne dla drgań rozciągających grup -NH i grup -OH amidu A i wody (pozycja maksimum w zakresie $3285\text{--}3283\text{ cm}^{-1}$) oraz przypisywane drganiom rozciągającym grup metylenowych długich łańcuchów kwasów tłuszczowych (lipidy) piki z pozycją maksimum: 3105 cm^{-1} , 3095 cm^{-1} , $3073\text{--}3072\text{ cm}^{-1}$ i 3061 cm^{-1} . Najwyższe wartości absorpcji w tym regionie wykazano dla uśrednionego widma grupy **HEMC-E**, a najniższe dla **HEMC-P**. Dla pasma w zakresie $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ najniższe wartości absorpcji obserwowano z kolei dla uśrednionego widma grupy **LEUK-PD**, a wyznaczone piki przypisano dla asymetrycznych i symetrycznych drgań rozciągających grup CH_2 i CH_3 (głównie lipidy, w mniejszym udziale białka, kwasy nukleinowe) odpowiednio przy: $2987\text{--}2986\text{ cm}^{-1}$, $2928\text{--}2925\text{ cm}^{-1}$ i $2958\text{--}2956\text{ cm}^{-1}$ oraz $2871\text{--}2870\text{ cm}^{-1}$ i $2857\text{--}2854\text{ cm}^{-1}$. Dla grup **HEMC** i **LEUK-PD** stwierdzono istotną statystycznie różnicę w wartości absorpcji dla zmiennych: 2870 cm^{-1} ($p=0,008065$), $2928\text{--}2925\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,000782$) i $2958\text{--}2956\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,008207$), ale gdy w analizie uwzględniono podgrupy **HEMC**, wartość absorpcji różnica nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej (ryciny 40-42).



Rycina 40. Wykres porównujący wartość absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 2957-2956 cm⁻¹ widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Różnica istotna statystycznie ($p=0,008207$).

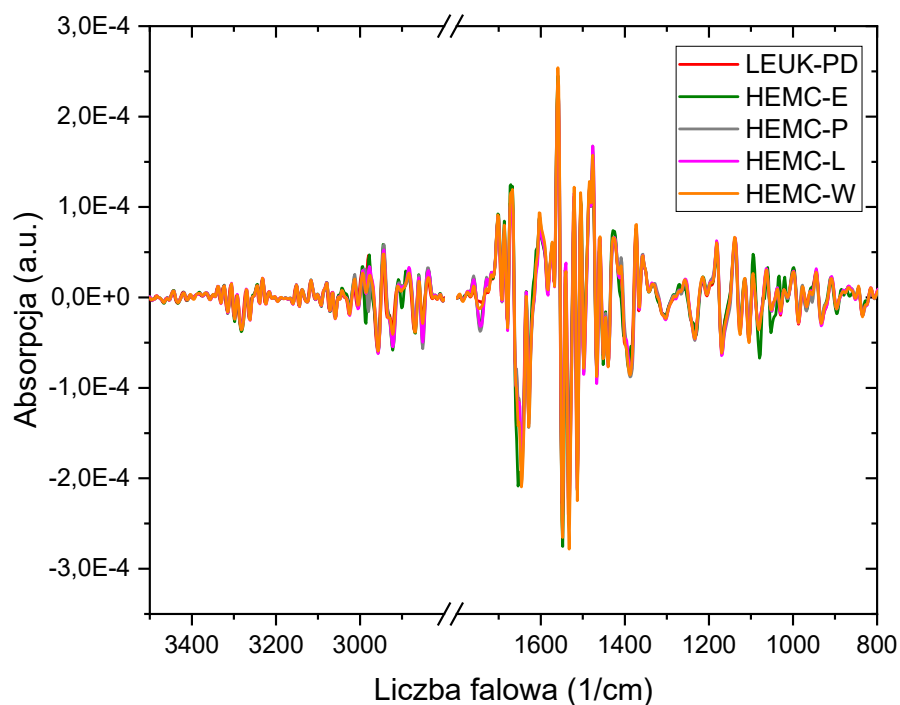


Rycina 41. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 2928-2925 cm⁻¹ widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,000782$).

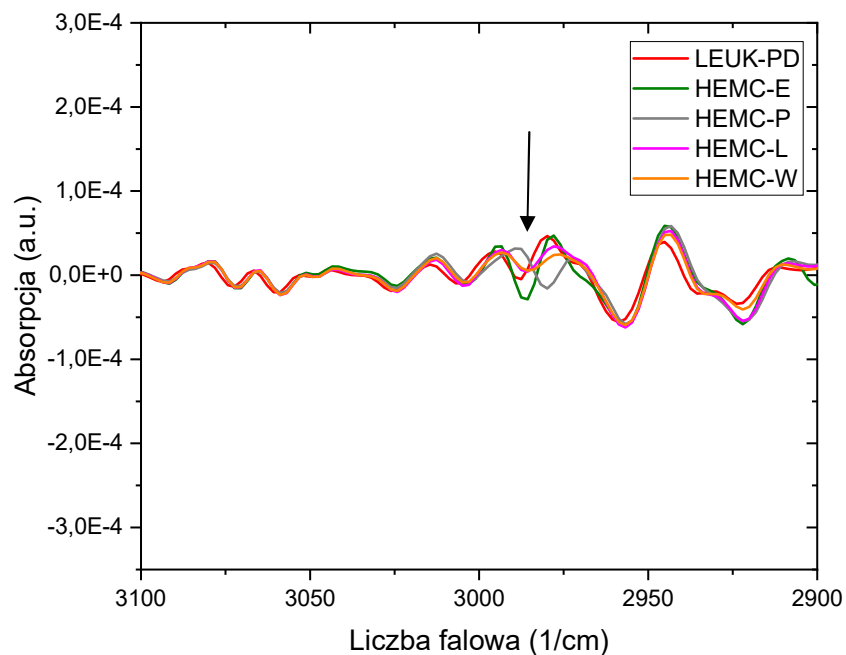


Rycina 42. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 2871-2870 cm^{-1} widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Różnica istotna statystycznie ($p=0,008065$).

Co ważne, w widmie reprezentatywnym grupy **HEMC-W** nie zaobserwowano pików przy pozycji ok. 2987-2986 cm^{-1} , a dla grupy **HEMC-P** zauważono przesunięcie w kierunku wyższych liczb falowych tj. 2982 cm^{-1} . Uzyskując widmo drugiej pochodnej, potwierdzono obecność przy liczbie falowej 2986 cm^{-1} pików dla grupy **HEMC-W**, o wartości absorpcji zauważalnie niższej w porównaniu do tej obserwowanej dla innych grup. Analizując widma drugiej pochodnej dla wszystkich pacjentów w grupie **HEMC-P**, tylko w 2 przypadkach obserwuje się przesunięcie do 2982 cm^{-1} i 2980 cm^{-1} , w pozostałych przypadkach minimum obserwowane jest przy 2988-2986 cm^{-1} . Przesunięcie to obserwowano także dla jednego pacjenta z grupy **HEMC-W** (2982 cm^{-1}), jednego pacjenta z grupy **HEMC-L** (2981 cm^{-1}) oraz 4 pacjentów z grupy **LEUK-PD** (trzech pacjentów - 2982 cm^{-1} i 2981 cm^{-1}). W zakresie tym innych istotnych przesunięć nie obserwowano, jako że mieściły się one w przedziale $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$. Widma drugiej pochodnej dla całego analizowanego zakresu oraz zakresu, w którym obserwowano istotne przesunięcia przedstawiono na rycinach 43-44.



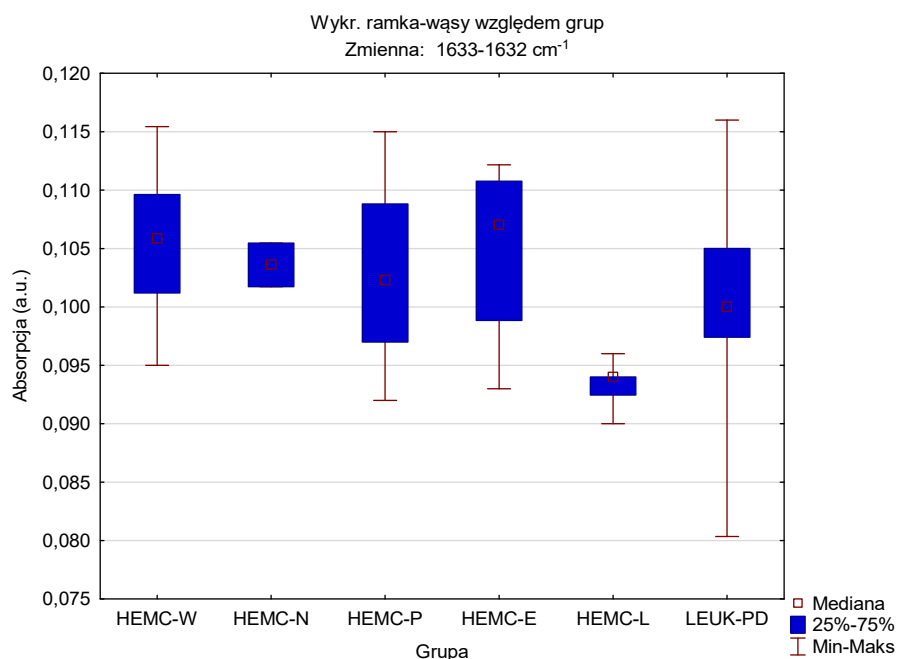
Rycina 43. Wykres drugiej pochodnej lizatu komórkowego szpiku kostnego dla grupy **LEUK-PD** (kolor czerwony) i podgrup **HEMC** (**HEMC-E** – kolor zielony, **HEMC-P** – kolor szary, **HEMC-L** – kolor różowy, **HEMC-W** – kolor pomarańczowy) w zakresie $3500\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ z pominięciem zakresu $2800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$.



Rycina 44. Widmo drugiej pochodnej lizatu komórkowego szpiku kostnego uśrednione dla grupy **LEUK-PD** (kolor czerwony) i podgrup **HEMC** (**HEMC-E** – kolor zielony, **HEMC-P** – kolor szary, **HEMC-L** – kolor różowy, **HEMC-W** – kolor pomarańczowy) w zakresie $3100\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$. Strzałką zaznaczono region, w którym obserwowano istotne przesunięcia.

Charakterystyczny dla drgań rozciągających grup estrowych C=O (kwasy tłuszczowe, trójglicerydy, fosfolipidy) pik położony był przy 1744-1743 cm^{-1} , przy czym dla uśrednionego widma grupy **LEUK-PD** odnotowano najniższą wartość absorpcji dla tego piku, a dla grupy **HEMC-P** była ona najwyższa spośród wszystkich analizowanych grup.

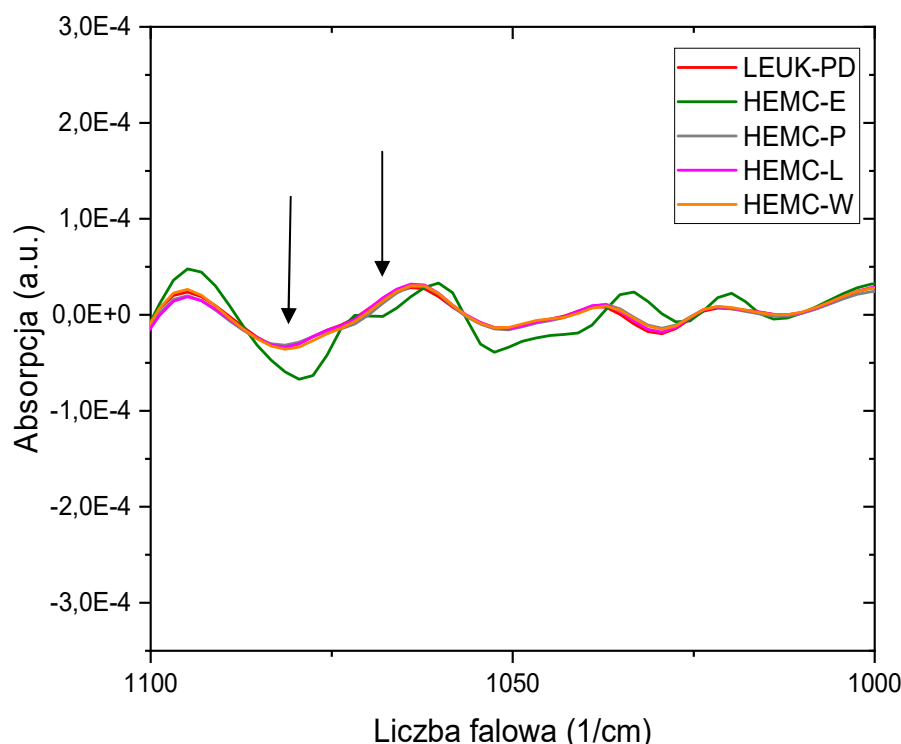
Najwyższe wartości absorpcji w całym analizowanym zakresie liczb falowych stwierdzono dla pasma amidu I (1700-1600 cm^{-1}) i amidu II (1600-1500 cm^{-1}). Drgania rozciągające C=O amidu I w widmie uwidoczniono przy następujących liczbach falowych: 1642-1640 cm^{-1} i 1633-1632 cm^{-1} , a drgania zginające grup NH i rozciągające C-N amidu II przy 1545-1544 cm^{-1} , 1536-1535 cm^{-1} i 1516-1516 cm^{-1} . Dla piku 1633-1632 cm^{-1} wartość absorpcji różniła się istotnie statystycznie pomiędzy grupą **HEMC-W** i **HEMC-L** ($p=0,045468$, Rycina 45.) Najniższe wartości absorpcji dla zakresu 1700-1500 cm^{-1} wykazano dla uśrednionego widma grupy **HEMC-L**, a najwyższe dla grupy **HEMC-E** dla zakresu amidu I i **HEMC-W** w przypadku zakresu amidu II. W regionie molekularnego odcisku palca uwidoczniono także piki powiązane z lipidami, tj. charakterystyczne dla drgań nożycowych grup CH_2 łańcuchów acylowych dwuwarstw lipidowych (maksimum przy 1468-1467 cm^{-1}), drgań wychylających grup CH_3 i CH_2 (1452-1451 cm^{-1}), symetrycznych drgań rozciągających C=O grup COO^- białek i kwasów tłuszczowych (1394-1391 cm^{-1}) i skręcających drgań grup CH_2 kwasów tłuszczowych (1302-1301 cm^{-1}). Wartości absorpcji dla wyżej wymienionych pików były zbliżone i nie różniły się istotnie statystycznie dla wszystkich analizowanych grup, przy czym dla uśrednionego widma podgrupy **HEMC-E** odnotowano najwyższą absorpcję, a najwyższa dla **HEMC-L** spośród wszystkich grup.



Rycina 45. Wykres porównujący wartość absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1633-1632 cm⁻¹ widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - p=0,0377).

Przypisywane drganiom rozciągającym asymetrycznym grup fosforanowych (PO₂⁻) kwasów nukleinowych, białek i fosfolipidów piki obserwowano przy liczbach falowych 1242-1239 cm⁻¹, a charakterystyczny dla lewoskrętnej helisy DNA przy 934-931 cm⁻¹. Najwyższą absorpcję dla pierwszego z tych pików obserwowano dla uśrednionego widma grupy **LEUK-PD**, najniższa natomiast dla widma grupy **HEMC-E**. Dla pików przy 934-931 cm⁻¹ wartość absorpcji wyznaczona dla uśrednionych widm była równa dla wszystkich grup w wyjątkiem **HEMC-W** i **HEMC-E**, dla których obserwowano niższe wartości absorpcji. Opisywany najczęściej dla symetrycznych drgań grup fosforylowych pik obserwowano przy liczbach falowych z zakresu 1087-1080 cm⁻¹. Dla grup **HEMC-L**, **HEMC-W** i **LEUK-PD** pik ten w uśrednionym widmie pojawiał się przy 1085 cm⁻¹ i był przesunięty w kierunku wyższych liczb falowych dla grupy **HEMC-E** (1081 cm⁻¹) i niższy liczb falowych w przypadku **HEMC-P** (1087 cm⁻¹). Dla uśrednionego widma grupy **HEMC-E** dodatkowy pik pojawił się przy 1068 cm⁻¹ liczby falowej i uwidoczniony został także w widmie drugiej pochodnej (rycina 46.) Analiza wyników dla pacjentów w grupach wykazała, iż dla pacjentów grupy **LEUK-PD** obserwowano minima w zakresie 1086-1080 cm⁻¹, dla **HEMC-L** - 1093-1081 cm⁻¹, **HEMC-E** – 1084-1080 cm⁻¹, **HEMC-W** 1086-1080 cm⁻¹ oraz dla **HEMC-P** w zakresie

1091-1080 cm^{-1} . Dodatkowe piki w zakresie 1075-1068 cm^{-1} odnotowano zarówno dla pacjentów z podgrupy **HEMC-E** (2 pacjentów), jak i pozostałych podgrup **HEMC** (7 pacjentów z grupy **HEMC-P**, 3 pacjentów z grupy **HEMC-W** i **HEMC-L**) oraz **LEUK-PD** (10 pacjentów).



Rycina 46. Widmo drugiej pochodnej lizatu komórkowego szpiku kostnego dla uśrednionych dla grupy **LEUK-PD** (kolor czerwony) i podgrup **HEMC** (**HEMC-E** – kolor zielony, **HEMC-P** – kolor szary, **HEMC-L** – kolor różowy, **HEMC-W** – kolor pomarańczowy) w zakresie 1100-1000 cm^{-1} . Strzałkami zaznaczono regiony, dla których obserwowano różnice dla grupy **HEMC-E**.

Inne obserwowane w regionie odcisku molekularnego piki o wizualnie niższej absorpcji to m.in. związany z drganiami grup C-O aminokwasów białkowych (tyrozyna, seryna, treonina) w zakresie 1168-1165 cm^{-1} , drganiami rozciągającymi grup C=O (1105-1103 cm^{-1}) czy drganiami rozciągającymi grup C-O rybozy kwasu rybonukleionowego i innych węglowodanów pik z maksimum z zakresu 990-988 cm^{-1} , z odpowiednio najwyższą absorpcją dla wyżej wymienionych pików dla uśrednionego widma grup **HEMC-P** i **LEUK-PD** i najniższą dla widma grupy **HEMC-E** dla obydwu pików. Dla wszystkich tych zmiennych nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartości absorpcji dla analizowanych grup.

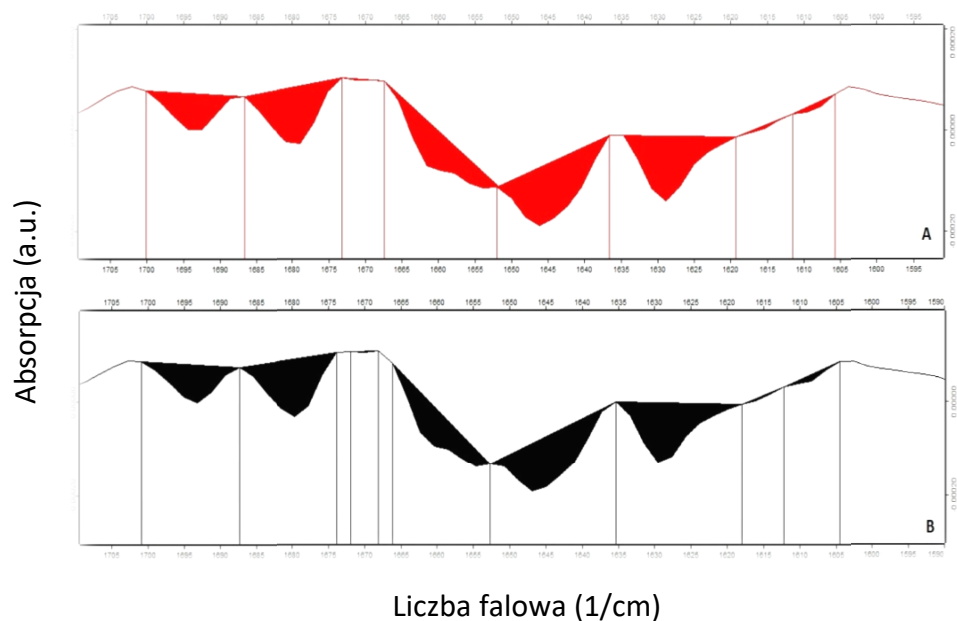
Na podstawie krzywy ROC wyznaczono czułość i specyficzność dla wszystkich zmiennych, dla których stwierdzono istotną statystycznie różnicę w wartości absorpcji. Dane zawarto w tabeli poniżej (tabela 11.)

Tabela 11. Zestawienie wartości czułości i specyficzności oraz punktu odcięcia i AUC dla poszczególnych zmiennych dla widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego.

Pik [cm ⁻¹]	Grupa	Specyficzność [%]	Czułość [%]	Punkt odcięcia [a.u.]	AUC
2871-2870	HEMC i LEUK-PD	65,22	63,15	0,0265	0,60984
2928-2925	HEMC i LEUK-PD	73,08	68	0,0335	0,76769
2958-2956	HEMC i LEUK-PD	76,93	52	0,03249	0,69231
1632	HEMC-W i HEMC-L	66,67	80	0,10547	0,71667

4.2.2. Określenie drugorzędowej struktury białek – analiza pasm składowych zakresu amidu I widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego

W celu ustalenia udziału procentowego poszczególnych konformacji białek w analizowanych próbkach szpiku kostnego, tak jak w przypadku surowicy krwi, dokonano integracji działając na drugiej pochodnej widm FT-IR. Dla uśrednionych widm podgrup **HEMC** i **LEUK-PD** minima dla zakresów charakterystycznych dla β -kartki obserwowano przy liczbach falowych 1694-1692 cm⁻¹ i 1631-1629 cm⁻¹, β -zakrętu - 1680-1679 cm⁻¹ i 1671-1670 cm⁻¹, α -helisy - 1661-1660 cm⁻¹, struktury nieuporządkowanej - 1646-1644 cm⁻¹, a także dla powiązanych z międzycząsteczkowymi β -kartkami skutkującymi agregacją protein z minimami 1615-1614 cm⁻¹ i grup bocznych reszt aminokwasów 1608 cm⁻¹. Rycina poniżej przedstawia przykładową metodę integracji dla uśrednionego widma **LEUK-PD** (A) i grupy **HEMC** (B) (rycina 47). W tabeli 12. zawarto pozycje minimów dla poszczególnych struktur drugorzędowych białek obserwowane dla widma drugiej pochodnej lizatu komórkowego szpiku kostnego.



Rycina 47. Metoda integracji widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego w zakresie 1700-1600 cm^{-1} na przykładzie uśrednionych widm drugiej pochodnej **LEUK-PD** (A) i **HEMC** (B).

Tabela 12. Wyznaczone pozycje minimum w zakresie 1700-1600 cm^{-1} widma FT-IR lizatu komórkowego szpik kostnego uśrednionych dla analizowanych grup.

Struktura drugorzędowa		Pozycja minimum [cm^{-1}]							
		β -karkta	β -zakręt	β -zakręt	α -helisa	nieuporządkowana	β -karkta	grupy boczne aminokwasów	agregaty β
Grupa	HEMC	1692	1679	1671	1660	1646	1631	1615	1608
	LEUK-PD	1694	1680	1671	1660	1646	1630	1615	1608
	HEMC-E	1693	1680	1670	1661	1644	1629	1615	1608
	HEMC-P	1693	1680	1670	1660	1646	1631	1615	1608
	HEMC-L	1693	1680	1670	1661	1646	1629	1615	1608
	HEMC-W	1693	1679	1671	1660	1644	1630	1614	1608

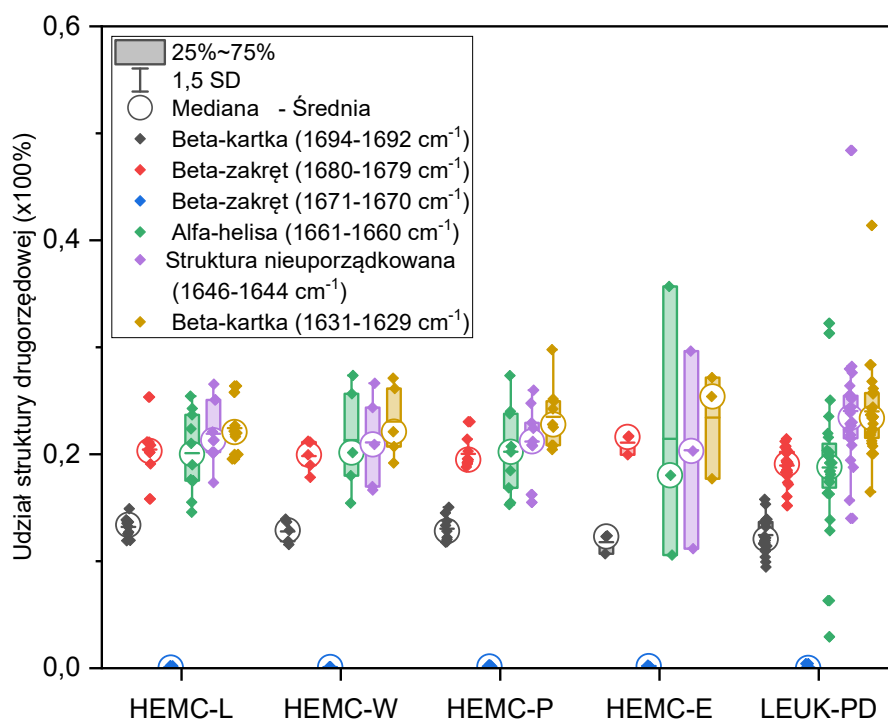
Dla uśrednionych widm wyliczono udział procentowy poszczególnych struktur. Dane przedstawiono w tabeli poniżej (tabela 13.).

Tabela 13. Udział procentowy poszczególnych struktur drugorzędowych dla uśrednionych widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego podgrup **HEMC** i **LEUK-PD**

Grupa/Struktura drugorzędowa	Średni procentowy udział struktury drugorzędowej białek [%]					
	β -karta (1694-1692 cm^{-1})	β -zakręt (1680-1679 cm^{-1})	β -zakręt (1671-1670 cm^{-1})	α -helisa (1661-1660 cm^{-1})	Struktura nieuporządkowana (1646-1644 cm^{-1})	β -karta (1631-1629 cm^{-1})
LEUK-PD	11,42%	20,37%	0,13%	19,18%	24,57%	22,92%
HEMC-E	12,59%	22,51%	0,18%	26,60%	15,38%	21,39%
HEMC-P	12,95%	20,09%	0,14%	17,71%	23,70%	23,76%
HEMC-W	12,60%	20,34%	0,11%	18,95%	23,12%	23,40%
HEMC-L	13,26%	20,32%	0,10%	18,40%	24,50%	22,17%

Analizując widma uśrednione udział procentowy poszczególnych struktur drugorzędowych białek, z uwzględnieniem w analizie podgrup **HEMC** był zbliżony dla wszystkich grup. Najwyższy średni udział procentowy odnotowano dla struktury nieuporządkowanej (**LEUK-PD** i **HEMC-L**) bądź struktury β -karty z minimum przy 1631-1629 cm^{-1} (**HEMC-P**, **HEMC-W**, **HEMC-E**). Średni udział procentowy struktury nieuporządkowanej dla **HEMC-E** wynosił 15,38% i był niższy w porównaniu do pozostałych grup, dla których mieścił się w przedziale 23,12% do 24,57%, a dla struktury α -helisy w przedziale od 17,71% (**HEMC-P**) do 26,60% (**HEMC-E**). Zauważyć można, iż dla grupy **HEMC-E** średni udział struktury α -helisy był wyższy od struktury nieuporządkowanej w odróżnieniu od pozostałych grup. Dla struktury beta-karty z minimum przy 1631-1629 cm^{-1} wyniki obserwowano w zakresie od 22,17% (**HEMC-L**) do 23,76% (**HEMC-P**), a z minimum przy 1694-1692 cm^{-1} odpowiednio od 11,42% (**LEUK-PD**) do 13,26% (**HEMC-L**). Dla struktury beta-zakrętu z minimum przy 1680-1679 cm^{-1} wartości te mieściły się w zakresie od 20,09% (**HEMC-P**) do 22,51% (**HEMC-E**). Co więcej, w odróżnieniu od pozostałych grup dla uśrednionego widma grupy **HEMC-E** średnia dla udziału procentowego tej struktury była niższa niż w przypadku struktury alfa-helisy. Najniższy średni udział procentowy charakteryzował strukturę beta-zakrętu z minimum przy 1671-1670 cm^{-1} (0,10-0,18%). Dla

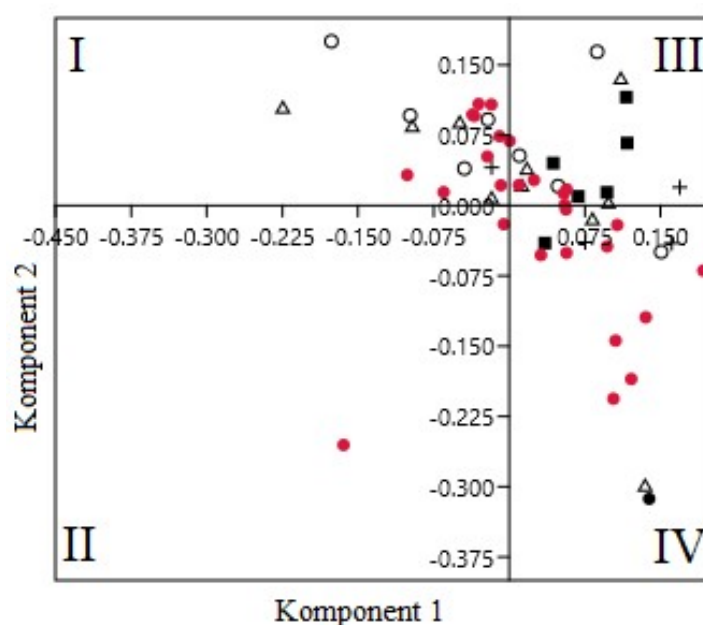
obserwowanych różnic nie wykazano jednak istotności statystycznej. Rycina poniżej przedstawia rozrzut danych obserwowany dla pojedynczych pacjentów w grupach (rycina 48.)



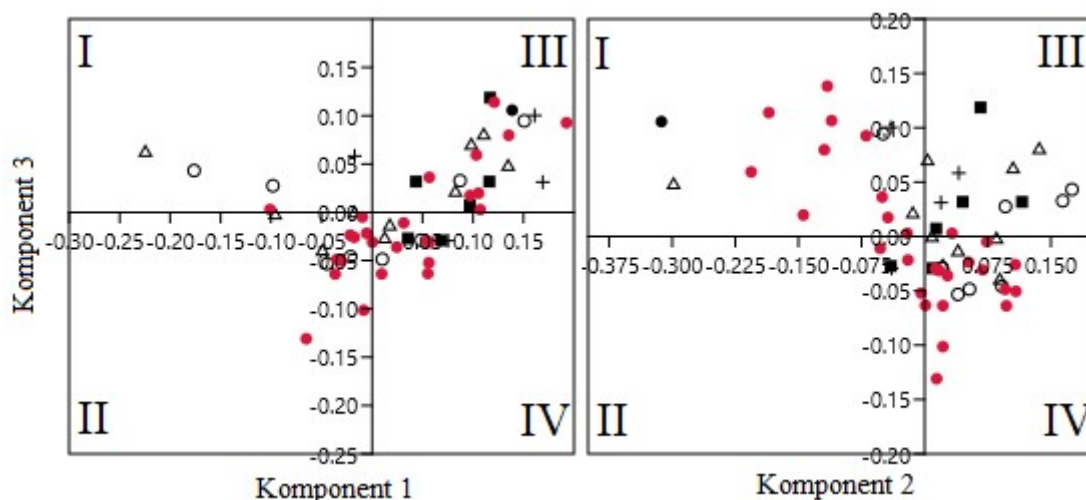
Rycina 48. Zestawienie udziału procentowego struktur drugorzędowych białek dla poszczególnych podgrup **HEMC** i **LEUK-PD**.

4.2.3. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego

Przeprowadzono analizę HCA i PCA dla widm lizatu komórkowego szpiku kostnego. Wykresy wyników względem PC1, PC2 oraz PC3 umieszczono na rycinach 49-50. Wyniki dla grupy **LEUK-PD** zaznaczono kolorem czerwonym, a kolorem czarnym dla podgrup **HEMC**. Dla podgrup HEMC zastosowano następujące symbole: pacjenci z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).

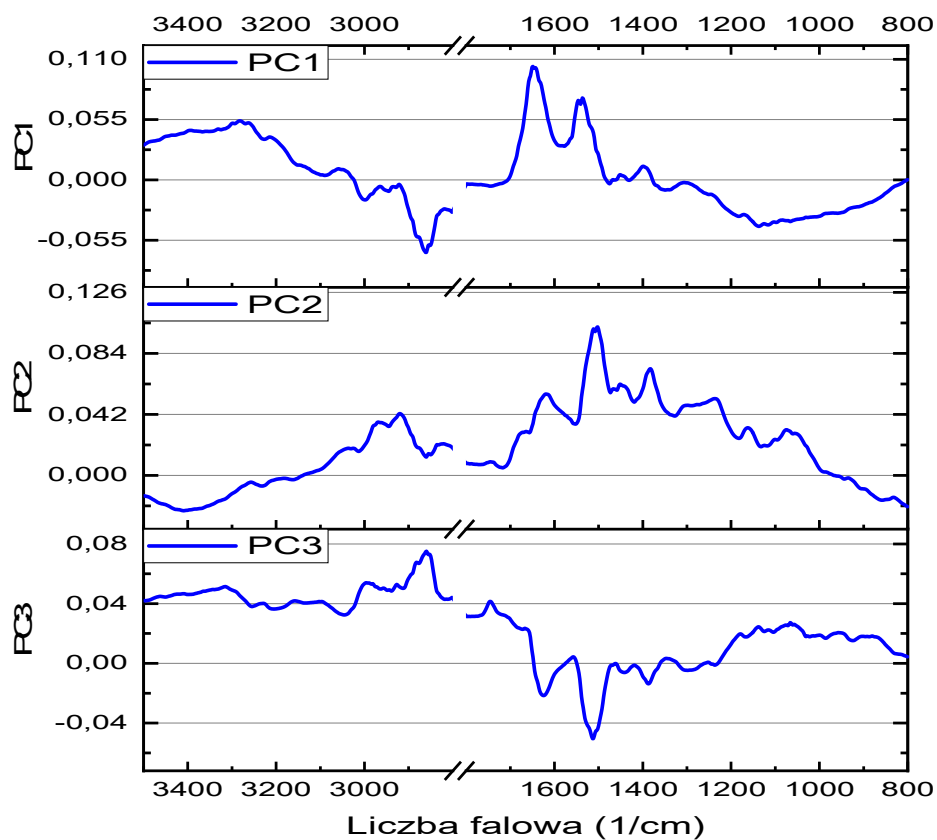


Rycina 49. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grupy **LEUK-PD** (kolor czerwony) oraz podgrup **HEMC** (kolor czarny) w zakresie $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ i $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).



Rycina 50. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 (wykres po prawej stronie) oraz PC1 i PC3 (wykres po lewej stronie) grupy **LEUK-PD** (kolor czerwony) oraz podgrup **HEMC** (kolor **czarny**) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm lizatu komórkowego szpiku kostnego. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (o), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią ($\blacksquare$).

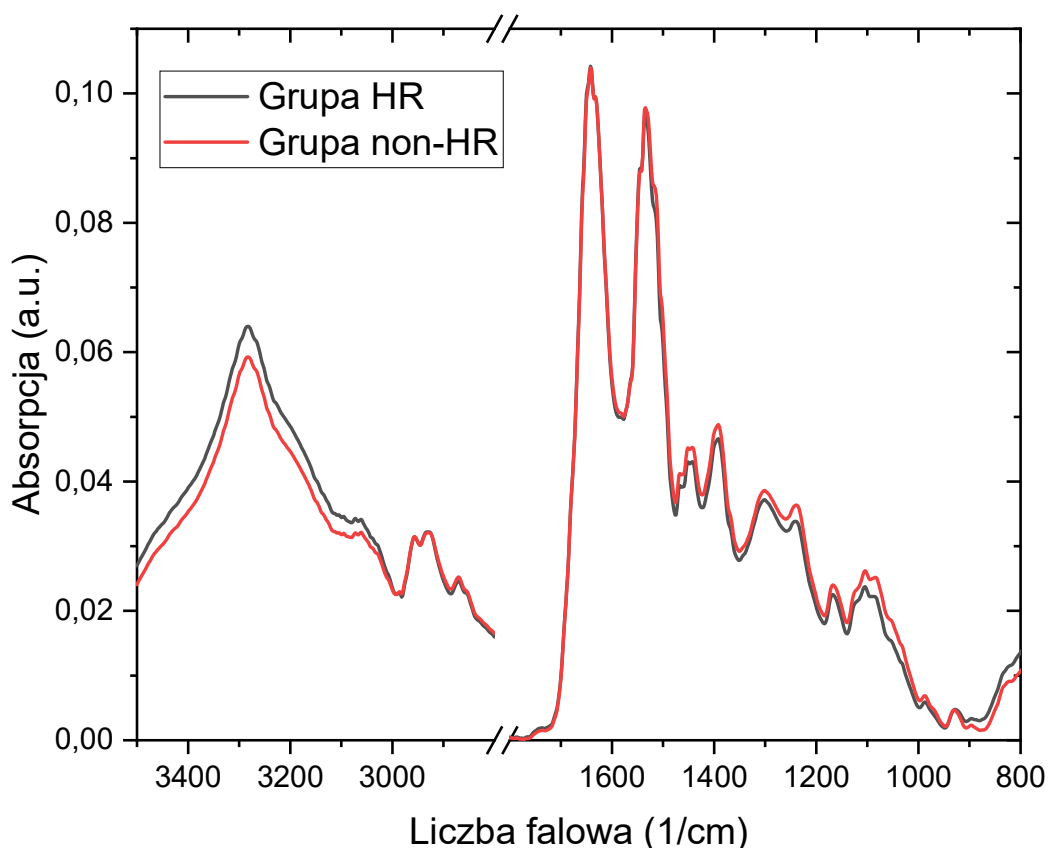
Analizując położenie wyników dla **HEMC** i **LEUK-PD** względem PC1 wyjaśniającej 57,90 % wariancji, a także PC2 (17,89%) i PC3 (13,48%), nie stwierdzono klastrowania się wyników **LEUK-PD**, które rozmieszczone są pośród wyników pacjentów z podgrup **HEMC**. Uwzględniając PC1 dla podgrup **HEMC** zaobserwowano jednak, iż wyniki dla **HEMC-W** położone były w III i IV kwadracie wykresu odpowiadającym pozytywnym PC1, które można wyjaśnić ujemnymi wartościami obciążeń (rycina 49.). Obciążenia te są charakterystyczne dla drgań asymetrycznych i symetrycznych rozciągających grup CH_2 (odpowiednio 2944 cm^{-1} i 2859 cm^{-1}), a także dla drgań rozciągających grup C-H (3000 cm^{-1}). Analizując położenie wyników względem PC2 i PC3 również nie stwierdzono wyraźnego klastrowania się wyników dla **LEUK-PD** i podgrup **HEMC**. Wykresy obciążeń przedstawiono na rycinie 51. Brak możliwości potwierdzenia skuteczności analizy PCA potwierdzono także w analizie HCA, z uwagi na co nie publikuje się dendrogramu.



Rycina 51. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 w zakresie 3500-2800 cm^{-1} oraz 1800-800 cm^{-1} widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego grupy **LEUK-PD** oraz podgrupy **HEMC**.

4.2.4. Ocena różnic spektralnych lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniająca grupy ryzyka

Rycina 52. przedstawia uśrednione widma lizatu komórkowego szpiku kostnego dla pacjentów z grupy wysokiego ryzyka (**HR**) i spoza wysokiego ryzyka (**non-HR**) w zakresie $3500\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, z pominięciem zakresu $2800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. W tabeli 14. przedstawiono pozycję pików oraz odpowiadającymi im wartościami absorpcji wyznaczonymi dla widm obydwu grup.



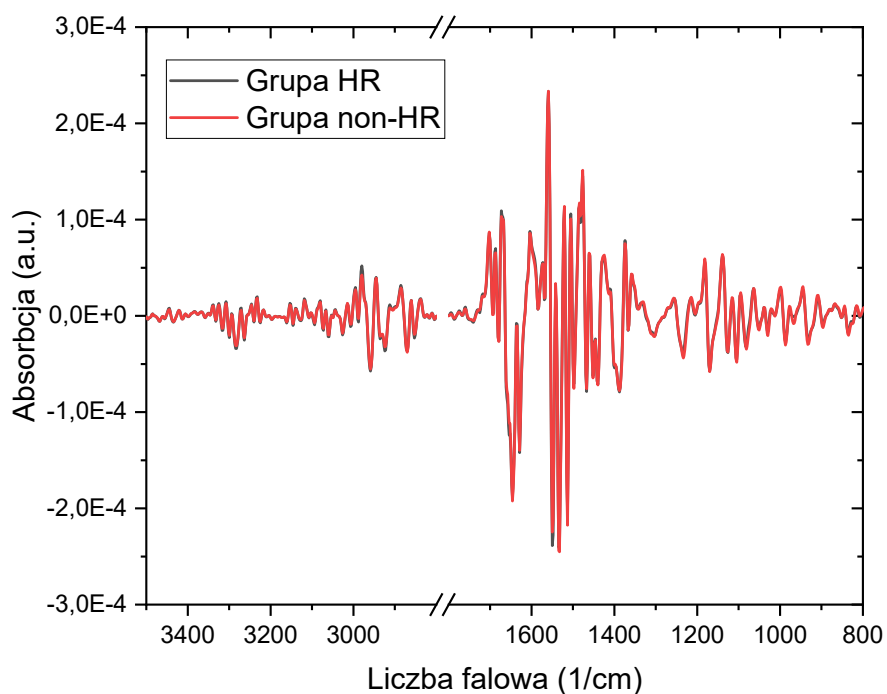
Rycina 52. Uśrednione widma FT-IR lizatu komórkowego dla pacjentów zakwalifikowanych do grupy wysokiego ryzyka (**HR** – kolor czarny) i spoza grupy wysokiego ryzyka (**non-HR** – kolor czerwony) w zakresie $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ i $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$.

Tabela 14. Pozycja pików wraz z odpowiadającą im wartością absorpcji dla uśrednionych widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego grup HR i non-HR.

Grupa HR		Grupa non-HR	
Maksimum pików [cm ⁻¹]	Absorpcja [a.u.]	Maksimum pików [cm ⁻¹]	Absorpcja [a.u.]
3283	0,063	3283	0,060
3104	0,035	3104	0,032
3095	0,035	3095	0,032
3072	0,035	3072	0,034
3061	0,035	3061	0,033
2986	0,023	2986	0,023
2956	0,032	2956	0,032
2928	0,033	2829	0,033
2870	0,026	2870	0,025
2855	0,024	2855	0,023
1743	0,002	1743	0,002
1642	0,106	1642	0,105
1632	0,100	1632	0,100
1545	0,090	1545	0,089
1515	0,099	1515	0,099
1467	0,041	1467	0,042
1451	0,045	1451	0,046
1392	0,049	1392	0,049
1302	0,040	1302	0,039
1239	0,036	1239	0,037
1168	0,024	1168	0,024
1105	0,025	1105	0,026
1085	0,022	1085	0,026
988	0,006	988	0,007
930	0,005	930	0,005
897	0,003	897	0,003

Położenie pasm oraz pozycje maksimum pików przy danej liczbie falowej było zbliżone do tego wyznaczonego dla uśrednionego widma lizatu komórkowego szpiku kostnego grupy LEUK-PD. Analizowano wartości absorpcji dla **grupy HR** i **non-HR**. Wyższą absorpcję dla regionu 3500-3000 cm⁻¹ i 1000-800 cm⁻¹ wykazano dla uśrednionego widma **grupy HR**, a dla **grupy non-HR** w zakresie od 1500 do 1000 cm⁻¹ liczby falowej. Dla zakresów 1700-1600 cm⁻¹ i 1600-1500 cm⁻¹, a także 3000-2800 cm⁻¹ wartości absorpcji były zbliżone. Dla żadnej z obserwowanych różnic nie wykazano

istotności statystycznej. Maksima pików obserwowano dla obydwu grup przy tych samych liczbach falowych. Widmo drugiej pochodnej dla grup HR i non-HR przedstawia rycina 53.



Rycina 53. Widmo drugiej pochodnej lizatu komórkowego szpiku kostnego grup HR (kolor czarny) i non-HR (kolor czerwony) w zakresie 3500-800 cm^{-1} z pominięciem zakresu 2800-1800 cm^{-1} wolnego od absorpcji światła podczerwonego dla próbek biologicznych.

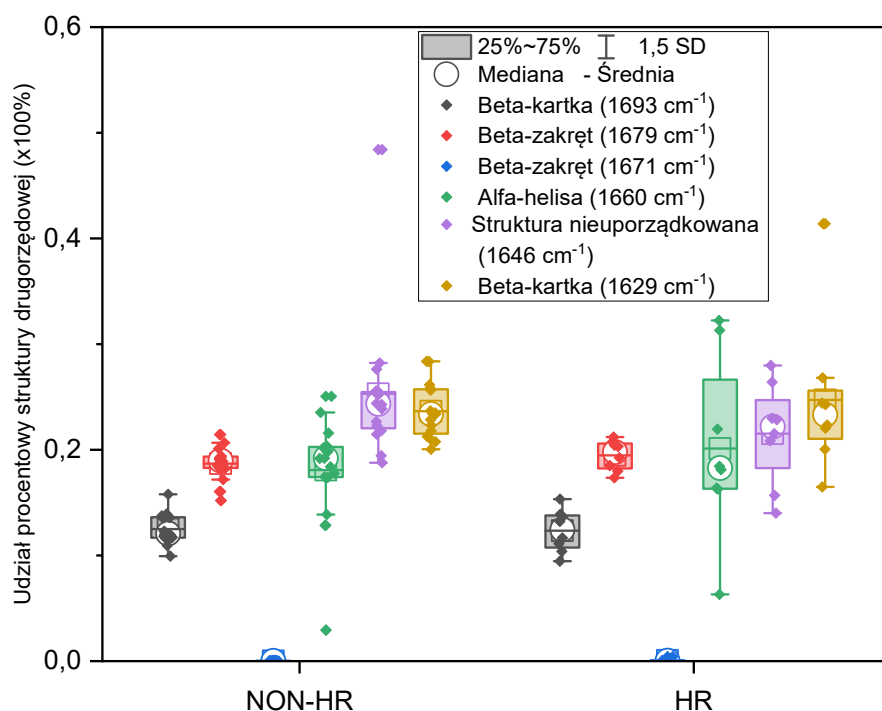
4.2.5. Określenie drugorzędowej struktury białek – analiza pasm składowych zakresu amidu I widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniająca grupę ryzyka

W tabeli poniżej (tabela 15.) przedstawiono udział procentowy struktur drugorzędowych białek dla lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z grupy wysokiego ryzyka i spoza grupy wysokiego ryzyka.

Tabela 15. Udział procentowy poszczególnych struktur drugorzędowych dla uśrednionych widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego dla pacjentów z białaczką zakwalifikowanych do grup wysokiego ryzyka (**grupa HR**) i pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka (**grupa non-HR**)

Grupa/Struktura drugorzędowa	Średni procentowy udział struktury drugorzędowej białek [%]					
	β -kartka (1693 cm^{-1})	β -zakręt (1679 cm^{-1})	β -zakręt (1671 cm^{-1})	α -helisa (1660 cm^{-1})	Struktura nieuporządkowana (1646 cm^{-1})	β -kartka (1629 cm^{-1})
Grupa non-HR	11,48%	20,18%	0,10%	15,29%	27,53%	24,59%
Grupa HR	11,30%	20,70%	0,00%	16,09%	24,97%	25,54%

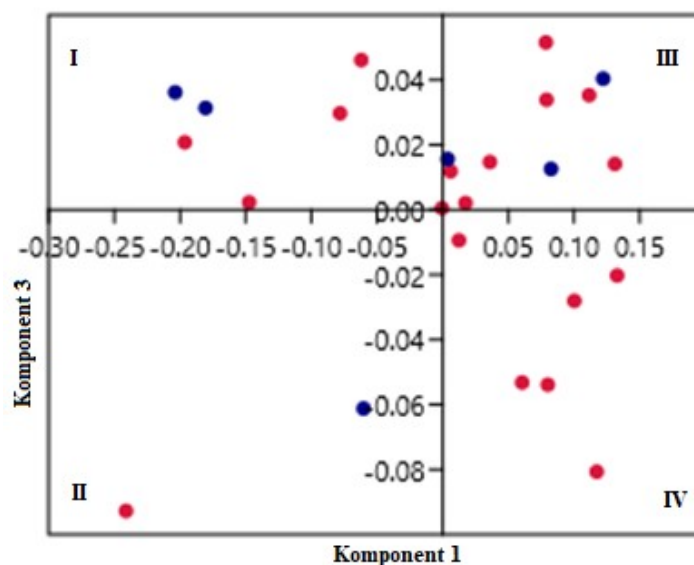
Zbliżone wartości dla średnich udziałów procentowych poszczególnych konformacji białek stwierdzono analizując uśrednione widma pacjentów przyporządkowanych do **grupy HR** i **non-HR**. W przypadku **grupy HR** najwyższą średnią dla udziału procentowego odnotowano dla struktury β -kartki (minimum 1631-1629 cm^{-1}) wynoszącą 25,54%, a dla **grupy non-HR** było to 27,53% zaobserwowane dla struktury nieuporządkowanej. Dla struktury β -kartki z minimum w zakresie 1694-1692 cm^{-1} oraz 1631-1629 cm^{-1} , β -zakrętu (1680-1679 cm^{-1}) i α -helisy (1661-1660 cm^{-1}) różnica w średniej wartości udziału nie przekraczała 2%. Średni udział procentowy struktury β -zakrętu z minimum w zakresie 1671-1670 cm^{-1} wynosił dla **grupy non-HR** 0,10%, a dla **grupy HR** był bliski 0%, podczas gdy dla α -helisy (1660 cm^{-1}) wynosił odpowiednio 15,29% i 16,09%. Udział procentowy struktur nieuporządkowanych cechowała największa różnica, wynosząca ok. 2,5% - w **grupie HR** średni udział procentowy dla tej struktury wynosił 24,97%, podczas gdy dla **grupy non-HR** było to 27,53%. Co ważne, dla żadnej z analizowanych zmiennych różnica nie była istotna statystycznie. Rozrzut danych dla pojedynczych pacjentów w grupie przedstawiono na rycinie 54.



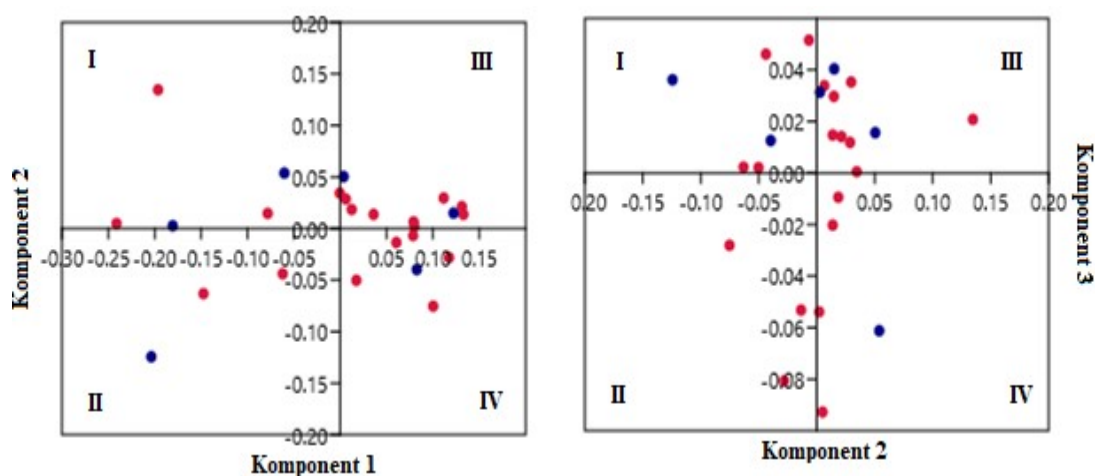
Rycina 54. Zestawienie udziału procentowego struktur drugorzędowych białek dla **grupy HR** i **non-HR**.

4.2.6. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniające grupę ryzyka

Rycina 55. i Rycina 56. przedstawiają wykresy wyników analizy PCA przeprowadzonej dla widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów LEUK-PD z **grupy HR** oznaczone na wykresach kolorem niebieskim oraz pacjentów z **grupy non-HR**, oznaczonych na wykresach kolorem czerwonym.



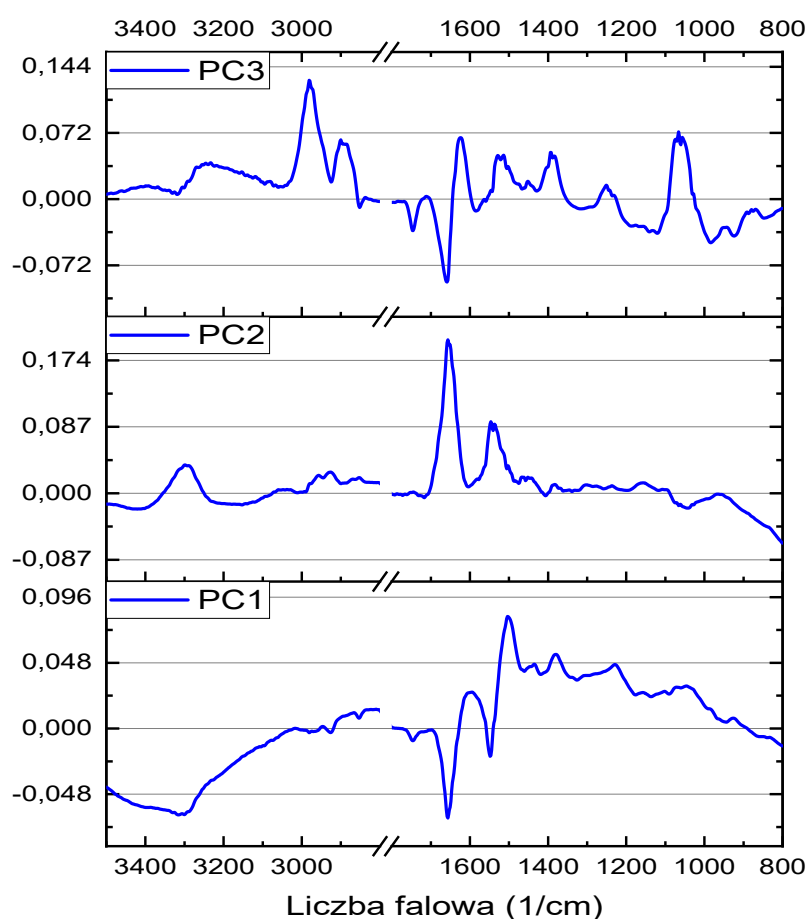
Rycina 55. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 dla **grupy HR** (kolor niebieski) i **grupy non-HR** (kolor czerwony) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego.



Rycina 56. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 (prawa strona) oraz PC1 i PC2 (lewa strona) **grupy HR** (kolor niebieski) i **grupy non-HR** (kolor czerwony) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm lizatu komórkowego szpiku komórkowego.

Wyniki dla pacjentów z **grupy HR** i **grupy non-HR** nie wykazywały tendencji do klastrowania względem komponentu 1 (64,94% wariancji) i komponentu 2 (12,12%). Wyniki dla **grupy HR** były rozproszone spośród wyników pacjentów z **grupy non-HR**. Uwzględniając komponent 3 wyjaśniający 7,90% wariancji dla wyjściowych danych spektralnych zauważono iż z wyjątkiem jednego wyniki dla **grupy HR** położone są w I

i III kwadracie wykresu odpowiadającym dodatnim wartościom PC3, objaśnianym przez ujemne obciążenia (rycina 55.). Obciążenia tym przypisuje się zakresy 3200-3100 cm^{-1} charakterystyczny dla drgań rozciągających grup $=\text{CH}$ i zakres 1100-1000 cm^{-1} dla którego w widmie obserwowano piki związane z drganiami rozciągającymi symetrycznymi grup fosforanowych DNA, RNA, fosfolipidów i białek fosforylowanych jak również drgania rozciągające grup C-O. Nie można jednak potwierdzić skuteczności analizy PCA ze względu na rozproszenie wyników dla pacjentów z **grupy HR** wśród wyników tych z **grupy non-HR**, a także brak powiązania położenia wyników pacjentów z **grupy HR** z czynnikami wczesnej grupy wysokiego ryzyka i poziomem minimalnej choroby resztkowej. Pod względem wystąpienia wznowy bądź zgonu pacjenta analizy wyników nie przeprowadzono, z uwagi na fakt, iż tylko dla 1 pacjenta ze wznową dysponowano widmem FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Wykresy obciążeń przedstawiono na rycinie 57.



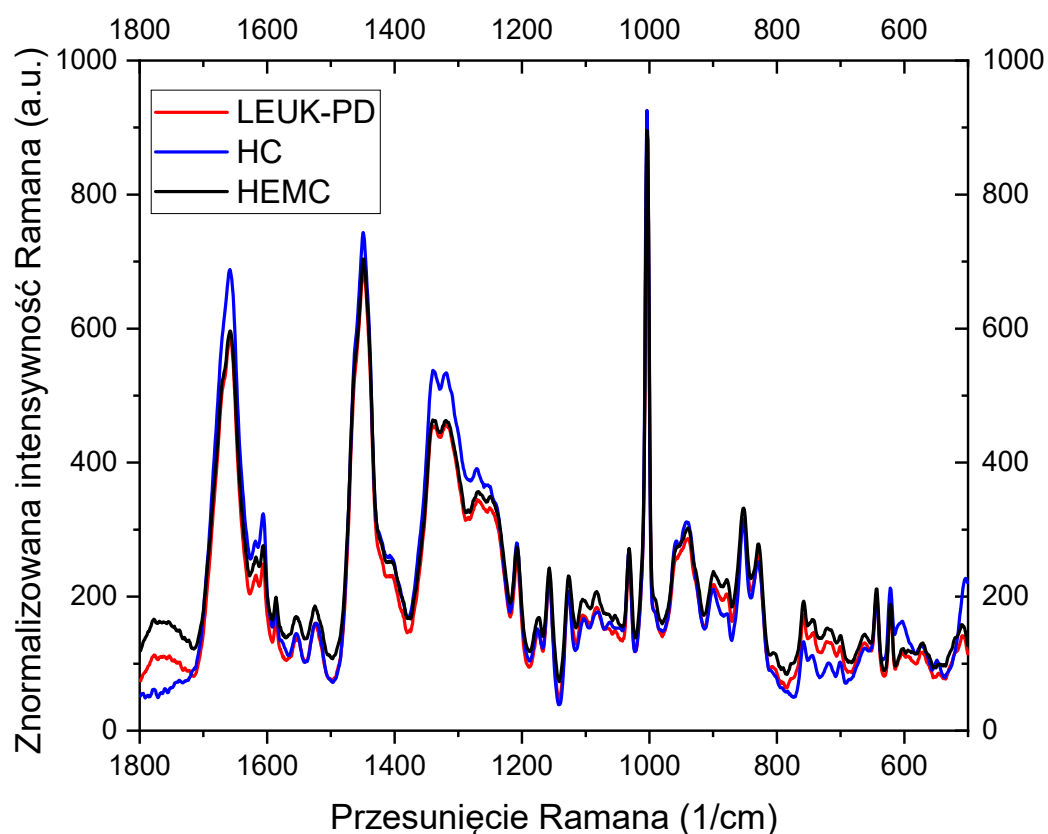
Rycina 57. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 w zakresie 3500-2800 cm^{-1} oraz 1800-800 cm^{-1} widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego **grupy HR** i **grupy non-HR** LEUK-PD.

4.3. Spektroskopia Ramana - SUROWICA

4.3.1. Wyznaczenie pasm charakterystycznych dla widm ramanowskich surowicy oraz porównanie wartości znormalizowanej intensywności

Rycina 58. przedstawia widma oryginalne surowicy uśrednione dla grupy zdrowych pacjentów (kolor niebieski - **HC**), pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (kolor czarny - **HEMC**) oraz pacjentów z białaczką w momencie rozpoznania (kolor czerwony – **Leuk-PD**).

W tabeli 16. zawarto położenia maksimów pików wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana.



Rycina 58. Uśrednione widma ramanowskie surowicy zdrowej kontroli (**HC** – kolor niebieski), pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (**HEMC** – kolor czarny) oraz pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (**LEUK-PD** – kolor czerwony). Widma przedstawiono dla zakresu 1800-500 cm^{-1} .

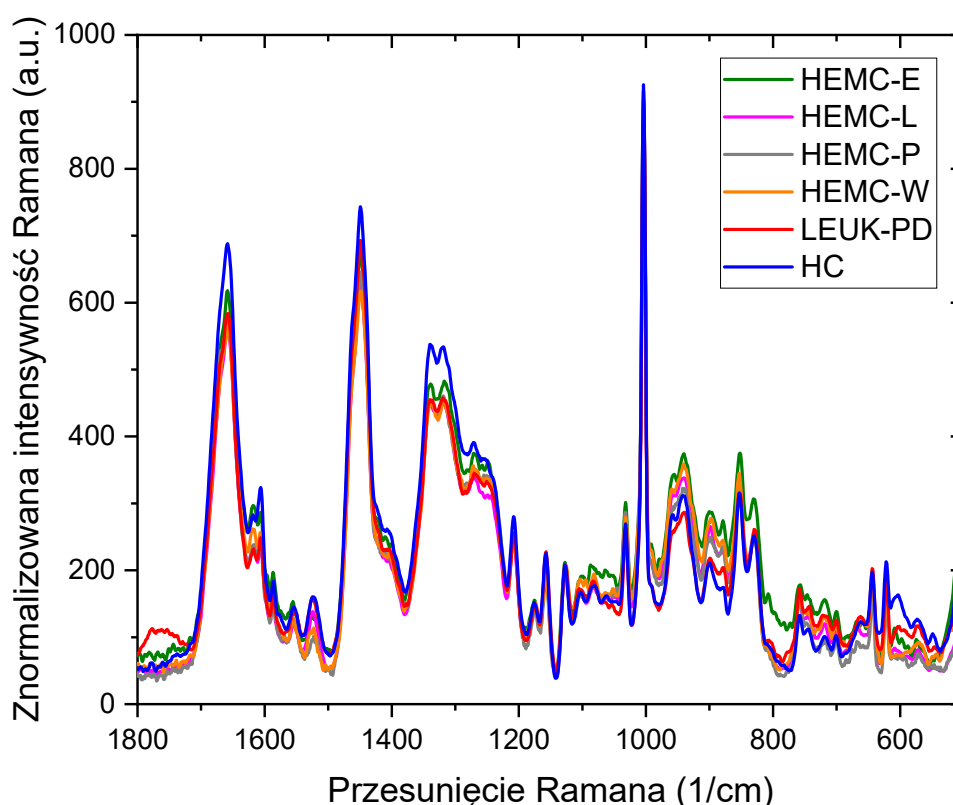
Tabela 16. Pozycje uwidocznionych maksimów dla widm ramanowskich surowicy zdrowej kontroli (**HC**), pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (**HEMC**) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (**LEUK-PD**) wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana.

Surowica HC		Surowica HEMC		Surowica LEUK-PD		Przypis biochemiczny
Pozycja Max.	Int. Ram.	Pozycja Max.	Int. Ram.	Pozycja max.	Int. Ram.	
1658	688,08	1658	596,45	1658	583,56	drgania rozciągające C=O: amid I, białka drgania rozciągające C=C: lipidy [93-98]
1618	282,93	1618	259,33	1618	232,10	drgania rozciągające C-C: tyrozyna drgania rozciągające C=C: tryptofan [94,99]
1606	323,65	1606	276,21	1606	248,83	tyrozyna [96] fenyloalanina [100]
1586	183,70	1586	199,09	1586	165,31	tyrozyna [96,99]
1553	144,50	1553	169,46	1554	137,38	tryptofan (pierścień aromatyczny) drgania rozciągające C-N i zginające N-H: amid II, białka [95-96]
1523	160,47	1524	186,05	1524	160,32	drgania rozciągające C=C: beta karoten [53,101]
1449	743,40	1449	703,77	1449	692,86	drgania wahadłowe CH ₃ /CH ₂ : lipidy/białka [53,94,95,97]
1340	537,71	1340	463,84	1339	452,04	CH ₃ /CH ₂ :kolagen, lipidy drgania deformacyjne CH: białka adenina, guanina, fenyloalanina [93-95,97,100]
1319	533,94	1319	463,00	1319	457,53	guanina drgania deformacyjne C-H: amid III, białka [93-94]
1271	390,99	1271	356,37	1270	344,82	drgania rozciągające C-N: białka [102] drgania deformacyjne N-H: amid III [96]
1209	280,24	1209	273,12	1209	254,52	fenyloalanina, tryptofan, tyrozyna (pierścień aromatyczny) [96] drgania skręcające CH ₂ : metionina [95]
1176	152,06	1175	168,39	1175	147,35	tyrozyna, fenyloalanina, drgania zginające CH: białka [53,97,99]

1158	223,87	1157	242,82	1157	227,86	drgania rozciągające C-N, C-C: białka, lipidy [93]
1127	207,65	1127	230,90	1127	208,19	drgania rozciągające C-N: białka [95] drgania rozciągające C-C: lipidy [53]
1104	167,27	1104	196,13	1105	172,60	fenyloalanina, tryptofan, tyrozyna (pierścień aromatyczny) beta-karoten [95,99]
1081	177,21	1082	207,84	1082	184,10	drgania rozciągające C-C: fosfolipidy drgania rozciągające PO ₂ ⁻ : DNA [53,93,95,99]
1063	161,94	1063	172,61	1064	152,54	drgania rozciągające szkieletowe grup C-C struktur randomowych [53,93]
1032	269,29	1032	271,90	1032	254,40	drgania wachlarzowe (Cβ – methyl) fenyloalanina tryptofan, tyrozyna (pierścień aromatyczny) [94,95]
1004	925,53	1004	895,76	1004	901,38	Fenyloalanina (pierścień aromatyczny) [53,95-96]
958	283,08	958	272,58	958	257,70	drgania grup CH ₃ : białka [93]
942	311,43	942	299,19	942	285,34	drgania rozciągające grup C-C: lipidy [95]
900	210,92	900	237,60	900	218,13	tryptofan, tyrozyna (pierścień aromatyczny) drgania rozciągające C-C: glutation drgania deformacyjne (pierścień aromatyczny): DNA [95]
878	174,23	878	225,39	879	204,12	drgania rozciągające C-C: hydroksypolina [93]
853	315,34	852	332,14	852	315,67	drgania rozciągające C-C: prolina, tyrozyna [93,95,99-100]
758	132,67	758	193,36	758	173,12	drgania deformacyjne (pierścień, aromatyczny): tryptofan [95-96.103]
744	112,02	744	165,70	744	144,84	tymina (pierścień aromatyczny): DNA [93]
720	101,07	721	153,18	721	132,48	drgania skręcające C-C: adenina, kwasy nukleinowe [94]
644	197,32	644	211,48	644	202,58	drgania deformacyjne (pierścień aromatyczny): tyrozyna [93]
622	212,83	622	188,63	622	184,01	drgania skręcające C-C: fenyloalanina [93,96,99]

Pozycja maks.* - pozycja maksimum [cm⁻¹], Int. Ram. – znormalizowana intensywność Ramana (a.u.)

Widma ramanowskie uśrednione dla podgrup **HEMC** tj. anemia (**HEMC-E**), małopłytkowość (**HEMC-P**), leukopenia (**HEMC-L**), pancytopenia (**HEMC-W**) oraz **HC** i **LEUK-PD** przedstawia Rycina 59. Tabela 17. zawiera wyznaczone pozycje pików wraz z odpowiadającymi im wartościami intensywności widma ramanowskiego.



Rycina 59. Uśrednione widma ramanowskie surowicy dla poszczególnych podgrup utworzonych dla pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (**HEMC-E** – kolor zielony, **HEMC-P** – kolor szary, **HEMC-L** – kolor różowy, **HEMC-W** – kolor pomarańczowy) oraz **HC** (kolor niebieski) i **LEUK-PD** (kolor czerwony).

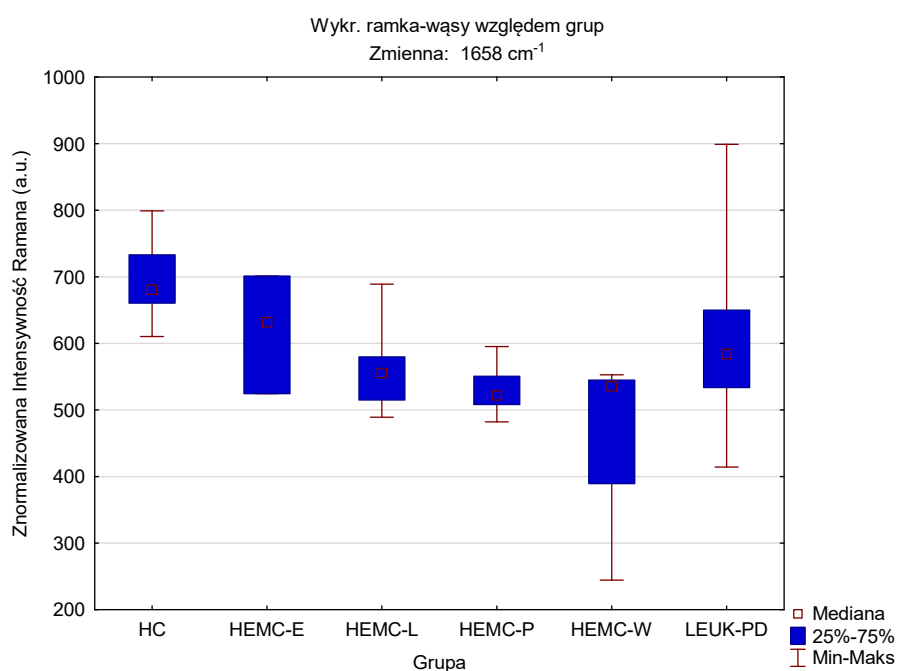
Tabela 17. Pozycja uwidocznionych maksimów widma ramanowskiego wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana dla poszczególnych podgrup pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi.

Pozycja Max.*	Znormalizowana Intensywność Ramana (a.u.)			
	Surowica HEMC-L	Surowica HEMC-W	Surowica HEMC-E	Surowica HEMC-P
1658	688,08	467,13	619,15	531,53
1618	296,81	253,55	277,86	236,09
1606	323,65	227,40	271,87	239,94
1586	196,86	167,12	174,38	147,84
1553	116,84	103,06	155,67	123,27
1523	138,07	86,88	169,63	106,80
1449	636,23	513,74	677,14	634,69
1340	453,59	445,46	466,95	449,12
1319	451,17	424,37	477,53	462,22
1271	337,07	349,19	323,37	353,04
1209	246,97	260,45	223,67	257,15
1176	144,92	153,60	135,59	145,20
1158	218,03	200,54	197,01	188,14
1127	199,96	214,88	198,88	191,08
1103	171,46	203,97	180,82	162,24
1080	176,50	199,07	197,01	169,51
1063	161,07	189,83	182,56	160,86
1032	271,59	285,68	262,85	281,70
1004	904,97	897,03	902,72	901,47
958	313,98	328,01	279,85	288,41
942	336,79	365,58	322,00	317,05
900	265,34	291,22	247,34	244,65
878	229,69	251,58	211,20	235,69
853	326,64	348,07	364,94	319,95
758	153,19	161,61	236,63	173,94
744	128,06	154,89	224,81	131,04
721	120,17	136,08	217,10	102,64
644	174,02	192,85	241,82	162,75
622	167,02	168,40	201,58	144,65

*Pozycja Max. – pozycja maksimum piku wyrażona [cm^{-1}]

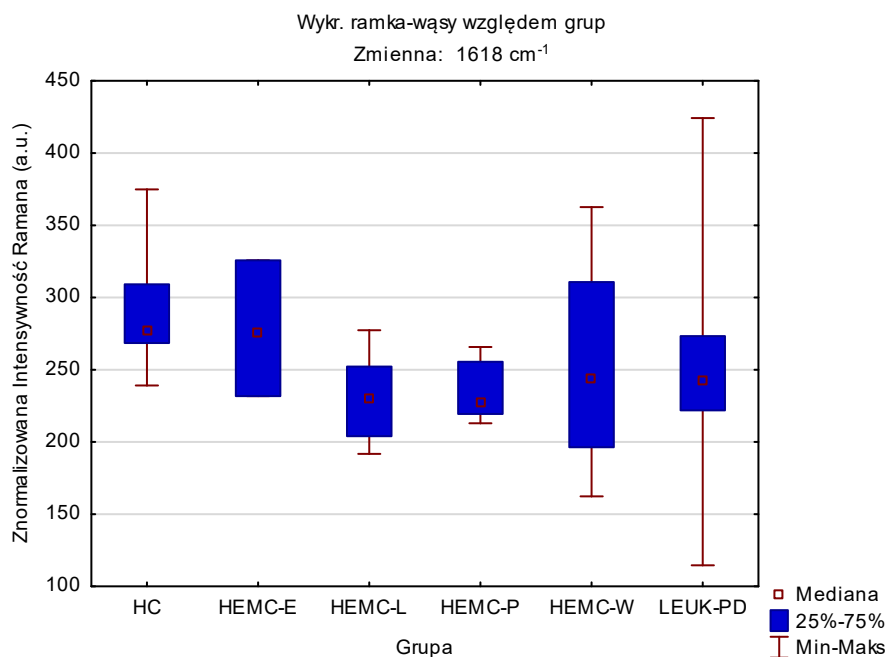
Analizowano wykazywanie pasm absorpcji i wartość absorpcji w zakresie daktyloskopowym, tj. w zakresie przesunięcia Ramana od 1800 do 600 cm^{-1} uśrednionych widm. Dla poszczególnych grup obserwowano różnice w wartości intensywności pików i ich położeniu, które zmieniało się w zakresie $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$, tj. mieściło się w zakresie rozdzielczości uzyskanej dla widm, przez co nie można stwierdzić iż zmiany te miały charakter istotnych statystycznie. Wyższą intensywnością w zakresie 1800-1600 cm^{-1} jak i 1550-1250 cm^{-1} charakteryzowało się widmo grupy **HC** i **HEMC-E**, w zakresie 1250-1100 cm^{-1} intensywność widm była zbliżona dla wszystkich analizowanych grup, podczas gdy zakres 1100-600 cm^{-1} cechowało największe zróżnicowaniem pod względem intensywności widma.

Pik charakterystyczny dla rozciągających drgań C=O amidu I (białka) i C-C (lipidy) położony był przy 1658 cm^{-1} . Istotne statystycznie różnice dla wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla pików 1658 cm^{-1} zauważono dla **HC** i **LEUK-PD** ($p=0,001537$) jak również **HC** i podgrup **HEMC**: **HEMC-L** ($p=0,000589$), **HEMC-P** ($p=0,002681$), a także **HEMC-W** ($p=0,005238$)(rycina 60).

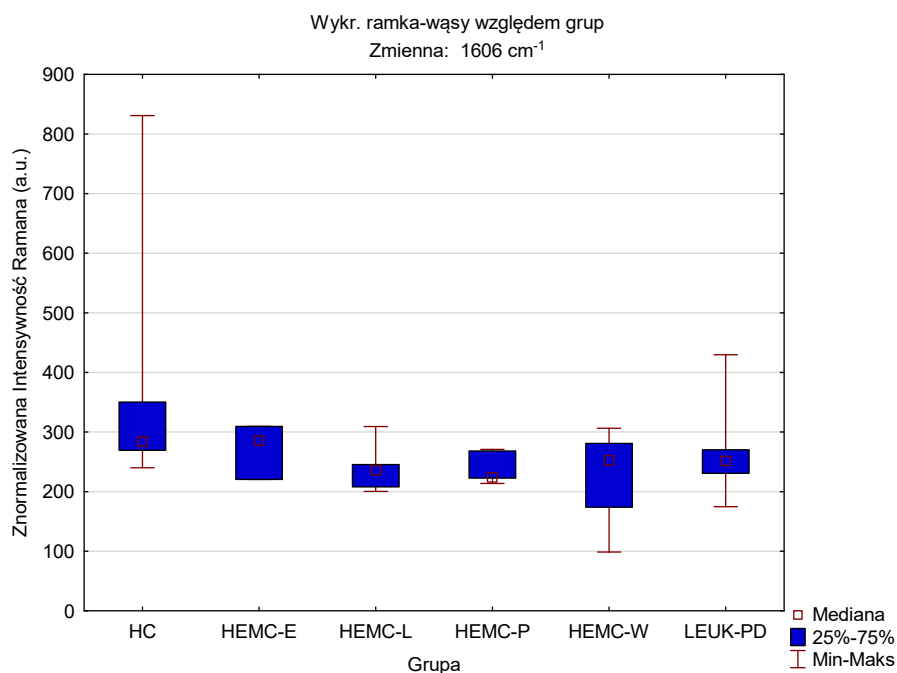


Rycina 60. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1658 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p<0,0001$).

Przypisywany dla drgań wiązania C-C tyrozyny i drgań rozciągających wiązania C=C tryptofanu pik występował przy pozycji 1618 cm^{-1} , a wartość znormalizowanej intensywności Ramana różniła się istotnie statystycznie pomiędzy grupą **HC** i **LEUK-PD** ($p=0,020316$) oraz **HC** i **HEMC-L** ($p=0,05087$)(rycina 61.). Inne piki przypisywane dla aminokwasów położone były przy 1606 cm^{-1} , 1586 cm^{-1} , $1554/1553\text{ cm}^{-1}$, $1340/1339\text{ cm}^{-1}$, 1209 cm^{-1} , $1176-1175\text{ cm}^{-1}$, $1105-1104\text{ cm}^{-1}$, 1032 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 900 cm^{-1} , $879-878\text{ cm}^{-1}$, $853-852\text{ cm}^{-1}$, 758 cm^{-1} , 644 cm^{-1} i 622 cm^{-1} . Pik przy 1606 cm^{-1} charakterystyczny jest dla drgań rozciągających grup C-C tyrozyny i C=C tryptofanu, natomiast przy 1586 cm^{-1} dla tyrozyny i fenyloalaniny. Wartość znormalizowanej intensywności Ramana różniła się dla pików przy 1606 cm^{-1} dla grup **HC** i **HEMC-L** ($p=0,003065$) oraz **HC** i **LEUK-PD** ($p=0,032299$)(rycina 62.).

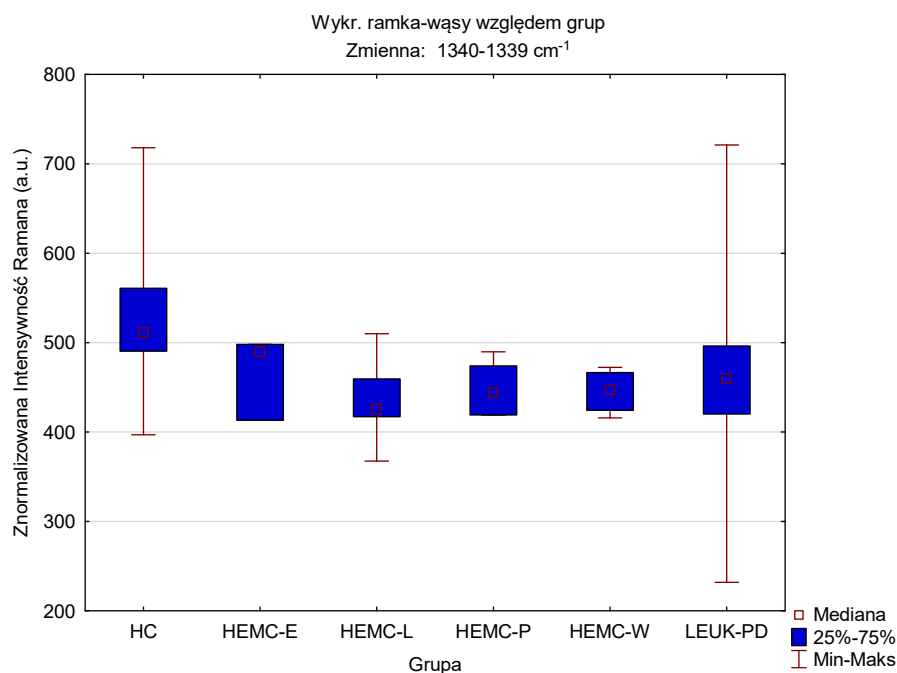


Rycina 61. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1618 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0057$).

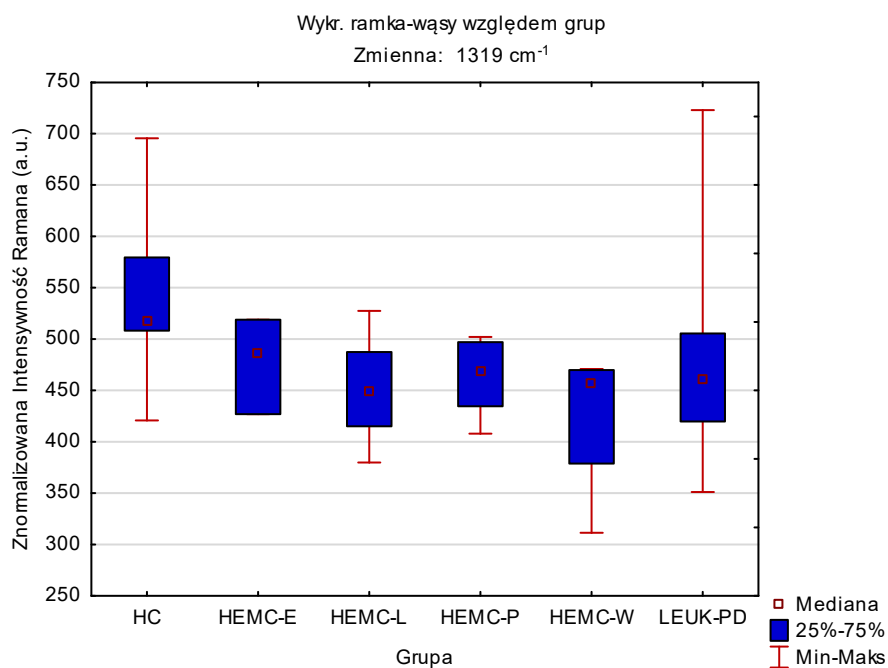


Rycina 62. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piku z maksimum przy pozycji 1606 cm⁻¹. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - p=0,0059).

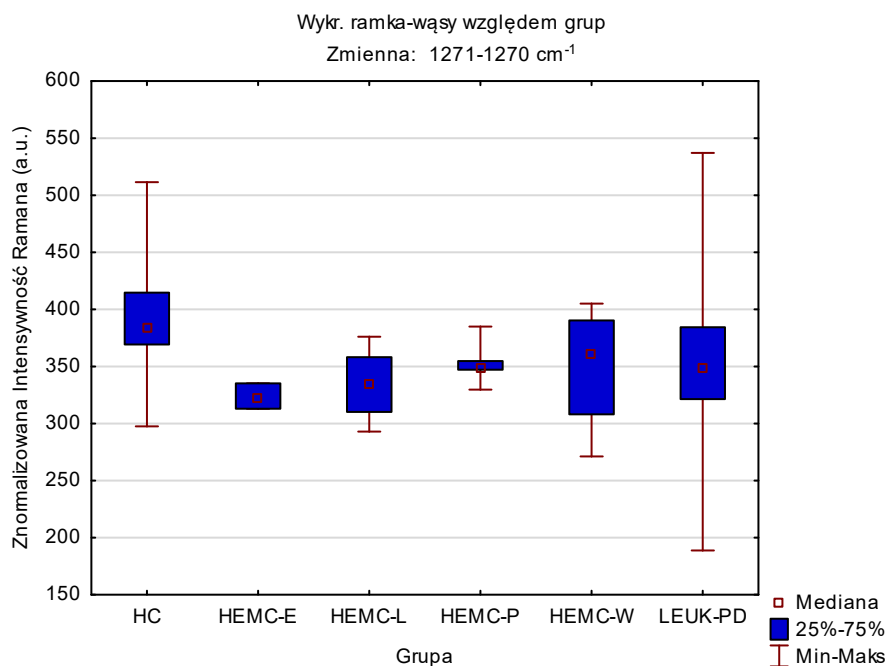
Istotne statystycznie różnice stwierdzono także dla piku przy 1340-1339 cm⁻¹, któremu przypisuje się obok fenyloalaniny drgania grup CH₃/CH₂ kolagenu, lipidów, drgania deformacyjne grup CH białek, a także drgania zasad azotowych kwasów nukleinowych – adeniny i guaniny. Różnice te zaobserwowano dla grupy **HC** i **HEMC-L** (p=0,008792), a także **HC** i **LEUK-PD** (p=0,025736)(rycina 63.). Podobną zależność zaobserwowano dla powiązanego z guaniną piku przy 1319 cm⁻¹ (**HC** i **HEMC-L** p=0,017523; **HC** i **LEUK-PD** p=0,014566), a dla piku przy 1271-1270 cm⁻¹ charakterystycznego dla drgań deformacyjnych C-H amidu III pomiędzy **HC** i **HEMC-L** (p=0,022274)(ryciny 64-65.).



Rycina 63. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1340-1339 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0135$).

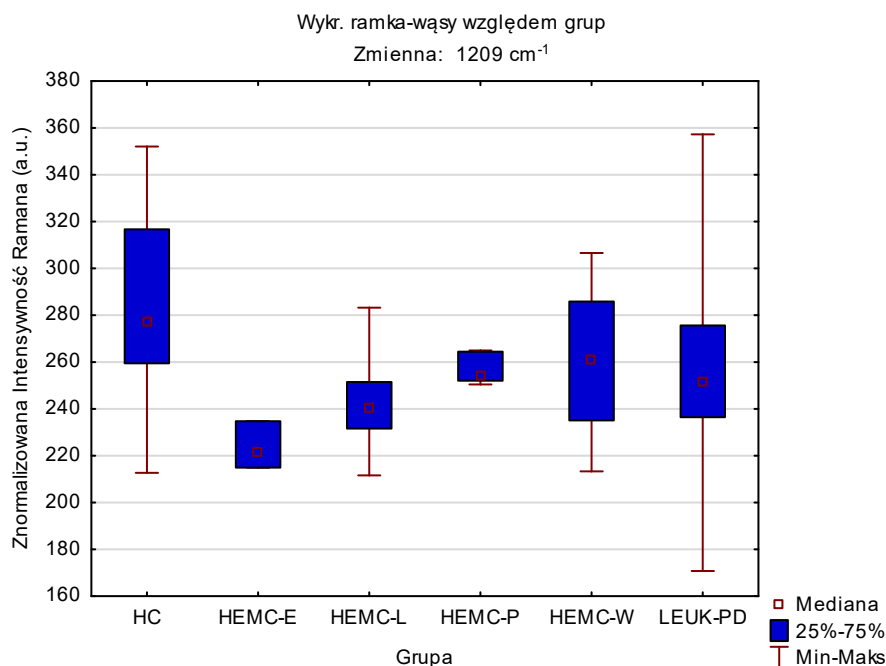


Rycina 64. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1319 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0108$).



Rycina 65. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1271-1270 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0243$).

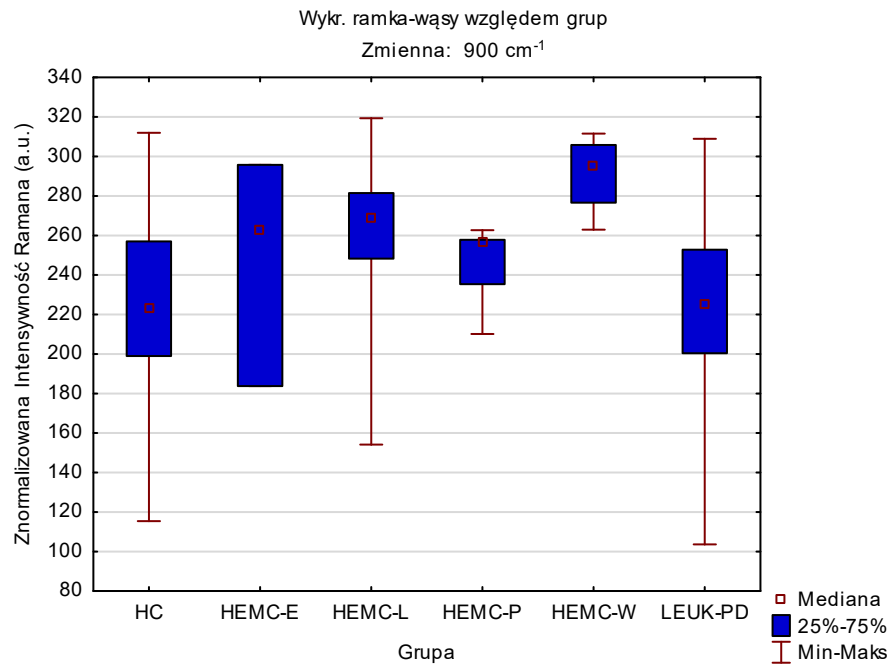
Oscylacje pierścienia aromatycznego tryptofanu i tyrozyny, a także drgania pierścienia aromatycznego fenyloalaniny i drgania grup CH_2 metioniny przypisuje się pikowi obecnemu przy 1209 cm^{-1} , dla którego wartość znormalizowanej intensywności Ramana różniła się istotnie statystycznie dla grup **HC** i **HEMC-E** oraz **HC** i **HEMC-L** (odpowiednio $p=0,029574$; $p=0,0017523$)(rycina 66). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic dla pików przy 1586 cm^{-1} (tyrozyna). Pik przy przesunięciu Ramana 1554-1553 cm^{-1} przypisywany jest głównie dla drgań pierścienia aromatycznego tryptofanu, natomiast przy 1105-1104 cm^{-1} drganiom pierścienia aromatycznego tryptofanu, jak również drganiom rozciągającym asymetrycznym pierścienia aromatycznego fenyloalaniny i tyrozyny oraz drganiom grup obecnych w beta-karotenach. Inny pik powiązany z beta-karotenami – pik przy 1524-1523 cm^{-1} najczęściej opisywany jest dla drgań rozciągających wiązań $\text{C}=\text{C}$ i $\text{C}-\text{N}$.



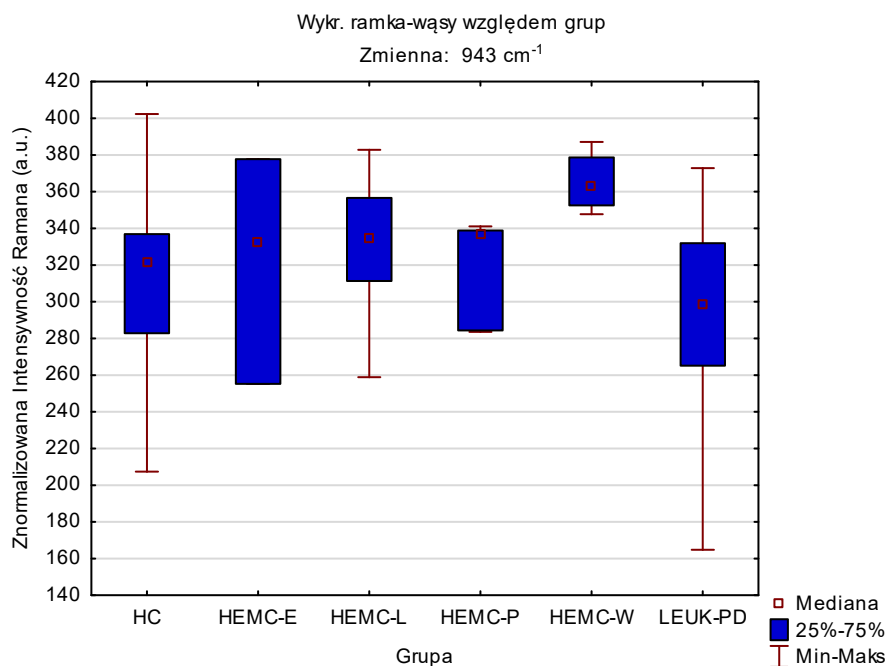
Rycina 66. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1209 cm⁻¹. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - p=0,008).

Charakterystyczne dla drgań wachlarzowych fenyloalaniny, pierścienia aromatycznego tryptofanu i tyrozyny, pierścienia aromatycznego fenyloalaniny, drgań rozciągających grup C-C hydroksyproliny, a także drgań rozciągających C-C proliny i tyrozyny piksy zaobserwowano odpowiednio przy 1032 cm⁻¹, 1004 cm⁻¹, 900 cm⁻¹, 879-878 cm⁻¹ i 853 cm⁻¹. Z kolei przy pozycji 758 cm⁻¹ obserwuje się pik charakterystyczny dla drgań deformacyjnych pierścienia aromatycznego tryptofanu, a przy 644 cm⁻¹ dla pierścienia aromatycznego tyrozyny. Pik przypisywany drganiom skręcającym wiązania C-C fenyloalaniny w widmie obecny był przy 622 cm⁻¹.

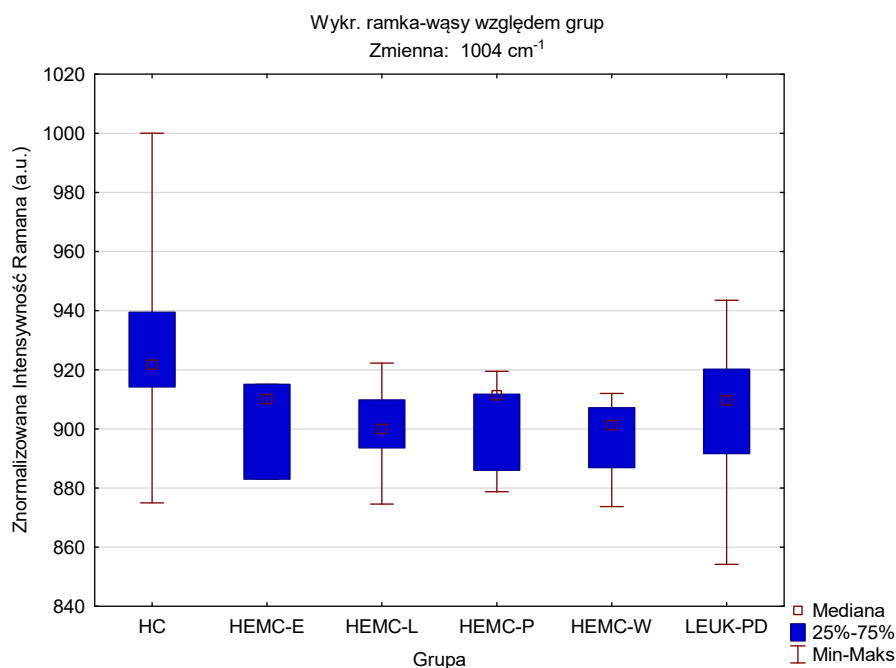
Różnice w wartości znormalizowanej intensywności Ramana obserwowano dla piksu 900 cm⁻¹, dla którego różniła się istotnie statystycznie pomiędzy grupami **LEUK-PD** i **HEMC-W** (p=0,034411)(rycina 67.) Istotnie statystyczne różnice zaobserwowano także pomiędzy tymi grupami dla piksu 942 cm⁻¹, który powiązany jest z drganiami rozciągającymi grup C-C lipidów (p=0,035413)(rycina 68). Dodatkowo dla piksu przy 1004 cm⁻¹ istotną statystycznie różnicę obserwowano dla grup **HC** i **HEMC-L** (p=0,039295, rycina 69.)



Rycina 67. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 900 cm⁻¹. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0045$).

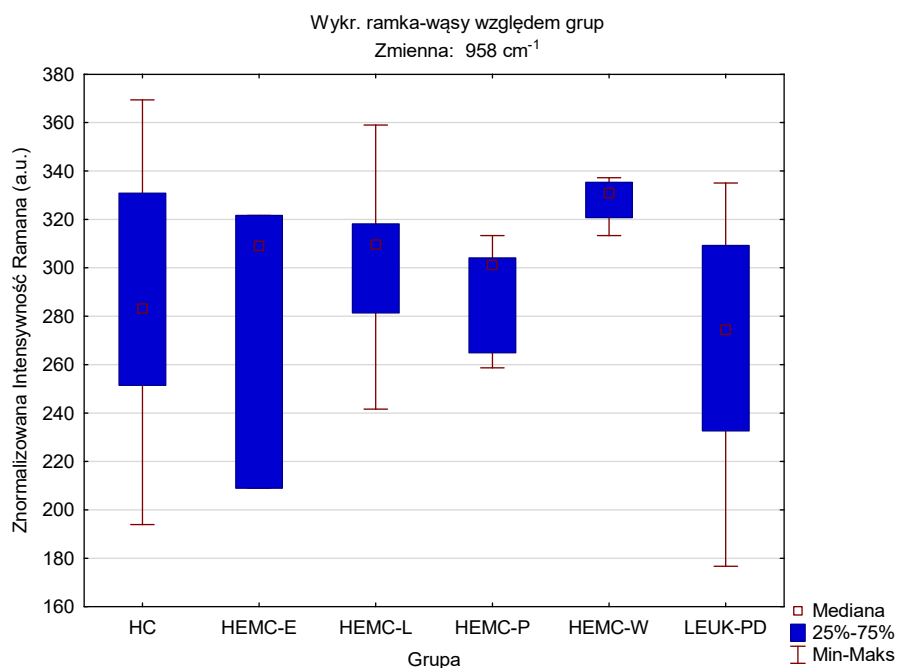


Rycina 68. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 943 cm⁻¹. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0185$).

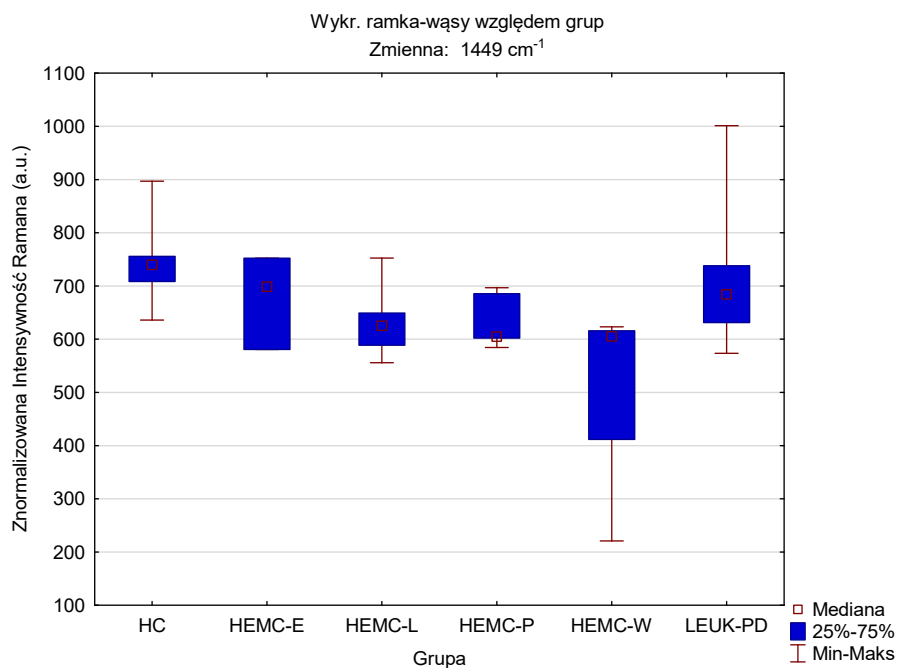


Rycina 69. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1004 cm⁻¹. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - p=0,0402).

Przypisywane dla białek pików obserwowano także dla następujących przesunięć Ramana: 1554/1553 cm⁻¹ (drgania rozciągające wiązania C=C i drgania zginających N-H amidu II), 1176 cm⁻¹ (drgania zginające C-H białek) i 958 cm⁻¹ (drgania grup CH₃ białek). Dla tego ostatniego zaobserwowano odpowiednio różnice pomiędzy grupami **HEMC-W** i **LEUK-PD** (p=0,040782, Rycina 70.). Inne pików – pików przy 1449 cm⁻¹ (odpowiadający drganiom zginającym w płaszczyźnie CH₃/CH₂), 1158 cm⁻¹ i 1127 cm⁻¹ (drgania rozciągające C-N i C-C) przypisywane są zarówno dla białek jak i lipidów. Dla pików przy 1449 cm⁻¹ istotną statystycznie różnicę stwierdzono dla grupy **HC** i **HEMC-L** oraz **HC** i **HEMC-W** (odpowiednio p=0,001131, p=0,005829) (rycina 71.). Gdy porównano wartość znormalizowanej intensywności Raman dla grup **LEUK-PD** i **HEMC-W** dla pików przy 1449 cm⁻¹ oraz 1658 cm⁻¹ nie wykazano istotnych statystycznie różnic, jednakże dalsze analizy wykazały iż czułość i specyficzność dla odróżnienia tych dwóch grup, na podstawie wartości intensywności wymienionych pików, wynosiły odpowiednio 80% i 90% (AUC=0,88333, wartość odcięcia - 625,251) oraz 68,89% i 75% (AUC=0,7556, wartość odcięcia - 538,8665).



Rycina 70. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 958 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0232$)



Rycina 71. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1449 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0002$)

W widmie RS zaobserwowano także pik przy 1080 cm^{-1} związany z drganiami rozciągającymi fosfolipidów, a także drganiami grup PO_2^- kwasów nukleinowych. Drganiom pierścieni aromatycznych tyminy i drganiom skręcającym C-C adeniny odpowiadały piki przy pozycji odpowiednio 744 cm^{-1} i $721\text{-}720\text{ cm}^{-1}$. Pik 900 cm^{-1} wcześniej omawiany jako powiązany z aminokwasami, przypisywany jest także drganiom pierścieni aromatycznych kwasu DNA i drganiom rozciągającym C-C glutationu. W widmie Ramana zaobserwowano także piki związane z drganiami rozciągającymi C-C szkieletu struktur randomowych przy przesunięciu Ramana $1064\text{-}1063\text{ cm}^{-1}$.

Na podstawie krzywy ROC wyznaczono czułość i specyficzność dla wszystkich zmiennych, dla których stwierdzono istotną statystycznie różnicę w wartości intensywności widma. Dane zawarto w tabeli poniżej (tabela 18.) Znakiem * oznaczono piki dla których czułość i specyficzność osiągały wartość co najmniej 80%.

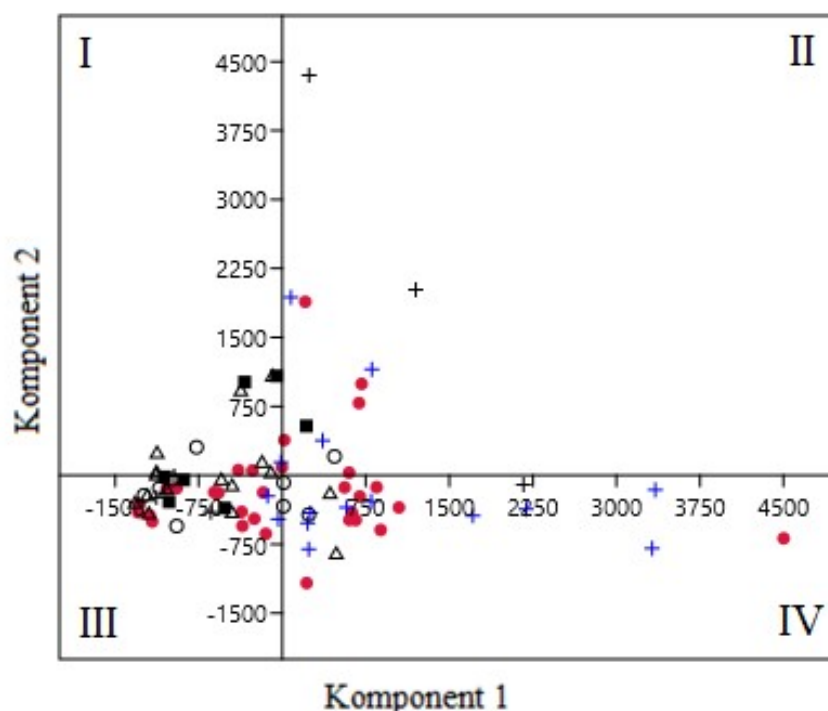
Tabela 18. Wartości czułości i specyficzności wraz z punktem odcięcia i AUC dla zmiennych, dla których zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości intensywności widma ramanowskiego surowicy.

Pik [cm^{-1}]	Grupa	Specyficzność [%]	Czułość [%]	Punkt odcięcia [a.u.]	AUC
1658	HC vs. LEUK-PD	85,71	78,95	653,372	0,82331
	HC vs. HEMC-L	92,86*	85,71*	621,7435	0,93878
	HC vs. HEMC-P	100*	100*	602,704	1
	HC vs. HEMC-W	100*	100*	581,5015	1
1618	HC vs. LEUK-PD	78,57	68,42	266,5585	0,75564
	HC vs. HEMC-L	85,71	78,57	252,4055	0,90816
1606	HC vs. LEUK-PD	71,43	68,42	272,831	0,72556
	HC vs. HEMC-L	85,71*	85,71*	259,64	0,86735
1449	HC vs. HEMC-L	92,86	78,57	651,78	0,89796
	HC vs. HEMC-W	100*	100*	629,5575	1
1340- 1339	HC vs. LEUK-PD	63,16	78,57	488,984	0,74436
	HC vs. HEMC-L	85,71	78,57	458,67	0,86735
1319	HC vs. LEUK-PD	92,86	63,16	486,555	0,75188
	HC vs. HEMC-L	85,71	71,43	477,4445	0,87755
1209	HC vs. HEMC-E	93,33*	100*	241,3305	0,93333

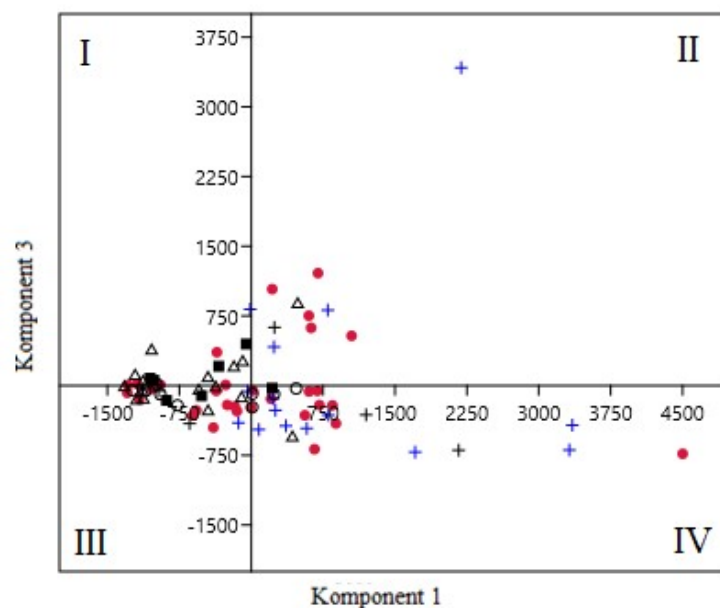
	HC vs. HEMC-L	85,71	78,57	253,3675	0,85204
1004	HC vs. HEMC-L	85,71	78,57	913,6055	0,84184
958	HEMC-W vs. LEUK-PD	100	79,07	311,7565	0,92442
944	HEMC-W vs. LEUK-PD	100*	86,67*	347,29	0,93333
900	HEMC-W vs. LEUK-PD	78,57	100	262,782	0,94444

4.3.2. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm ramanowskich surowicy

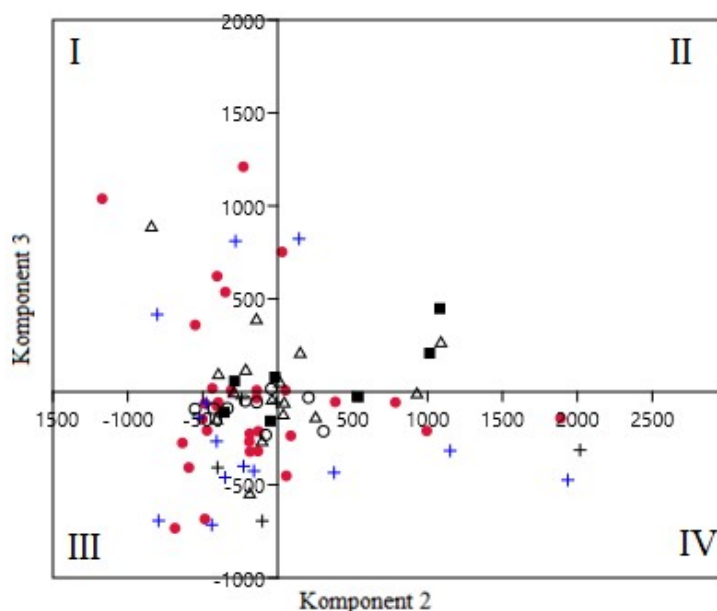
Wyniki analizy PCA dla widm ramanowskich surowicy pacjentów grupy **HC** (kolor niebieski), **LEUK-PD** (kolor czerwony) i podgrup **HEMC** (kolor czarny) przedstawiono na rycinach w formie wykresów wyników (rycina 72-74.). Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).



Rycina 72. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grupy **HC** (kolor niebieski), **LEUK-PD** (kolor czerwony) i podgrup **HEMC** (kolor czarny) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).



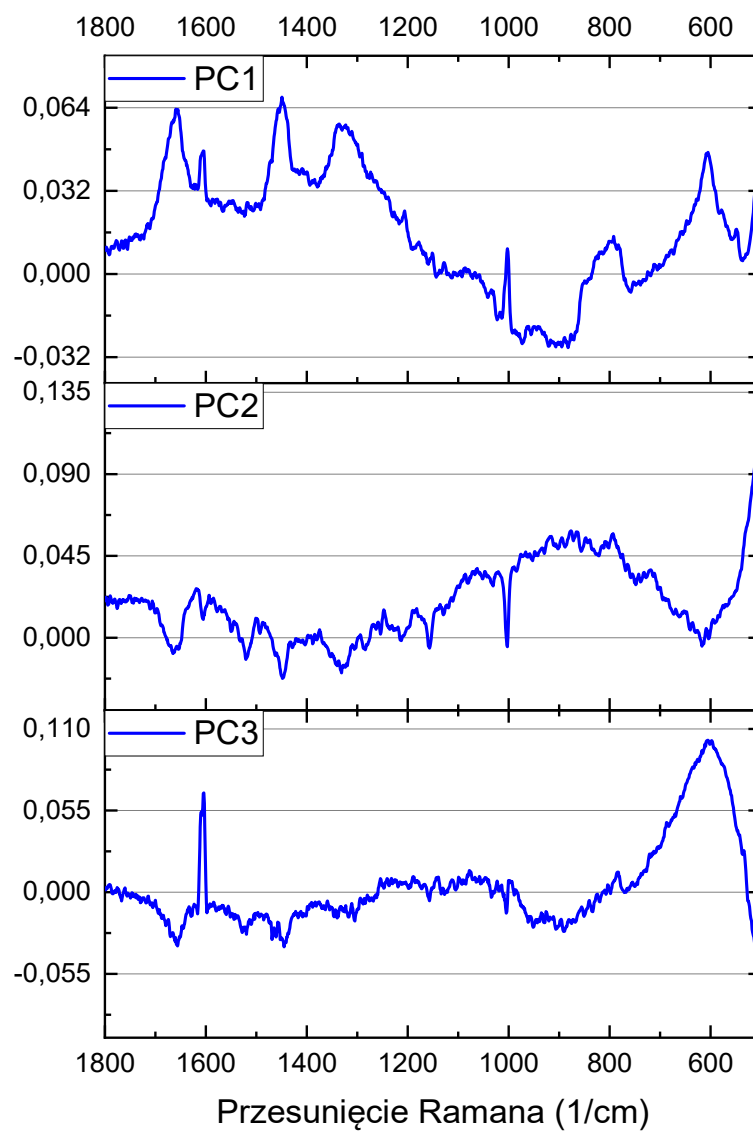
Rycina 73. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 dla grupy **HC** (kolor niebieski), **LEUK-PD** (kolor czerwony) i podgrup **HEMC** (kolor czarny) w zakresie $1800-500\text{ cm}^{-1}$ widm ramanowskich surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (o), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).



Rycina 74. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 dla grupy **HC** (kolor niebieski), **LEUK-PD** (kolor czerwony) i podgrup **HEMC** (kolor czarny) w zakresie $1800-500\text{ cm}^{-1}$ widm ramanowskich surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (o), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).

Analiza PCA nie wykazała wyraźnego klastrowania się wyników dla **LEUK-PD** względem trzech analizowanych składowych głównych (ryciny 72-74.). Gdy analizowano wykres względem PC1 i PC2 objaśniających odpowiednio 42,44% i 21,29% wariancji wyjściowych danych spektralnych zaobserwowano jednak tendencję do klastrowania się wyników dla pacjentów z pancytopenią (z wyjątkiem jednego) w kwadratach I i III odpowiadającym ujemnym wartościom komponentu 1, który można wyjaśnić dodatnimi wartościami obciążeń (rycina 72.). Dodatnim obciążeniom PC1 odpowiadają pikom przypisywanym dla drgań rozciągających C=O amidu I i drgań rozciągających C=C lipidów (1658 cm^{-1}), tyrozyny i fenyloalaniny (1604 cm^{-1}), drgań wahadłowych grup CH_3 i CH_2 lipidów oraz białek (1449 cm^{-1}), a także drgań deformacyjnych grup CH białek, zasad azotowych DNA i RNA oraz fenyloalaniny (1336 cm^{-1} i 1320 cm^{-1}) oraz glicerolu i cholesterolu (606 cm^{-1}). Z kolei wyniki dla **HC** w większości zlokalizowane były w obrębie kwadratów II i IV odpowiadającym dodatnim wartościom komponentu 1, wyjaśnianym poprzez ujemne wartości obciążeń. Ujemne wartości obciążeń powiązane są głównie z zakresem ok. $1050\text{--}850\text{ cm}^{-1}$, z którym obecne są liczne piki charakterystyczne zarówno dla aminokwasów, zasad azotowych kwasów DNA i RNA jak i białek czy lipidów, a także pikiem charakterystycznym dla tryptofanu (758 cm^{-1}) [96,97,105].

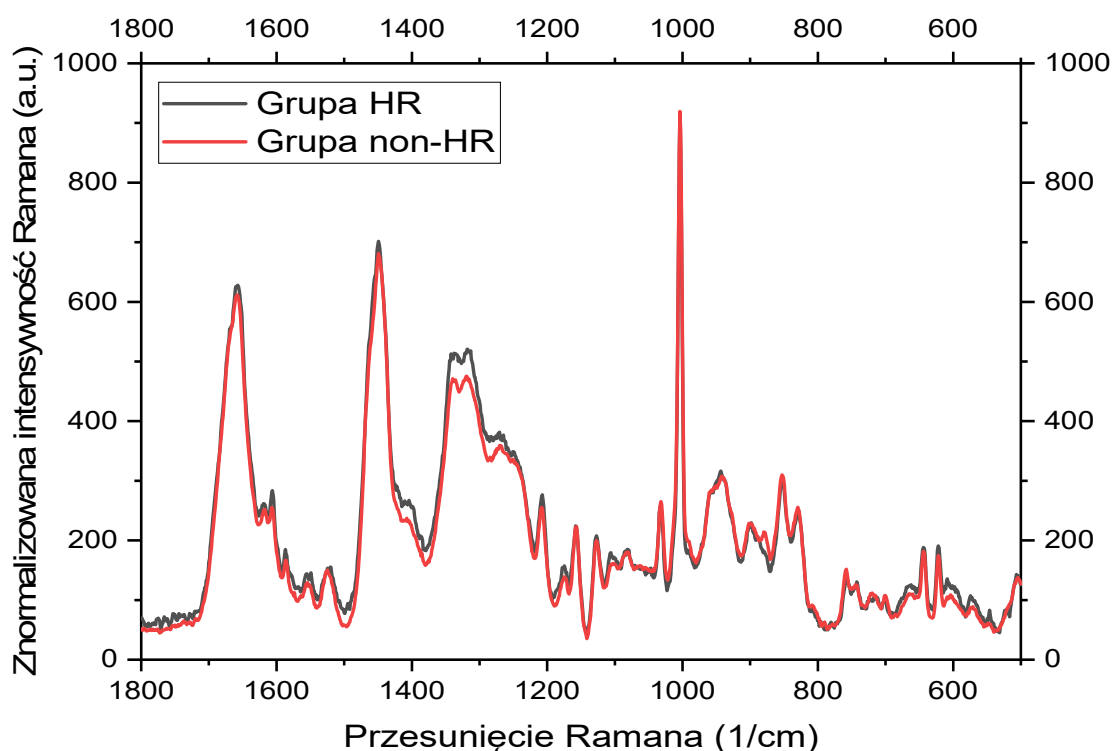
Analizując wyniki z uwzględnieniem komponentu 3 wyjaśniającego 10,77% wariancji danych wyjściowych, zauważyć można iż wyniki dla grupy **HEMC-E** (z wyjątkiem jednego) klastrują się w obrębie kwadratu III i IV, odpowiadającym ujemnym wartościom PC3, które wyjaśniają dodatnie obciążenia PC3 (rycina 73-74). Obciążenia te związane są głównie z przypisywanym dla tyrozyny i fenyloalaniny pikiem przy 1604 cm^{-1} . Komponent 2, biorąc pod uwagę wykres obciążeń, najprawdopodobniej wyodrębnia próbki dla których w analizowanym zakresie wykazano zakresy widma o jakości słabszej w porównaniu do pozostałych bądź, u których wyraźniej zaznaczony był wpływ zmienności międzyosobniczej. Z uwagi na brak wyraźnego klastrowania się wyników **LEUK-PD** i ich położenie pośród wyników dla **HC** i podgrup **HEMC** nie można potwierdzić skuteczności analizy PCA. Wykresy obciążeń przedstawiono na rycinie 75. Wynik analizy HCA pozostaje w zgodności z wynikiem analizy PCA, dlatego też nie publikuje się dendrogramu.



Rycina 75. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 dla grupy **HC**, **LEUK-PD** i podgrup **HEMC** w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy.

4.3.3. Ocena różnic spektralnych dla widm ramanowskich surowicy pacjentów ALL uwzględniająca grupy ryzyka.

Rycina 76. przedstawia uśrednione widma ramanowskie pacjentów z białaczką z grupy wysokiego ryzyka (**grupa HR** – kolor czarny) oraz spoza grupy wysokiego ryzyka (**grupa non-HR** – kolor czerwony).



Rycina 76. Widma Ramanowskie surowicy pacjentów z białaczką z **grupy HR** (kolor czarny) i **grupy non-HR** (kolor czerwony). Widma przedstawiono dla zakresu 1800-500 cm^{-1} .

W tabeli 19. zawarto wyznaczone pozycję pików wraz z odpowiadającymi im wartościami intensywności. Analizując intensywność widma, położenie pasm i pików zauważalna jest zbliżona intensywność uśrednionego widma dla **grupy HR** i **non-HR** dla całego analizowanego zakresu z wyjątkiem zakresu 1450-1250 cm^{-1} przesunięcia Ramana, dla którego intensywność była wyższa dla **grupy HR**. Dla żadnej z analizowanych zmiennych nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic w intensywności widma i położenia poszczególnych pików (przesunięcia w zakresie

$\pm 1 \text{ cm}^{-1}$) pomiędzy grupą wysokiego ryzyka, a pacjentami spoza grupy wysokiego ryzyka.

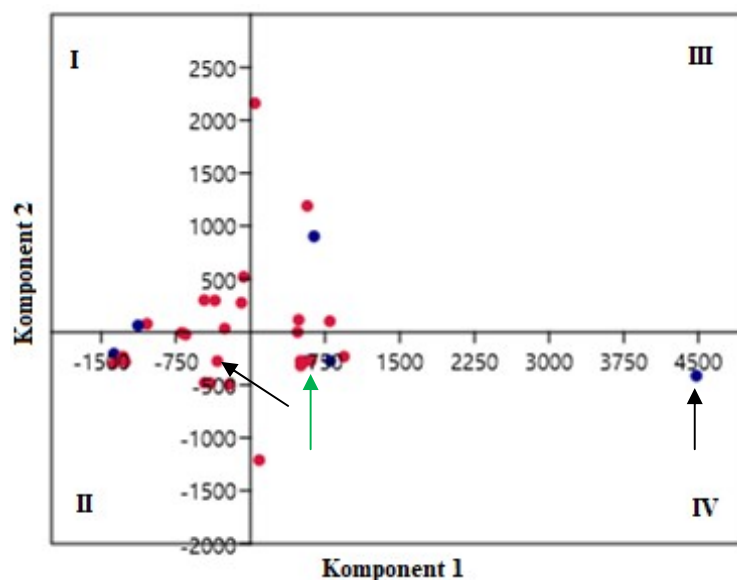
Tabela 19. Pozycja pików wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności wyznaczone dla uśrednionych widm ramanowskich surowicy pacjentów z grupy HR i **non-HR**.

Pozycja maksimum [cm^{-1}]	Grupa HR	Grupa non-HR
	Znormalizowana intensywność widma (a.u.)	
1658	596,29	590,14
1618	251,88	242,14
1606	274,51	248,18
1586	183,61	167,48
1554	157,12	140,16
1524	152,97	170,19
1449	722,17	682,65
1339	495,31	446,53
1319	508,34	462,69
1270	375,40	339,18
1209	275,26	253,12
1175	159,61	145,76
1157	210,22	235,44
1127	208,83	208,91
1105	175,56	176,62
1082	179,21	192,05
1064	152,86	168,10
1032	251,99	255,89
1004	899,00	907,38
958	273,23	266,51
942	307,91	289,75
900	225,26	225,39
879	189,21	211,91
852	305,37	317,34
758	146,87	169,31
744	138,83	149,97
721	111,12	141,17
644	201,64	209,38
622	195,78	189,79

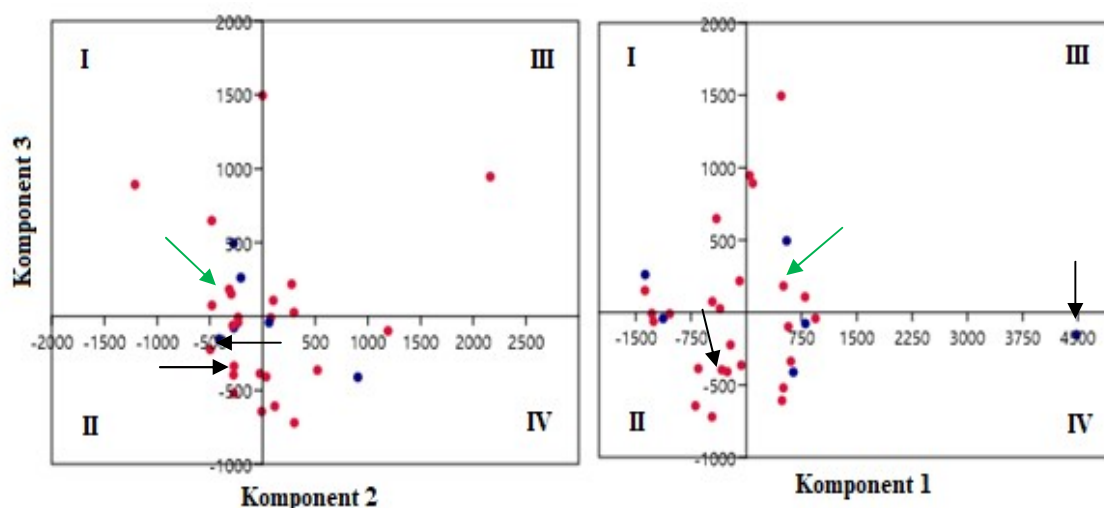
4.3.4. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm ramanowskich surowicy pacjentów z ALL uwzględniające grupę ryzyka

Analizując wykresy wyników i dendrogram HCA nie zauważono klastrowania się wyników dla **grup HR i non-HR** zarówno względem komponentu 1 wyjaśniającego 48,73% wariancji, jak i komponentu 2 (14,42%) oraz komponentu 3 (9,99%). Pomimo zauważalnego rozrzutu wyników dla pacjentów z **grupy HR**, nie było możliwe skorelowanie położenia wyników względem obecności czynników wczesnego wysokiego ryzyka i z poziomem minimalnej choroby resztkowej (rycina 77-78).

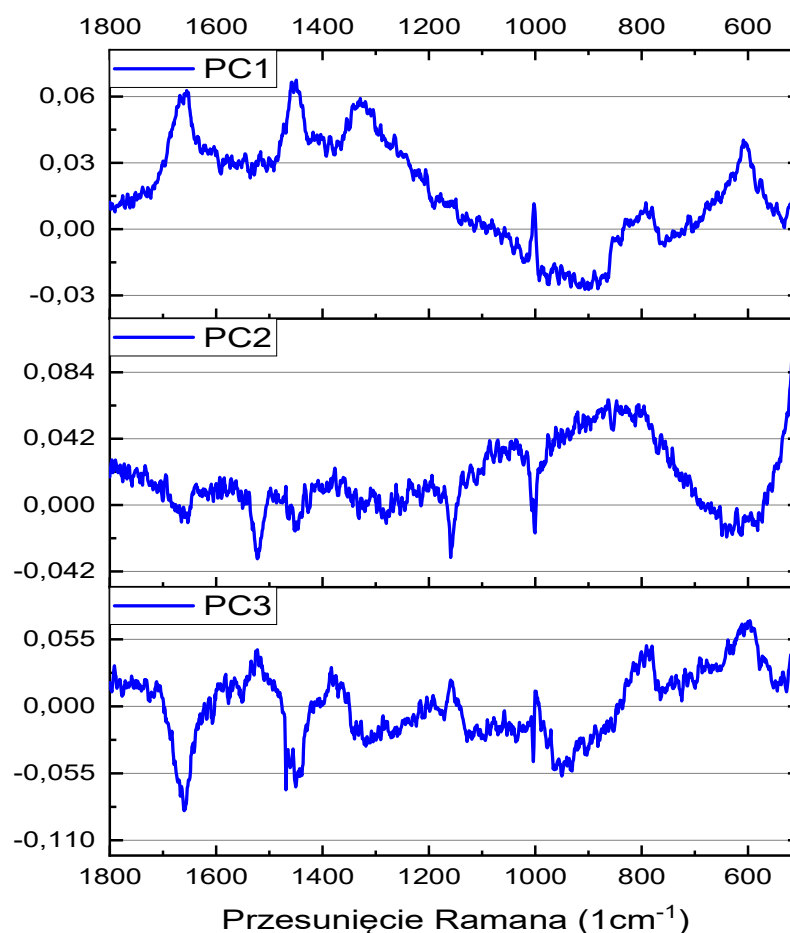
Wyniki dla pacjentów ze wznową oraz wynik pacjenta, u którego wystąpił zgon, znajdowały się one w bliskiej odległości od pozostałych wyników, nie jest możliwe zatem potwierdzenie skuteczności analizy PCA (ryciny 77-78.). Wykres obciążeń przedstawiono na rycinie 79.



Rycina 77. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla **grup HR** (kolor niebieski) i **non-HR** (kolor czerwony) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy. Czarnymi strzałkami wskazano wyniki dla pacjentów, u których obserwowano wznowę. Zieloną strzałką wskazano pacjenta, u którego obserwowano wznowę i odnotowano zgon.



Rycina 78. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 (prawa strona) oraz PC2 i PC3 (lewa strona) dla **grupy HR** (kolor niebieski) i **non-HR** (kolor czerwony) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm RS surowicy. Czarnymi strzałkami wskazano wyniki dla pacjentów, u których obserwowano wznowę, a zieloną strzałką pacjenta, u którego obserwowano wznowę i odnotowano zgon.

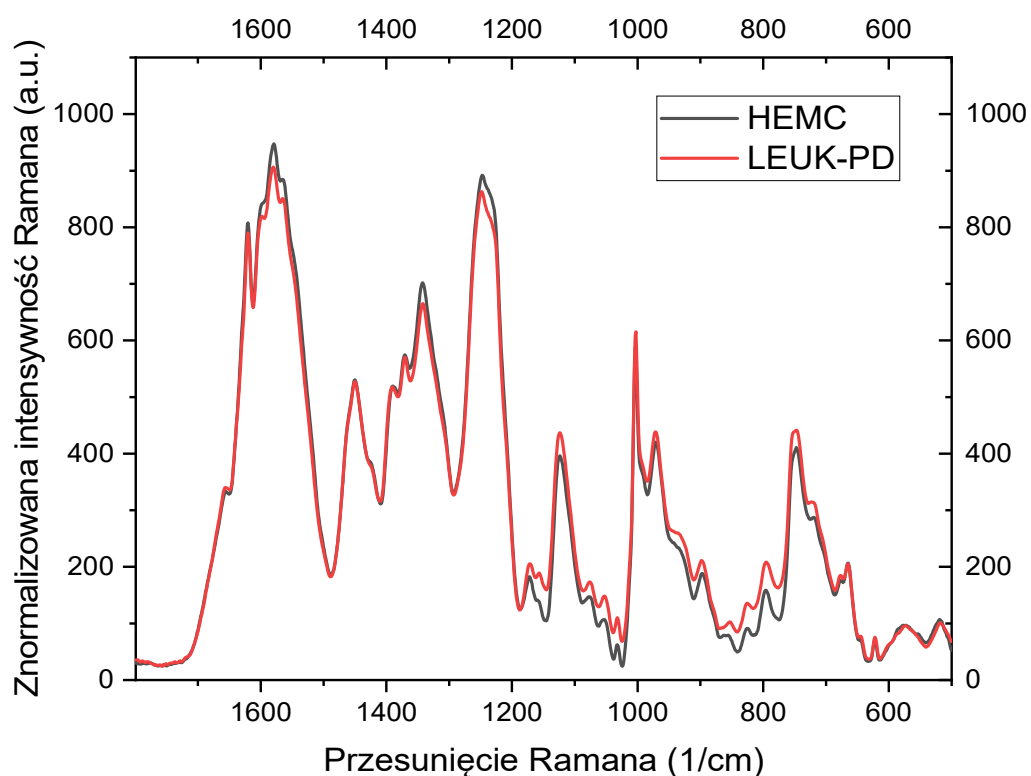


Rycina 79. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 dla **grupy HR** i **non-HR** w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy.

4.4. Spektroskopia Ramana – SZPIK KOSTNY

4.4.1. Wyznaczenie pasm charakterystycznych dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego oraz porównanie wartości znormalizowanej intensywności

Uśredniona widma ramanowskie szpiku kostnego pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (**HEMC** – kolor czarny) i pacjentów z białaczką w momencie rozpoznania (**LEUK-PD** – kolor czerwony) zostały przedstawione na rycinie 80.



Rycina 80. Widmo ramanowskie lizatu komórkowego szpiku kostnego uśrednione dla grupy pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (**HEMC** – kolor czarny) i pacjentów z białaczką w momencie diagnozy (**LEUK-PD** – kolor czerwony). Widmo przedstawiono w zakresie $1800\text{-}500\text{ cm}^{-1}$.

W tabeli poniżej umieszczono pozycję maksimów pików widma RS wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana i przypisem biochemicznym, dokonany na podstawie aktualnej literatury (tabela 20.)

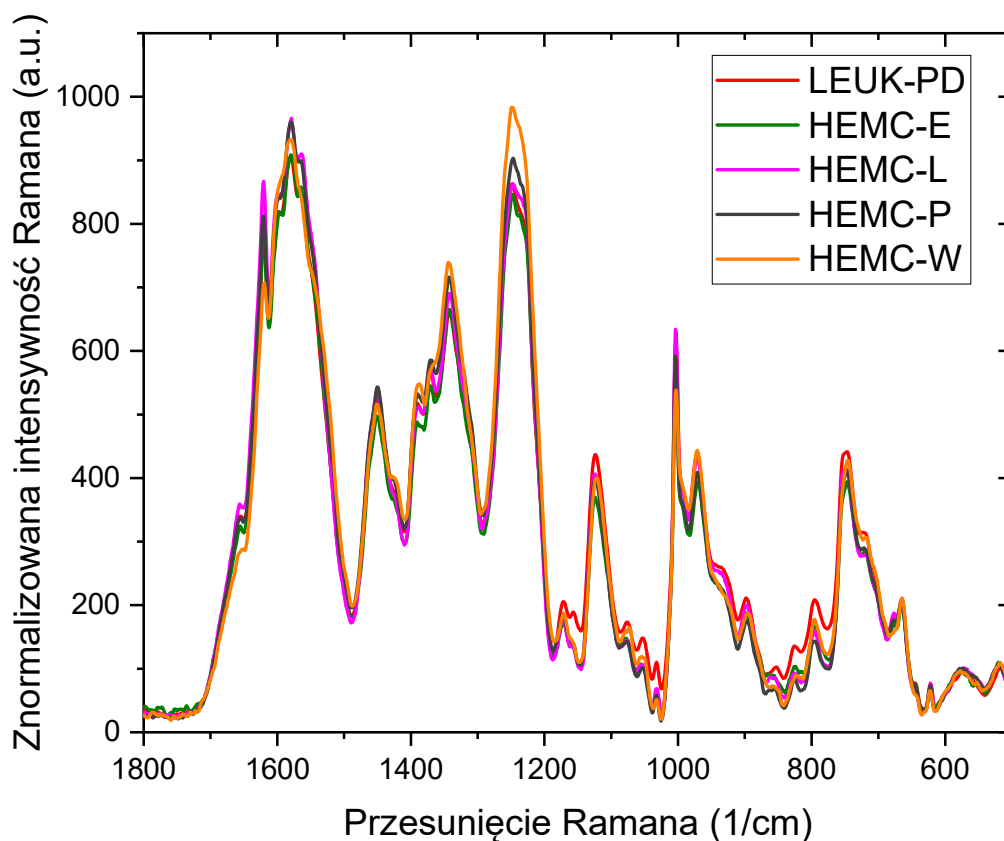
Tabela 20. Pozycje uwidocznionych maksimów dla widm ramanowskich liszt komórkowego szpiku kostnego pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (**HEMC**) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (**LEUK-PD**) wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana.

Szpik kostny HEMC		Szpik kostny LEUK-PD		Przypis biochemiczny
Pozycja max.*	Int. Ram.**	Pozycja max.*	Int. Ram.**	
1657	333,44	1657	339,24	drgania rozciągające grup C=O : amid I, białka, grup C=C: lipidy [93-95]
1620	807,79	1620	790,00	drgania rozciągające grup C-C: tyrozyna grup C=C: tryptofan [94,99]
1598	841,31	1598	819,37	tyrozyna, fenyloalanina [94]
1580	946,19	1580	906,37	fenyloalanina [93]
1564	883,16	1564	850,73	tryptofan (pierścień aromatyczny) drgania rozciągające grup C-N i drgania zginające grup N-H:amid II, białka [93,106]
1450	530,52	1450	527,30	drgania wahadłowe grupy CH ₃ i CH ₂ : lipidy, białka [93-94]
1425	384,97	1425	527,30	drgania zginające grup CH ₂ i CH ₃ : kwasy tłuszczowe, trójglicerydy, lipidy [107]
1371	574,60	1371	570,12	tymina, adenina, guanina: DNA/RNA (pierścień aromatyczny)[100,108]
1342	701,82	1342	665,16	CH ₃ i CH ₂ : kolagen, lipidy drgania deformacyjne CH: białka adenina, guanina, fenyloalanina [95-96,97,100]
1247	891,35	1248	862,60	amid III: białka [93-94,109]
1236	874,82	1236	795,25	amid III: białka [53,94]
1172	182,67	1171	205,57	drgania zginające grup CH – białka tyrozyna, fenyloalanina [53,97,99]
1158	189,33	1159	141,35	drgania rozciągające C-N i C-C: białka, lipidy [93]

1123	396,29	1123	436,86	drgania rozciągające grup C-N: białka [95] grup C-C: lipidy [93]
1076	146,83	1075	173,43	drgania rozciągające grup C-C: fosfolipidy grup PO ₂ ⁻ : DNA [53,93,95,99]
1032	62,19	1032	110,18	drgania deformacyjne (Cβ – methyl) fenyloalanina tryptofan, tyrozyna (pierścień aromatyczny)[94-95]
1002	584,63	1002	615,28	fenyloalanina (pierścień aromatyczny) [53,95-96]
971	419,94	971	437,57	drgania rozciągające C-C: białka [110-111] drgania monoestrów fosforanowych: białka fosforylowane, DNA/RNA [112]
897	188,20	897	211,11	tryptofan, tyrozyna (pierścień aromatyczny) drgania rozciągające C-C: glutation [95-96,99]
855	79,23	853	102,58	drgania rozciągające grup C-C: prolina, tyrozyna [93-94]
825	91,17	825	102,58	drgania asymetryczne rozciągające grup PO ₂ ⁻ : kwasy nukleinowe tyrozyna [53,94,97,99-100]
795	158,87	795	208,25	uracyl/tymina/cytozyna (pierścień aromatyczny) drgania szkieletowe PO ₂ ⁻ : kwasy nukleinowe DNA/RNA [97]
758	386,48	758	395,85	tryptofan [93,113]
747	441,44	747	410,80	tymina (pierścień aromatyczny): DNA [93,100]
719	287,09	720	313,80	drgania symetryczne rozciągające C-C-N drgania kołyszące CH ₂ : fosfolipidy, fosfatydylocholina, sfingomielina [93]
645	70,04	645	77,60	drgania rozciągające/skręcające: tyrozyna [93,95,99]
622	70,84	622	75,50	drgania skręcające (C-C): fenyloalanina [95]

*Pozycja max. - pozycja maksimum [cm⁻¹]; **Int. Ram. – znormalizowana intensywność Ramana (a.u.)

Uśrednione widma ramanowskie lizatu komórkowego szpiku kostnego dla podgrup pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi **HEMC** i pacjentów z białaczką w momencie rozpoznania (**LEUK-PD** – kolor czerwony) zostały przedstawione na rycinie 81. W tabeli 21. umieszczono pozycję pików oraz odpowiadające im wartości znormalizowanej intensywności Ramana.

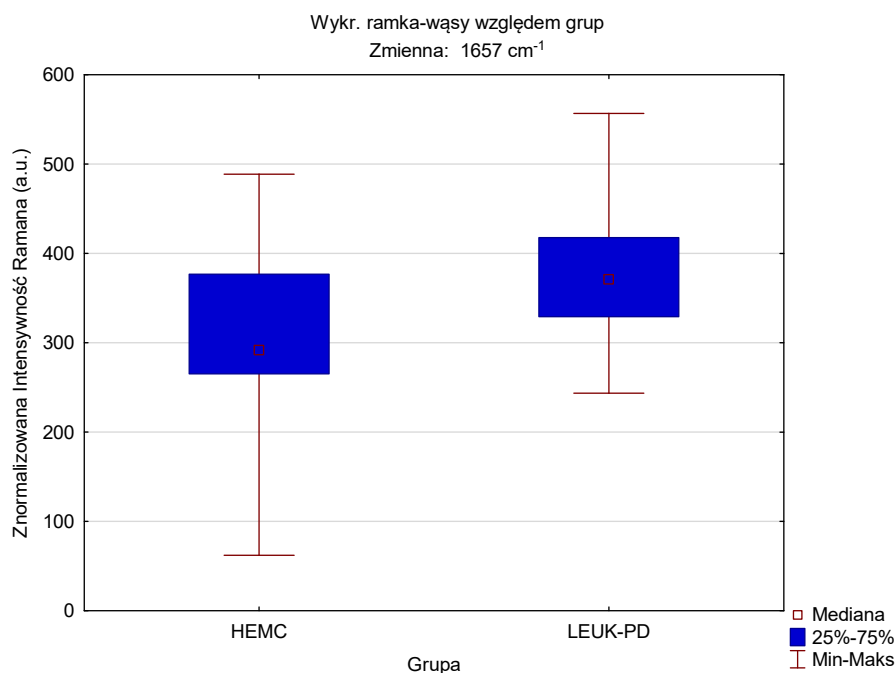


Rycina 81. Widmo ramanowskie lizatu komórkowego szpiku kostnego uśrednione dla grupy pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (**HEMC-E** – kolor zielony, **HEMC-P** – kolor szary, **HEMC-L** – kolor różowy, **HEMC-W** – kolor pomarańczowy) oraz **HC** (kolor niebieski) i **LEUK-PD** (kolor czerwony). Widmo przedstawiono w zakresie 1800-500 cm^{-1} .

Tabela 21. Pozycje uwidocznionych maksimów dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (**HEMC**) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (**LEUK-PD**) wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana.

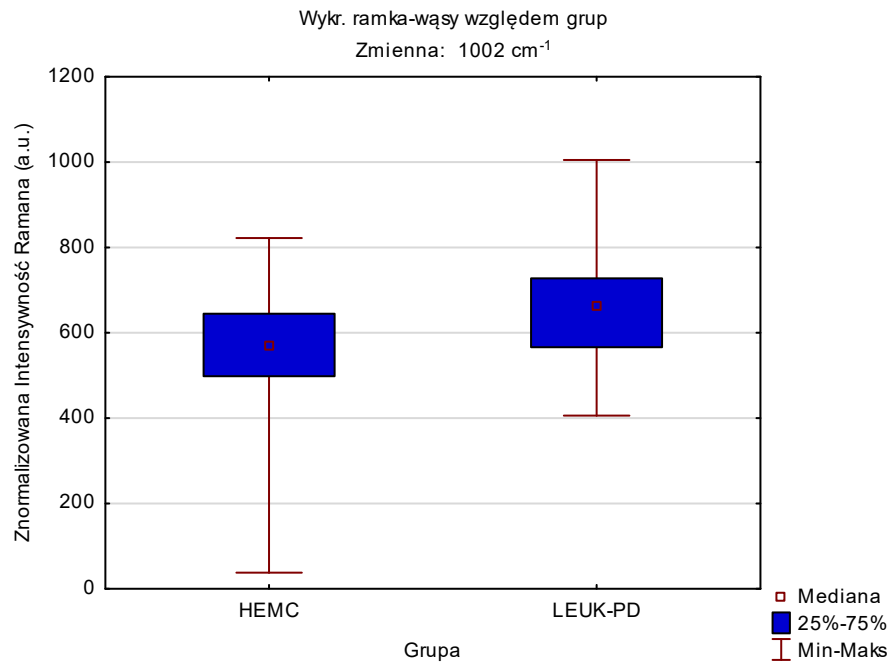
Pozycja maksimum [cm ⁻¹]	Znormalizowana Intensywność Ramana [a.u.]				
	HEMC-L	HEMC-W	HEMC-E	HEMC-P	LEUK-PD
1657	359,16	278,99	293,24	334,94	339,24
1620	867,01	703,50	735,04	809,23	790,00
1598	844,92	792,88	810,63	788,98	819,37
1580	966,09	924,26	887,61	924,78	906,37
1564	910,22	928,7106	927,0448	957,7546	850,73
1450	541,58	514,6582	502,2194	535,9490	527,30
1425	373,85	398,0727	380,9474	405,1129	527,30
1371	580,36	569,0201	574,9289	592,4955	570,12
1342	690,66	737,1978	709,1995	701,3820	665,16
1248-1247	864,61	975,4046	917,8724	906,3152	862,60
1236	845,56	950,83	877,27	868,83	795,25
1172	180,26	179,7527	179,0095	187,5823	205,57
1159-1156	134,66	144,8976	152,7898	146,3529	141,35
1123-1121	406,27	392,9338	381,8962	402,0170	436,86
1076-1075	144,52	160,4124	157,6192	143,2836	173,43
1032	67,75	52,0010	59,8532	59,2742	110,18
1002	634,03	450,0084	544,1442	593,9223	615,28
971	433,18	442,4222	415,9432	410,1734	437,57
897	199,06	182,8192	187,3308	173,5650	211,11
855-853	85,60	73,9672	84,9122	70,0861	102,58
825	92,96	90,3866	104,9771	85,6402	102,58
795	159,50	178,3018	178,1758	146,8106	208,25
758	330,30	376,64	372,23	383,71	395,85
747	410,13	428,6388	419,1191	410,9436	410,80
720-719	278,16	305,6812	306,6762	284,3634	313,80
646-644	71,16	57,2424	74,3253	90,5157	77,60
622	77,65	66,9585	62,6131	74,0841	75,50

Analizowano wykazywanie pasm absorpcji i wartość absorpcji w zakresie daktyloskopowym tj. w zakresie przesunięcia Ramana od 1800 do 600 cm⁻¹. Uwidoczniono szereg pików związanych z białkami, lipidami i kwasami nukleinowymi. Pik przypisywany dla drgań rozciągających grup C=O (amid I, białka) i C=C (lipidy) obecny był przy 1657 cm⁻¹ przesunięcia Ramana. Wartość intensywności Ramana dla tego pików różniła się istotnie dla grup **LEUK-PD** i **HEMC** (p=0,009841) (rycina 82.)

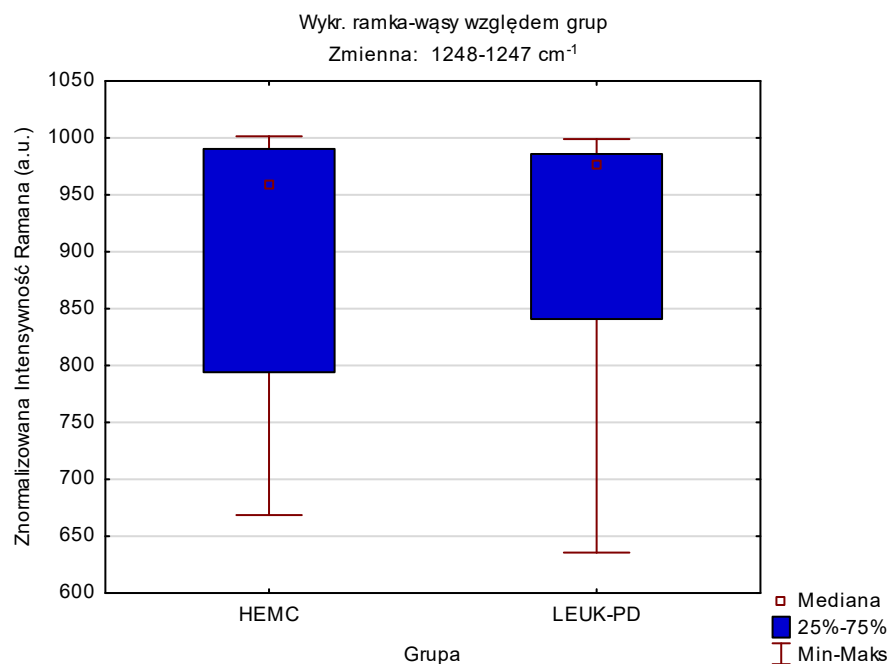


Rycina 82. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1657 cm⁻¹. Różnica istotna statystycznie (UMW - p=0,009841).

Przypisywany dla drgań rozciągających C-N i zginających N-H amidu II (białka) oraz tryptofanu pik obecny był przy 1564 cm⁻¹. Inne powiązane z tryptofanem pik obserwowano przy 1620 cm⁻¹, 1032 cm⁻¹, 1032 cm⁻¹ i 897 cm⁻¹. Liczne piki obserwowane w widmie przypisano dla tyrozyny (1620 cm⁻¹, 1598 cm⁻¹, 1172-1171 cm⁻¹, 1032 cm⁻¹, 897 cm⁻¹, 855-853 cm⁻¹, 825 cm⁻¹ czy 645 cm⁻¹), fenyloalaniny (1598 cm⁻¹, 1580 cm⁻¹, 1247 cm⁻¹, 1172-1171 cm⁻¹, 1076 cm⁻¹, 1032 cm⁻¹, 1002 cm⁻¹ i 622 cm⁻¹), a także dla proliny (855-853 cm⁻¹). Analizując wartość intensywności Ramana dla wymienionych pików istotną statystycznie różnicę dla **HEMC** i **LEUK-PD** stwierdzono dla pików przy 1002 cm⁻¹ (fenyloalanina, p=0,033883)(rycina 83.), a także dla pików przy pozycji 1248-1247 cm⁻¹ charakterystycznego dla amidu III białek (p=0,033208)(rycina 84.).

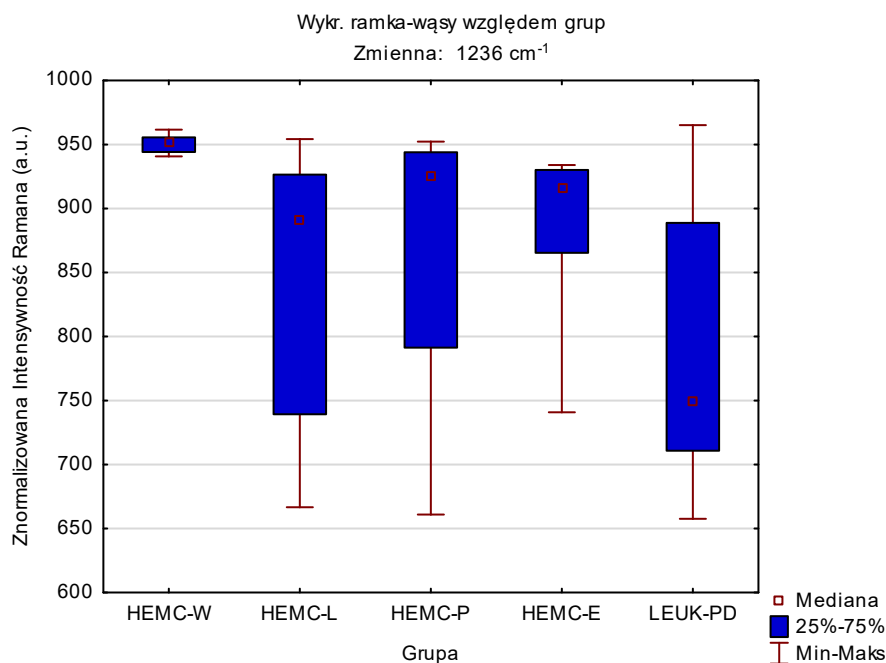


Rycina 83. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1002 cm⁻¹. Różnica istotna statystycznie (UMW - p=0,033883).



Rycina 84. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piksu z maksimum przy pozycji 1248-1247 cm⁻¹. Różnica istotna statystycznie (UMW - p=0,033208).

Dla drgań grup CH_2 i CH_3 obecnych w białkach i lipidach zarejestrowano piki przy pozycji 1450 cm^{-1} i 1425 cm^{-1} , a dla drgań grup C-N i C-C przy $1159\text{--}1158\text{ cm}^{-1}$ i 1123 cm^{-1} . Pik przy $720\text{--}719\text{ cm}^{-1}$ przypisywany jest dla drgań kołyszących grup CH_2 i symetrycznych drgań rozciągających grup C-C-N fosfolipidów, fosfatydylocholiny i sfingomieliny. Powiązane z kwasami nukleinowymi piki pojawiły się przy przesunięciu Ramana: 1371 cm^{-1} , 1342 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} , 971 cm^{-1} , 897 cm^{-1} , 795 cm^{-1} i 747 cm^{-1} . Piki te przypisane są drganiom zasad nukleotydowych i związkom budującym szkielet cukrowo-fosforanowy DNA i RNA. Gdy w analizie uwzględniono podgrupy **HEMC**, jedyną istotną statystycznie różnicę odnotowano dla charakterystycznego dla amidu III piku z maksimum przy 1236 cm^{-1} przesunięcia Ramana - wartość intensywności Ramana była istotnie różna dla grup **HEMC-W** i **LEUK-PD** ($p=0,015237$, rycina 85.).



Rycina 85. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piku z maksimum przy pozycji 1236 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0261$).

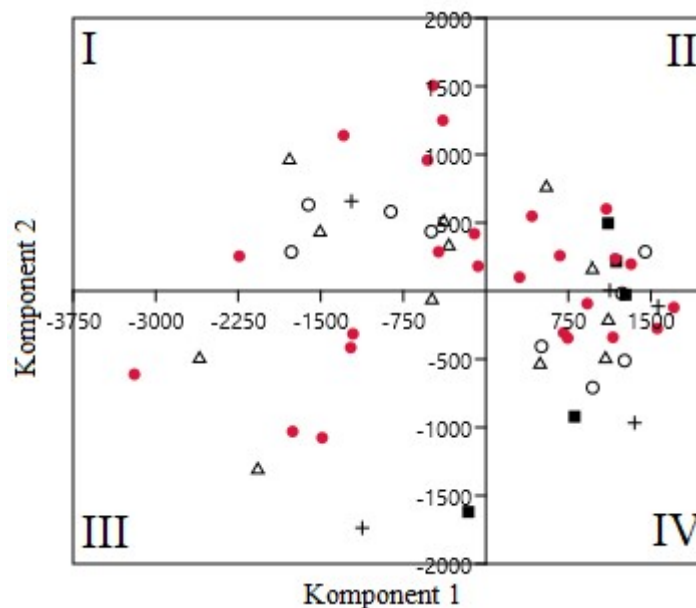
Na podstawie krzywy ROC wyznaczono czułość i specyficzność dla wszystkich zmiennych, dla których stwierdzono istotną statystycznie różnicę w wartości intensywności widma. Dane zawarto w tabeli poniżej (tabela 22.). Znakiem * oznaczono piki dla których czułość i specyficzność osiągnęła wartość co najmniej 80%.

Tabela 22. Wartości czułości i specyficzności wraz z punktem odcięcia dla zmiennych, dla których zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości intensywności widma ramanowskiego lizatu komórkowego szpiku kostnego.

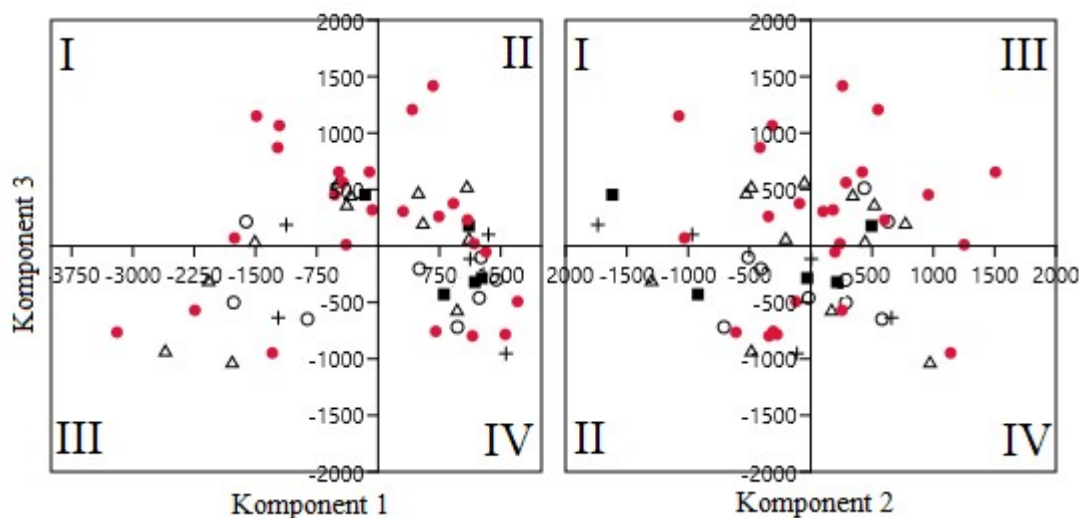
Pik [cm ⁻¹]	Grupa	Specyficzność [%]	Czułość [%]	Punkt odcięcia [a.u.]	AUC
1657	HEMC vs. LEUK-PD	62,5	76,92	312,254	0,70252
1003-1002	HEMC vs. LEUK-PD	78,13	60	646,1105	0,66198
1248-1247	HEMC vs. LEUK-PD	59,38	52,38	972,817	0,47024
1236	HEMC-W vs. LEUK-PD	80*	90*	943,13	0,88

4.4.2. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego

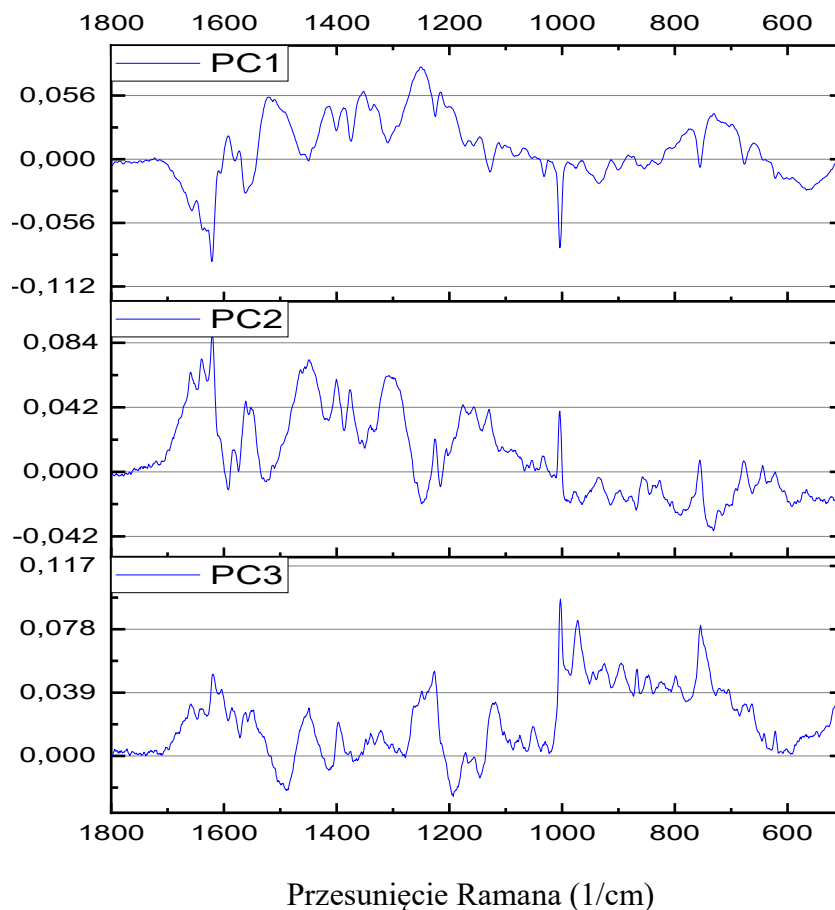
Analiza HCA i PCA nie wykazała klastrowania się wyników dla pacjentów z ALL względem PC1, PC2 i PC3. Analizując wykres wyników przedstawiony na rycinie 86 względem PC1 (52,59% wariancji danych wyjściowych) uwzględniając rozpoznane zaburzenie hematologiczne, podobnie jak dla analiz surowicy, zauważyć można tendencje do grupowania się wyników dla próbek pacjentów z pancytopenią w II i IV kwadracie (z wyjątkiem jednej) odpowiadającym dodatnim wartościom PC1, które tłumaczą ujemne wynikami obciążeń. Przypisuje się im drgania rozciągające grup C-C tyrozyny i grup C=C tryptofanu (1620 cm⁻¹), drgania pierścienia aromatycznego tryptofanu, drgania rozciągające grup C-N i zginające N-H amidu II (1561 cm⁻¹), a także fenyloalaniny (1004 cm⁻¹). Rozpatrując rozkład wyników pod względem PC2 (15,20%) i PC3 (11,90%) zauważalne jest rozproszenie wyników, przez co należy założyć iż nie wnoszą one istotnych informacji (rycina 87.). Wykresy obciążeń przedstawiono na rycinie 88.



Rycina 86. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grupy **HC** (kolor niebieski), **LEUK-PD** (kolor czerwony) oraz podgrup **HEMC** (kolor czarny) w zakresie $1800-500\text{ cm}^{-1}$ widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).



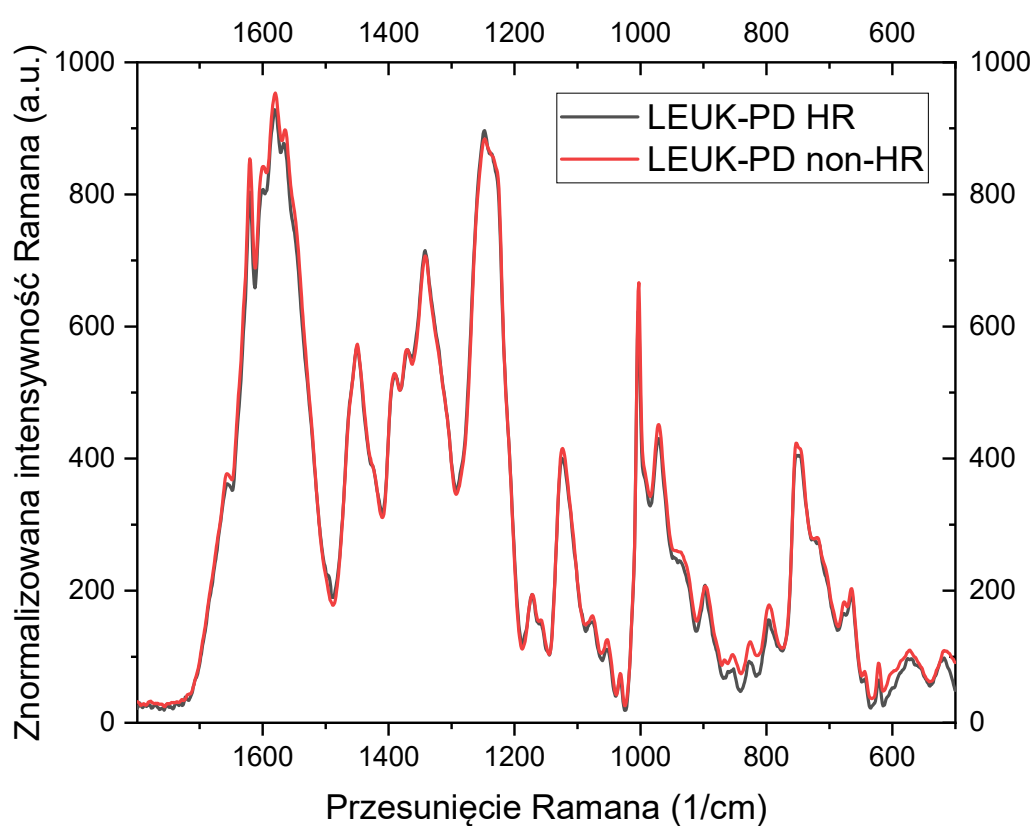
Rycina 87. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 (prawa strona) oraz PC1 i PC3 (lewa strona) dla grupy **HC** (kolor niebieski), **LEUK-PD** (kolor czerwony) oraz podgrup **HEMC** (kolor czarny) w zakresie $1800-500\text{ cm}^{-1}$ widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup **HEMC** kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).



Rycina 88. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 dla grupy **HC**, **LEUK-PD** i podgrup **HEMC** w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego.

4.4.3. Ocena różnic spektralnych dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniająca grupy ryzyka

Uśrednione widma pacjentów z grupy wysokiego ryzyka oraz z grupy spoza wysokiego ryzyka przedstawiono na rycinie 89. Tabela 23. zawiera pozycję wyznaczonych pików wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana.



Rycina 89. Uśrednione widma ramanowskie dla pacjentów z grupy wysokiego ryzyka (**LEUK-PD HR** - kolor czarny) i pacjentów z poza grupy wysokiego ryzyka (**LEUK-PD non-HR** - kolor czerwony) w zakresie 1800-500 cm^{-1} przesunięcia Ramana.

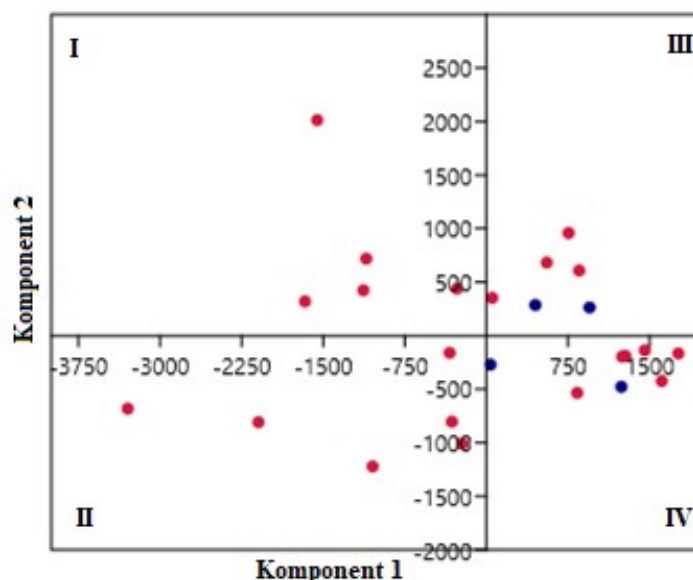
Tabela 23. Pozycja pików wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana dla uśrednionych widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego **grup HR i non-HR**.

Przesunięcie Ramana (cm ⁻¹)	Grupa HR	Grupa non- HR
	Znormalizowana Intensywność Ramana (a.u.)	
1657	367,36	378,44
1620	806,84	845,17
1598	963,45	940,80
1580	875,92	947,21
1450	554,22	557,68
1425	378,68	396,59
1371	572,75	576,45
1342	746,54	712,69
1248	908,58	900,75
1236	707,87	817,10
1177	188,52	200,43
1159	149,96	163,88
1123	414,08	413,01
1075	153,09	159,95
1032	78,21	74,14
1002	668,66	644,82
971	430,31	451,47
942	301,21	255,09
897	233,58	195,12
853	128,36	92,98
825	130,18	109,81
795	179,55	168,88
758	425,44	384,77
747	458,93	424,98
720	272,42	269,04
645	75,25	81,46
622	88,14	85,83

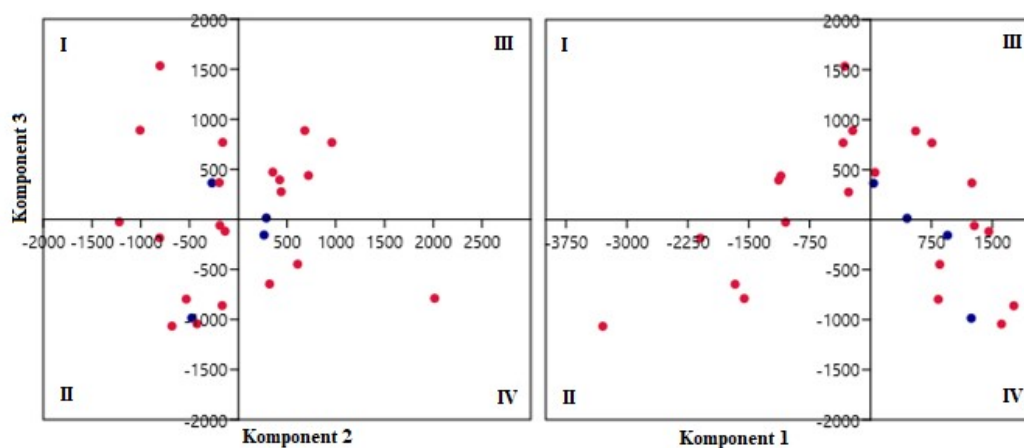
Nie obserwowano wyraźnych różnic w intensywności widma ramanowskiego i położenia pików porównując uśrednione widma **grupy HR i grupy non-HR**. Dla **grupy HR** zaobserwowano mniejszą intensywność widma w zakresie około 1630-1520 cm⁻¹, 960-750 cm⁻¹ i 630-600 cm⁻¹, ale różnice w intensywności nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej gdy przeanalizowano wyniki dla pacjentów w grupach.

4.4.4. Wielowymiarowe analizy chemometryczne PCA i HCA dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z ALL uwzględniające grupę ryzyka

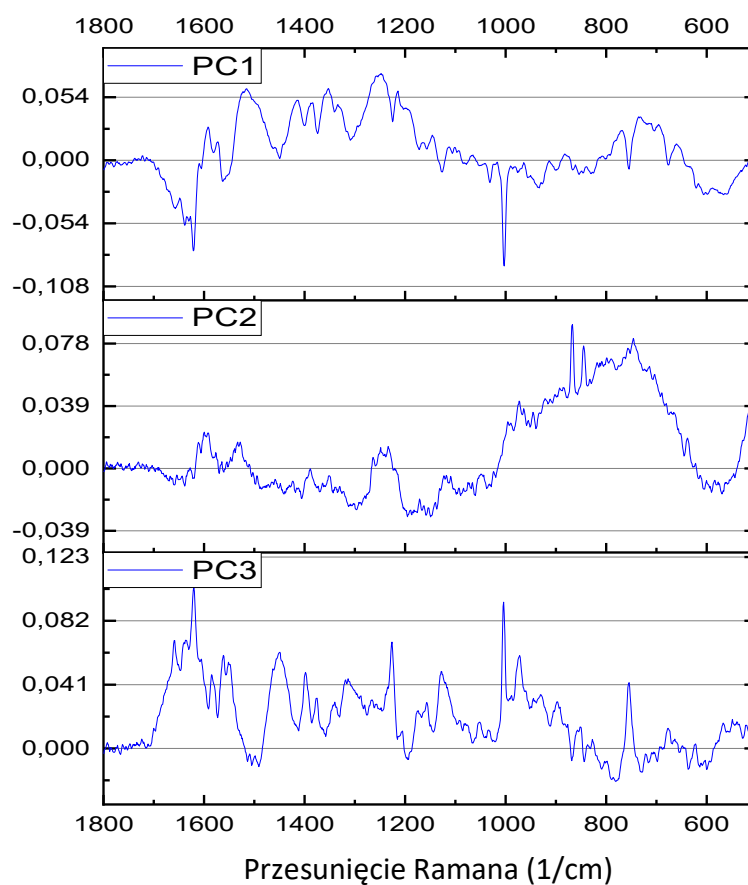
Pod względem komponentu pierwszego wyjaśniającego 51,35% wariancji wyjściowych danych spektralnych zaobserwowano, iż wszystkie wyniki dla **grupy HR** pojawiały się III kwadracie, ale rozproszone są one wśród wyników dla grupy **non-HR** przez co nie można potwierdzić skuteczności metody PCA (rycina 90.). Podobne wnioski uzyskano gdy wyniki były analizowane z uwzględnieniem PC2 wyjaśniającej 15,67 % wariancji oraz PC3 wyjaśniającej 15,16% wariancji danych wyjściowych (rycina 91.). Rozproszenie wyników nie powiązano także z wykazywaniem czynników wczesnego wysokiego ryzyka i poziomem MRD (rycina 90.). Z uwagi na nie dysponowanie próbkami lizatu komórkowego dla pacjentów ze wznową oraz pacjenta, u którego odnotowano zgon, nie było możliwe przeprowadzenie analizy względem wymienionych danych klinicznych. Wykresy obciążeń przedstawiono na rycinie 92.



Rycina 90. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla **grupy HR** (kolor niebieski) i **non-HR** (kolor czerwony) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego.



Rycina 91. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 (prawa strona) oraz PC2 i PC3 (lewa strona) dla **grupy HR** (kolor niebieski) i **non-HR** (kolor czerwony) w zakresie $1800-500\text{ cm}^{-1}$ widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego.



Rycina 92. Wykresy obciążenia analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 dla **grupy HR** i **non-HR** w zakresie $1800-500\text{ cm}^{-1}$ widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego.

V. Dyskusja

Obserwowany na przestrzeni ostatnich lat znaczny postęp w leczeniu chorób nowotworowych i poprawa przeżywalności niewątpliwie nie byłyby możliwe bez rozwoju nowoczesnych technik detekcji zmian nowotworowych, wnikliwej analizy molekularnego podłoża ich rozwoju i progresji czy nabywania oporności na leki stosowane w leczeniu. Dostępne do niedawna jako jedyne techniki mikroskopowe pozwalały jedynie na ocenę morfologii komórki lub tkanki nowotworowej i wymagały od badającego szerokiej wiedzy i doświadczenia. Rozwój cytogenetyki i biologii molekularnej był kluczowy dla indywidualizacji leczenia opartej o ocenę profilu molekularnego pacjenta. Dzięki wieloośrodkowym badaniom leczenie to jest stale modyfikowane i indywidualizowane, biorąc pod uwagę nowo stwierdzane korzystne i niekorzystne czynniki rokownicze, a także alternatywne opcje terapeutyczne tj. celowane leczenie molekularne czy immunoterapię, stanowiące coraz częściej wsparcie dla konwencjonalnej chemioterapii. Główne wyzwanie w leczeniu chorób nowotworowych, obok wykrywania zmian na ich wczesnych etapach zaawansowania, stanowi odpowiedni dobór leczenia, uwzględniający ryzyko wznowy, związanej z nabywaniem przez komórki nowotworowe oporności na chemioterapeutyki, a jednocześnie minimalizujący długoterminowe skutki uboczne stosowania terapii o nieselektywnym oddziaływaniu na komórki organizmu oraz radioterapii, negatywnie wpływających na jakość życia po leczeniu. Do najpoważniejszych obserwowanych u osób, które w dzieciństwie przeszły leczenie przeciwnowotworowe należą: powikłania kardiologiczne, endokrynologiczne, predyspozycja do występowania chorób przewlekłych, nowotworów wtórnych, bezpłodność czy zaburzenia neurokognitywne i behawioralne [114-115].

W przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej, najczęstszego typu białaczki i nowotworu diagnozowanego wśród dzieci, szczególny problem stanowi leczenie odpornej lub nawrotowej postaci choroby. Od lat 80. ubiegłego obserwuje się znaczną poprawę wartości 5-letniego wskaźnika przeżywalności (ang. overall survival, OS) dla dzieci z ALL, który obecnie szacowany jest na 85-90% dla krajów rozwiniętych, podczas gdy w latach 60. ubiegłego wieku wynosił zaledwie 10%. Nawrót choroby nowotworowej, który dotyczy nawet 20% pacjentów, charakteryzują niższe wskaźniki przeżyć pięcioletnich. Według pracy opublikowanej w 2024 roku przez Children's Oncology Group, wśród pacjentów którzy doświadczyli pierwszej wznowy średnia

wartość OS dla całej grupy to $48,9\% \pm 1,2\%$, $52,5 \pm 1,3\%$ dla pacjentów z B-ALL, $35,5 \pm 3,3\%$ dla pacjentów z T-ALL, a najniższą stwierdza się wśród niemowląt - $21,5 \pm 3,9\%$. Spektakularny postęp, jaki się dokonał w leczeniu ALL w dużej mierze jest wynikiem: lepszego zrozumienia biologii i genetyki ALL, stratyfikacji do grup terapeutycznych i indywidualizacji terapii, wprowadzenia immunoterapii (transplantacje komórek macierzystych szpiku kostnego, przeciwciała, limfocyty CAR-T), leków ukierunkowanych molekularnie, np. inhibitory kinaz tyrozynowych, leki demetylujące itp. oraz udoskonalenie terapii wspomagających [46]. Spektroskopia wibracyjna jako tania i szybka metoda diagnostyczna, która dostarcza kompleksowej informacji o budowie fizykochemicznej badanej próbki, może być potencjalnie atrakcyjnym narzędziem do badań przesiewowych w przypadku podejrzenia ALL, o ile uda się wykazać istotne różnice widm komórek nowotworowych w stosunku do prawidłowych komórek szpiku kostnego lub widm uzyskanych z surowicy. Mogłaby ona zostać wykorzystana jako metoda pomocnicza do diagnostyki wstępnej ALL i ułatwić decyzję wykonywania inwazyjnej procedury biopsji szpiku kostnego w przypadkach niejednoznacznych. Ponadto w przypadku uzyskania różnic w widmach pacjentów w zależności od uzyskanej odpowiedzi na leczenie indukcyjne, metoda ta mogłaby także potencjalnie zostać wykorzystana do stratyfikacji pacjentów pod względem rokowania.

Jak wcześniej przedstawiono spektroskopia w podczerwieni oraz spektroskopia Ramana to dwie komplementarne techniki spektroskopii wibracyjnej, dostarczające informacji o składzie i strukturze biochemicznej analizowanych materiałów. Analizie poddane mogą zostać zarówno pojedyncze komórki, tkanki jak i płyny ustrojowe tj. ślina, mocz, wydzieliny z dróg rodnych, popłuczyny oskrzelowe, co stanowi ważną przewagę tych technik obok szybkiego czasu pomiaru, niewielkiej objętości próbki i nieskomplikowanej preparatyki koniecznej do jej przeprowadzenia, nad technikami rutynowo stosowanymi w diagnostyce medycznej. Do ograniczeń, ważnych z punktu pracy z materiałem biologicznym, należy zaliczyć interferencję wody, stanowiącej główny składnik układów biologicznych, jak i utrwalaczy rutynowo stosowanych w histopatologii, zwłaszcza parafiny, wykazujących silną absorpcję w regionach widm, kluczowych dla różnicowania komórek prawidłowych i zmienionych nowotworowo. Krioprezerwacja, która mogłaby stanowić alternatywę dla parafiny, jest techniką rzadziej stosowaną, najczęściej w badaniu śródoperacyjnym, gdy wymagane jest szybkie podjęcie

kluczowej klinicznie decyzji. Potwierdzają to badania Wills i współautorów, którzy wykorzystując RS do zbadania tkanek neuroblastoma, ganglioneuroma, guza osłonek nerwów, pheochromocytoma i tkanki prawidłowej nadnercza, uzyskali zbieżne wyniki dla tkanek świeżych i kriobankowanych, uzyskując 100% czułość i specyficzność rozróżnienia z tkankami prawidłowymi nadnercza [118].

Pomimo, iż znaczna część doniesień dotyczy nowotworów występujących najczęściej w wieku dorosłym bądź u osób starszych, tj. rak piersi [119-123], jajnika [124-126], prostaty [70,72], jelita grubego [127-129], szyjki macicy [130-132], coraz częściej pojawiają się prace obejmujące tematyką nowotwory wieku dziecięcego. Polis i współautorzy wykorzystując spektroskopię Ramana przeanalizowali skład biochemiczny tkanek medulloblastoma, wykazując dla nich zwiększoną zawartość białek i zredukowaną lipidów, w porównaniu do tkanki zdrowej, bogatej zarówno w białka jak i lipidy [105], podczas gdy Łach i współ. zbadali tkanki medulloblastoma wykorzystując spektroskopię FT-IR [133]. Lieber i współ. porównali tkanki guza Wilmsa i prawidłowe tkanki nerki rozróżniając je z 93% czułością i 100% specyficznością [134]. W innych badaniach, Chiang i współ. analizując linie komórkowe mięsaka kościopochodnego (osteosarcoma) wykorzystali RS do szybkiego i dokładnego wskazania stopnia zaawansowania, Li i współ. scharakteryzowali zmiany komórek linii komórkowych osteosarcoma na poziomie subkomórkowym, a Serdiuk i współ. wykorzystali spektroskopię FT-IR do detekcji zmian w komórkach linii osteosarcoma w odpowiedzi na leczenie [135-137]. Kast i współ. stworzyli model, który w 87,9% prawidłowo klasyfikował różne typy nowotworów drobnookrągłoniebieskokomórkowych (ang. small round blue cell tumors) [138]. Chaber i współ. wykorzystali widma ATR FT-IR dla wskazania markerów diagnostycznych i prognostycznych dla mięsaka Ewinga, a także dla rozróżnienia mięsaka Ewinga i stanu zapalnego kości i szpiku [139-142].

Podstawą rozpoznania ALL jest badanie szpiku kostnego pobranego na drodze biopsji aspiracyjnej, która jest procedurą inwazyjną, niosącą za sobą ryzyko powikłań, z uwagi na konieczność jej przeprowadzenia u dzieci w stanie głębokiej sedacji lub znieczulenia ogólnego. Częstość występowania tego nowotworu oraz ograniczona dostępność materiału do badań znacząco utrudniają prowadzenie analiz mających na celu opracowanie nowych metod diagnostycznych i prognostycznych dla ALL u dzieci. W dostępnej literaturze są to, poza wstępnymi wynikami własnego zespołu które zostały wcześniej opublikowane, pierwsze doniesienie dotyczące możliwości wykorzystania

spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii Ramana w różnicowaniu pacjentów z ALL od pacjentów z innymi zaburzeniami hematologicznymi nienowotworowymi i pacjentów zdrowych, które obejmuje zakresem dużą homogeną grupę dzieci i młodzieży z ALL (48 pacjentów), dla których analizowano jednocześnie surowicę i szpik kostny [143].

Widma FT-IR i widma RS zarejestrowano dla surowicy grupy kontrolnej 15 pacjentów zdrowych oraz surowicy i lizatu komórkowego szpiku komórkowego 43 pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi takimi jak: anemia, małopłytkowość, leukopenia i pancytopenia oraz grupy 48 pacjentów z ALL.

Widma FT-IR surowicy – markery diagnostyczne

Analizując pełny zakres widma FT-IR surowicy największą uwagę zwraca wyższa absorpcja dla uśrednionego widma grupy pacjentów zdrowych oraz pacjentów z anemią w porównaniu do pozostałych grup. W regionie $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, w którym obserwowano piki charakterystyczne dla drgań grup funkcyjnych amidu A, cząsteczek wody, a także grup CH_3 i CH_2 lipidów, a najniższe wartości absorpcji obserwowano dla uśrednionego widma pacjentów z pancytopenią. Dla omawianego zakresu nie stwierdzono istotnych przesunięć w kierunku wyższych lub niższych liczb falowych. Gdy porównano wartości absorpcji dla istotne statystycznie różnice dla pacjentów zdrowych i pacjentów z białaczką obserwowano w tym regionie dla pików pojawiających się przy $2955\text{--}2954\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,001943$), $2927\text{--}2925\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,029334$), 2870 cm^{-1} ($p=0,000906$) i $2855\text{--}2854\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,013875$) charakterystycznych dla asymetrycznych i symetrycznych drgań grup CH_3 i CH_2 . Podobne wyniki uzyskano dla innego powiązanego z lipidami piku obserwowanego przy $1451\text{--}1449\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,001241$), któremu przypisuje się drgania zginające grup CH_3 i CH_2 , a także dla powiązanego z drganiami rozciągającymi C=O grup COO^- kwasów tłuszczowych i białek piku przy $1396\text{--}1392\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,002332$). Zbieżne wyniki uzyskali Sheng. i współautorzy, w których to badaniu za najistotniejszy dla rozróżnienia pacjentów zdrowych od pacjentów z białaczką na podstawie widm surowicy uznano stosunek wysokości pików z maksimum przy 2959 cm^{-1} i 2931 cm^{-1} (H2959/H2931). W badaniu tym jednak u jedynie 4 spośród 30 pacjentów z białaczką

zdiagnozowano ALL, w pozostałych przypadkach była to ostra białaczka szpikowa - AML (22 pacjentów), i przewlekła białaczka szpikowa – (ang. chronic lymphocytic leukemia, CLL - 4 pacjentów), które stanowią odrębną jednostkę chorobową [144]. Do grupy kontrolnej w badaniu Sheng i współ. włączono 19 pacjentów. W innym badaniu, Ramesh i współautorzy, nie wykazali istotnych dla monitorowania leczenia ALL zmian w widmie FTIR-MSP, a analiza skupień dla zakresu $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ tylko dla jednego z trzech przypadków wykazała dobrą klasyfikację pacjentów, grupując pacjentów, u których nie wykrywano blastów w jednym klastrze [145].

Zaburzenia metabolizmu lipidów są jednymi z najczęściej obserwowanych u pacjentów z chorobą onkologiczną. Mogensen i współautorzy zbadali występowanie zaburzenia lipidowe u pacjentów z ALL w czasie diagnozy, obserwując u 99% pacjentów różnego typu dyslipidemie, najczęściej związane z obniżonym poziomem HDL (98%) umiarkowaną hipertróglicerydemią (61%), umiarkowaną hipercholesterolemią (5%) i hipocholesterolemią (14%), a także obniżonym poziomem LDL (13%) lub podwyższonym poziomem LDL (1%) [146]. Należy jednak zauważyć, iż piki, dla których zaobserwowano istotne statystycznie różnice, przypisywane są głównie dla fosfolipidów, a tylko w niewielki stopniu dla cholesterolu i białek. Do prawdopodobnych przyczyn obserwowanych różnic zaliczyć można zjawisko zwiększonej syntezy i akumulacja lipidów przez komórki białaczkowe, które mogą wykazywać wyższy poziom syntezy lipidów, a co może wspierać ich szybki wzrost i proliferację [147]. Komórki te często wykazują zmieniony profil metabolizmu lipidów, w tym różnice w procesach lipogenezy i lipolizy. Wykorzystują one lipidy do wytworzenia chemicznych przekazników na drodze katalizowanej przez fosfolipazy hydrolizy błonowych fosfolipidów czy syntezy z dostarczanych w diecie wolnych kwasów tłuszczowych, takich jak diacyloglicerol, kwas fosfatydowy, kwas lizofosfatydowy czy kwas arachidonowy wyzwalające aktywację szlaku RAS, kinaz fosfo-3-inozytolu, kinazy białkowej C, RAC, RHO i kilku innych szlaków sygnałowych, które odgrywają kluczową rolę w regulacji wzrostu komórek, metabolizmu i przeżycia [148-150]. Zmiany te mogą służyć jako mechanizm adaptacyjny, umożliwiający komórkom nowotworowym przetrwanie w warunkach stresu metabolicznego. Co więcej, w komórkach białaczkowych ALL może dojść do akumulacji specyficznych lipidów, takich jak ceramidy czy sfingolipidy, które mogą wpływać na funkcjonowanie błon komórkowych oraz procesy związane z apoptozą [151-153].

Należy zauważyć, iż w przeprowadzonym badaniu dla wymienionych pików czułość i specyficzność osiągnięte dla różnicowania grupy pacjentów zdrowych i pacjentów z ALL wynosiły 76,09% i 92,86% dla pików przy 2957-2955 cm^{-1} ($\text{AUC}=0,84938$) oraz 63,04% i 92,86% dla pików przy 2927-2925 cm^{-1} ($\text{AUC}=0,7632$). Pik pojawiający się przy 2870 cm^{-1} charakteryzowała 71,74% czułość i 100% specyficzność ($\text{AUC}=0,85248$), które dla pików przy 2855-2854 cm^{-1} wynosiły odpowiednio 67,39% i 100% ($\text{AUC}=0,84938$). Najmniej zadawalające wyniki osiągnięto dla pików przy 1451-1449 cm^{-1} oraz 1398-1395 cm^{-1} , dla których parametry te osiągnęły wartość odpowiednio 67,39% i 78,57% ($\text{AUC}=0,84938$) oraz 76,09% i 71,43% ($\text{AUC}=0,8354$). Dodatkowo dla żadnego z wymienionych pików nie uzyskano różnic istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą pacjentów z ALL oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi.

Istotne różnice stwierdzono natomiast pomiędzy grupą pacjentów zdrowych oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi. Dla grupy pacjentów zdrowych i pacjentów z leukopenią różnice te dotyczyły pików przy: 3106-3104 cm^{-1} ($p=0,048402$), 3095-3094 cm^{-1} ($p=0,049788$), 2955-2954 cm^{-1} ($p=0,000596$), 2927-2925 cm^{-1} ($p=0,002444$), 2870 cm^{-1} ($p=0,000581$), 2855-2854 cm^{-1} ($p=0,000846$), 1451-1449 cm^{-1} ($p=0,003492$), 1396-1394 cm^{-1} ($p=0,003492$), podczas gdy dla grupy pacjentów zdrowych i pacjentów z małopłytkowością różnice te stwierdzono dla pików przy: 2955-2954 cm^{-1} ($p=0,042372$), 2927-2925 cm^{-1} ($p=0,006436$), 2870 cm^{-1} ($p=0,002604$), 2855-2854 cm^{-1} ($p=0,012007$), 1451-1449 cm^{-1} ($p=0,000930$), 1396-1394 cm^{-1} ($p=0,000921$). Analizując grupę pacjentów z pancytopenią wartości absorpcji różniły się istotnie statystycznie dla pików występujących przy: 2955-2954 cm^{-1} ($p=0,007270$), 2870 cm^{-1} ($p=0,006713$), 2855-2854 cm^{-1} ($p=0,044598$), 1451-1449 cm^{-1} ($p=0,034907$), natomiast dla pacjentów z anemią różnica ta dotyczyła tylko pików przy 2870 cm^{-1} ($p=0,035217$). Obiecujące wyniki względem wymienionych pików uzyskano dla różnicowania pacjentów zdrowych i pacjentów z anemią (71,43% i 100%, $\text{AUC}=0,87755$), pacjentów z pancytopenią (czułość w zakresie 71,43%-85,71%, specyficzność 100%, $\text{AUC}=0,82653-0,96429$) oraz pacjentów z małopłytkowością (czułość w zakresie 88,99%-100%, specyficzność – 92,86% do 100%, $\text{AUC}=0,89683-0,99603$). Zbliżone wyniki otrzymano dla możliwości różnicowania pacjentów zdrowych i pacjentów z leukopenią z czułością w zakresie 68,75-87,5%, i specyficzność w zakresie 92,86-100% ($\text{AUC}=0,77902-0,94643$). Zmienność międzysobnicza, jak również złożoność informacji uzyskiwanej przy analizie surowicy jako płynu ciała bogatego między innymi w związki lipidowe,

węglowodany, aminokwasy, witaminy i białka, może tłumaczyć wartości parametrów dla czułości i specyficzności pomimo uzyskania istotnej statystycznie różnicy w wartości absorpcji dla pojedynczych pików [154]. Pomimo tego, wyniki te pokazują dosyć wysoką zdolność spektroskopii FTIR do detekcji zmian jakie zachodzą w składzie chemicznym surowicy.

W widmie FT-IR surowicy najwyższą absorpcję dla wszystkich grup wykazano w regionie daktyloskopowym dla pasma amidu I, obejmującego zakres $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ oraz pasma amidu II z pikiem pojawiającym się przy $1532-1531\text{ cm}^{-1}$ przypisywanym dla drgań zginających -NH i rozciągających C-N białek. W regionie amidu I nie obserwowano istotnych przesunięć maksimów dla poszczególnych pików czy różnic w wartości absorpcji, ale dla pacjentów zdrowych oraz pacjentów z małopłytkowością nie odnotowano pików przy $1640-1639\text{ cm}^{-1}$, a dla grup pacjentów z leukopenią i pancytopenią pików przy $1634-1633\text{ cm}^{-1}$, które były obecne w widmach uśrednionych pozostałych grupach pacjentów. Pasma amidu I składa się z kilku zachodzących na siebie pasm składowych, którym przypisać można poszczególne struktury drugorzędowe białka. Struktury te stabilizowane są poprzez wiązania wodorowe wytwarzane pomiędzy atomem tlenu grupy karboksylowej jednego aminokwasu i atomem azotu grupy aminowej drugiego, oddalonego aminokwasu łańcucha polipeptydowego na skutek czego dochodzi do miejscowego skręcania bądź fałdowania się struktury pierwszorzędowej. Prawoskrętna struktura powstająca poprzez wytworzenie wiązania wodorowego pomiędzy co czwartym aminokwasem określana jest jako α -helisa. β -karta, inaczej β -harmonijka, ze względu na wygląd przypominający pofałdowaną kartkę, stabilizowana jest poprzez wiązania wodorowe pomiędzy sąsiednimi łańcuchami polipeptydowymi, a β -zakręt poprzez wytworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, często pomiędzy antyrównoległymi niemi beta i ze zmianą kierunku łańcucha polipeptydowego [88]. Obliczając stosunek procentowy struktur α -helisy, β -kartki oraz struktur nieuporządkowanych, za pomocą spektroskopii w podczerwieni, możliwe jest śledzenie strukturalnych zmian białek zachodzących w przebiegu patologicznych procesów w różnych chorobach. W przeprowadzonym badaniu wykorzystano drugą pochodną widma, dokonując integracji dla zakresów przypisywanych danym strukturom dla porównania wartości między poszczególnymi grupami. Gdy porównano drugą pochodną dla widm uśrednionych dla grup nie obserwowano istotnych przesunięć pozycji minimum, które mieściły się w przedziale $\pm 2\text{ cm}^{-1}$. Zauważalne są natomiast pewne

różnice pod względem udziału procentowego poszczególnych struktur drugorzędowych białek pomiędzy grupami. Dla wszystkich grup dominującą strukturą była β -karta z minimum przy 1631-1629 cm^{-1} , a najniższe wartości obserwowano dla struktury β -zakrętu z minimum w zakresie 1671-1670 cm^{-1} . Dla pacjentów z białaczką uzyskano wyższą wartość dla udziału procentowego struktury α -helisy (minimum przy 1661-1660 cm^{-1}) w porównaniu do udziału β -zakrętu (1680-1679 cm^{-1}), a dla grupy pacjentów zdrowych udział ten był wyższy od zarówno od struktury β -zakrętu (1680-1679 cm^{-1}) jak i β -kartki (1631-1629 cm^{-1}). W odróżnieniu od pozostałych grup, dla uśrednionego widma grupy pacjentów z pancytopenią udział struktury α -helisy był niższy od udziału struktury nieuporządkowanej (1646-1644 cm^{-1}). Co więcej, istotną statystycznie różnicę dla procentowego udziału α -helisy obserwowano dla grupy pacjentów zdrowych i pacjentów z leukopenią ($p=0,02267$), a dla udziału struktury nieuporządkowanej różnica ta została zaobserwowana dla pacjentów z anemią i pacjentów z białaczką ($p=0,030408$) oraz pacjentów zdrowych ($p=0,002077$). Dla struktury α -helisy czułość i specyficzność wynosiła odpowiednio 66,67% oraz 100% ($\text{AUC}=0,8381$) i przyjmowała znacznie bardziej obiecujące wyniki dla struktury nieuporządkowanej dla których wynosiła odpowiednio 85,71% i 90,91% (HEMC-E vs. LEUK-PD, $\text{AUC}=0,89935$) oraz 85,71% i 100% (HC vs. HEMC-E, $\text{AUC}=0,97959$). Co więcej, gdy porównano udział struktury α -helisy dla różnicowania grup HEMC-W i LEUK-PD przyjmując wartość odcięcia 11,663% czułość i specyficzność odróżnienia wynosiły odpowiednio 75% i 85,71% ($\text{AUC}=0,77273$). Inną zauważalną różnicę stwierdzono dla pacjentów z małopłytkowością i pancytopenią udział β -zakrętu (1680-1679 cm^{-1}) był wyższy od β -kartki (1694-1692 cm^{-1}) w odróżnieniu od pozostałych grup. Dodatkowo, bliską istotności statystycznej różnicę dla udziału struktury β -zakrętu (1680-1679 cm^{-1}) obserwowano pomiędzy grupą pacjentów zdrowych, dla których odnotowano najniższy udział procentowy tej struktury, a grupą pacjentów z białaczką ($p=0,061787$). Opisaną wyżej różnicę w strukturze drugorzędowej białek pomiędzy pacjentami z ALL i pozostałymi grupami, mogą zostać potencjalnie wykorzystane przy tworzeniu modeli diagnostycznych identyfikujących ALL jako przyczynę anemii lub pancytopenii krwi obwodowej.

Wartość absorpcji dla pozostałych przypisywanych dla aminokwasów i białek pików tj. pików charakterystycznych dla drgań C=O seryny, treoniny, tyrozyny (1170-1168 cm^{-1}) i przypisywanego dla amidu III pików przy 1308-1306 cm^{-1} , różniła się istotnie

statystycznie dla grupy pacjentów zdrowych i pacjentów z białaczką (odpowiednio $p=0,000078$, $p=0,004032$), a także grupy pacjentów zdrowych i tych z zaburzeniami hematologicznymi tj. leukopenia ($p=0,000263$, $p=0,013396$), małopłytkowość ($p=0,000563$, $p=0,008312$) i pancytopenia ($p=0,001673$, $p=0,009675$). Czułość i specyficzność, podobnie jak w przypadku wcześniej opisywanego zakresu $3500-2800\text{ cm}^{-1}$, była zauważalnie wyższa porównując zdolność odróżnienia pacjentów zdrowych i z zaburzeniami hematologicznymi, niż w przypadku pacjentów z ALL. Dla tych ostatnich wynosiła odpowiednio 76,09% i 100% ($AUC=0,89752$) dla pików przy $1170-1168\text{ cm}^{-1}$ oraz 69,57% i 78,57% ($AUC=0,79348$) dla pików przy $1308-1306\text{ cm}^{-1}$. Dla pacjentów zdrowych i pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi czułość i specyficzność dla pików przy $1170-1168\text{ cm}^{-1}$ wynosiła odpowiednio po 100% dla pacjentów z małopłytkowością oraz dla pacjentów z leukopenią ($AUC=1$) i była najniższa dla pacjentów z pancytopenią – 85,71% i 100% ($AUC=0,96939$). Dla pików przy $1308-1306\text{ cm}^{-1}$ wartości te prezentowały się następująco – dla pacjentów z małopłytkowością – 100% i 92,86% ($AUC=0,99206$), dla pacjentów z leukopenią – 81,82 % i 92,86% ($AUC=0,91295$) i ponownie były najniższe dla pacjentów z pancytopenią – 85,71% i 78,57% ($AUC=0,92347$).

Dla dwóch omawianych wcześniej pików, przypisywanych zarówno dla lipidów jak i białek przy $1451-1449\text{ cm}^{-1}$ oraz $1398-1395\text{ cm}^{-1}$, oprócz statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą pacjentów zdrowych i pacjentów z białaczką, zaobserwowano także różnice dla grupy pacjentów zdrowych i pacjentów z leukopenią (odpowiednio $p=0,003492$, $p=0,012649$) oraz małopłytkowością ($p=0,000930$, $p=0,000921$), a dla pików $1451-1449\text{ cm}^{-1}$ również dla pacjentów zdrowych i pacjentów z pancytopenią ($p=0,034907$). Dla pacjentów z leukopenią otrzymano nieznacznie mniej obiecujące wyniki gdy porównano czułość i specyficzność dla obydwu pików, która wynosiła odpowiednio 75% i 100% ($AUC=0,89063$) dla pików $1451-1449\text{ cm}^{-1}$ oraz 75% i 92,86% ($AUC=0,87946$) dla pików przy $1398-1395\text{ cm}^{-1}$. Dla pozostałych grup wartości te mieściły się w przedziale 85,71% -100% oraz 92,86%-100% dla obydwu pików ($AUC=0,86735-0,9881$). Należy zauważyć istotną statystycznie różnicę dla pików przy $1398-1395\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,000020$), $1308-1306\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,000034$), $1239-1238\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,000001$) i $1170-1168\text{ cm}^{-1}$ ($p<0,0001$) i $1103-1102\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,001524$) obserwowano gdy porównano wartości absorpcji dla grupy pacjentów zdrowych oraz wszystkich pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włączając ALL co sugeruje, iż na podstawie widm FT-IR surowicy

można śledzić zmiany fizykochemiczne zachodzące w przebiegu schorzeń przebiegających ze zmianą składu komórkowego krwi obwodowej.

Zelig i współautorzy wykorzystali technikę mikrospektroskopii FT-IR (ang. FT-IR microspectroscopy, FTIR-MSP) do zbadania komórek mononuklearnych wyizolowanych z krwi obwodowej 27 pacjentów zdrowych, 19 pacjentów u których obserwowano objawy infekcji (grupy referencyjne) oraz 15 pacjentów z różnymi typami białaczki, w tym ALL. Analiza klastrowa wykazała, iż dla region 3000-2800 cm^{-1} uzyskano najlepszą zdolność rozróżnienia pacjentów z białaczką od dwóch grup referencyjnych, ale istotne statystycznie różnice obserwowano także dla innych pików regionu daktyloskopowego związanych z białkami tj. pików przy 1656 cm^{-1} , 1546 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1313 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} czy 1155 cm^{-1} powiązanego z drganiami rozciągającymi grup C-O białek i węglowodanów, czego nie obserwuje się w widmach surowicy w tej pracy. Porównując wartości absorpcji dla wszystkich analizowanych pików autorzy przedstawionego badania nie byli jednak w stanie rozróżnić pacjentów z grup referencyjnych, które klastrowały się razem. Co więcej, na przykładzie trzech przypadków ALL, w korelacji z odsetkiem blastów w krwi obwodowej i szpiku kostnym, zbadali oni zmianę absorpcji dla pików 2853 cm^{-1} oraz 967 cm^{-1} , który przypisuje się drganiom szkieletowym grup C-O i C-C deoksyrybozy DNA, w czasie trwania chemioterapii, obserwując dla pacjenta z B-ALL obniżanie się wartości absorpcji dla pików 2853 cm^{-1} w pierwszych dniach leczenia, następnie jej wzrost do poziomu uzyskanego dla komórek mononuklearnych zdrowych osób i powyżej oraz spadek absorpcji dla DNA do poziomu poniżej normy, aż do 88 dnia leczenia, w którym poziom absorpcji dla obydwu pików wskazał na obecność minimalnej choroby resztkowej. Powyższe obserwacje mają jednak charakter jednostkowy i na tej podstawie nie można wyciągnąć żadnych istotnych wniosków [155].

Inne istotne statystycznie różnice w wartości absorpcji wykazano dla pików przypisywanym drganiom rozciągającym asymetrycznym grup fosforanowych kwasów nukleinowych, fosfolipidów i białek fosforylowanych (1239-1238 cm^{-1} , $p=0,000135$) oraz lewoskrętnej helisie DNA (934-931 cm^{-1} , $p=0,010131$), dla grupy pacjentów zdrowych i pacjentów z ALL, dla których wartości te były niższe. Czułość i specyficzność dla różnicowania tych dwóch pików wynosiła odpowiednio 76,09% i 100% ($\text{AUC}=0,87578$) dla pików 1239-1238 cm^{-1} oraz 67,39% i 100% ($\text{AUC}=0,79193$) dla pików 934-931 cm^{-1} . Dodatkowo dla pików przy 1239-1238 cm^{-1} wartość absorpcji różniły się w sposób istotny

statystycznie dla pacjentów zdrowych oraz pacjentów z leukopenią ($p=0,001255$, czułość 93,75%, specyficzność 100%, $AUC=0,94643$), pancytopenią ($p=0,008860$, 71,43% i 100%, $AUC=0,94898$) i małopłytkowością ($p=0,000607$, 100%, $AUC=1$), a dla pików 934-931 cm^{-1} dla pacjentów zdrowych i pacjentów z leukopenią ($p=0,043127$, 68,75% i 100%, $AUC=0,80357$).

We wspomnianych wcześniej badaniach Sheng i współ. zaobserwowali istotną statystycznie różnicę dla pików przy 1240 cm^{-1} , a także dla innych powiązanych z kwasami nukleinowymi, fosfolipidami i białkami pików między innymi dla przypisywanego drganiom symetrycznym grup PO_2^- pików pojawiającym się przy 1085 cm^{-1} , charakterystycznego dla drgań szkieletowych grup C-C i C-O deoksyrybozy (967 cm^{-1}) i drgań szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA (780 cm^{-1}). Dla pierwszego z nich, w badaniu Sheng i współ., pik obserwowano w zakresie 1076-1075 cm^{-1} , nie stwierdzając istotnych statystycznie różnic. Dodatkowo dokonując dopasowania krzywej dla pików charakterystycznych dla drgań grup funkcyjnych kwasów DNA i RNA, zaobserwowano niższy stosunek absorpcji dla pików przy 1115 cm^{-1} i 1028 cm^{-1} (A_{1115}/A_{1028}) w surowicy pacjentów z białaczką, a Ramesh i współ. dla pików przy 1245 cm^{-1} i 967 cm^{-1} , dla którego we wszystkich analizowanych przypadkach zauważyli, iż poziom absorpcji korelował z dniem leczenia, co tłumaczono szybkim obniżaniem się liczby komórek blastycznych i silną kondensacją chromatyny komórek apoptycznych, która wpływa na możliwość detekcji sygnału dla DNA [144-145]. Sprzeczne rezultaty otrzymali Schultz i współ., którzy wykazali wyższą absorpcję w regionie 1300-900 cm^{-1} widma komórek przewlekłej białaczki limfocytowej w porównaniu do widm prawidłowych limfocytów, odpowiadającej zawartości DNA, co jak najczęściej sugeruje się w przypadku CLL jest wynikiem zaburzeń chromosomalnych, dotyczących nawet 65% pacjentów. Podobne rezultaty uzyskali Benedetti i współ., którzy analizując limfocyty uzyskane od pacjentów z CLL zaobserwowali, iż wyższą absorpcję dla pików związanych z asymetrycznymi i symetrycznymi drganiami grup PO_2^- i stosunek zintegrowanego pola powierzchni pod pikiem z maksimum przy 1080 cm^{-1} do 1540 cm^{-1} były kluczowe dla rozróżnienia limfocytów CLL i limfocytów prawidłowych uzyskanych od zdrowych pacjentów [156-158].

W niniejszej rozprawie weryfikowano zdolność rozróżniania pacjentów z zdrowych i z zaburzeniami hematologicznymi od pacjentów z ALL na podstawie uzyskanych widm FT-IR surowicy porównując pozycję pików i wartości absorpcji,

a także przeprowadzając wielowymiarową analizę PCA i HCA, oceniając możliwość stworzenia modelu klasyfikacyjnego. Wyniki analiz pozostawały zbieżne. Na wykresach nie obserwowano wyraźnego klastrowania się wyników względem przynależności pacjentów do danej grupy. Wyniki pacjentów z białaczką, jak również pacjentów z leukopenią i małopłytkowością cechowało rozproszenie względem trzech analizowanych głównych komponentów wyjaśniających odpowiednio 76,77%, 8,55% i 5,87% wariancji dla wyjściowych danych spektralnych. Wyniki dla pacjentów zdrowych tworzyły zwarty klaster względem dodatnich wartości PC1 i PC2 tłumaczonych ujemnymi obciążeniami powiązanymi z drganiami rozciągającymi estrowych grup karbonylowych (1743 cm^{-1}), amidem I-rzędowym (1620 cm^{-1}), amidem II-rzędowym (1549 cm^{-1}) i drganiami rozciągającymi grup -NH amidu A, grup hydroksylowych cząsteczek wody, a także asymetrycznymi i symetrycznymi drganiami grup CH_2 i CH_3 lipidów w zakresie $3500\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$. Z kolei dla pacjentów z pancytopenią oraz anemią zaobserwowano klastrowanie się wyników względem ujemnych wartości PC2. Te tłumaczone są dodatnimi obciążeniami, którym odpowiadają zakresy charakterystyczne dla symetrycznych i asymetrycznych drgań rozciągających grup CH_3 i CH_2 (2981 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1}), drgań estrowych grup karbonylowych (1743 cm^{-1}) i drgań rozciągającym szkieletu węglowego struktur randomowych (1066 cm^{-1}). W uwagi na rozproszenie wyników pacjentów z białaczką wśród wyników pacjentów zdrowych jak i pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi, wyniki analiz te nie wykazują potencjału, aby na ich podstawie stworzyć model klasyfikacyjny dla ALL, co potwierdza również wynik analizy HCA. Jednakże, fakt iż wyniki dla grupy pacjentów zdrowych ustygowane są w zwartym klastrze, w przeciwieństwie do pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi oraz pacjentów z ALL, daje potencjał do wykorzystanie tego faktu w opracowaniu metod diagnostycznych opartych na analizie składu biochemicznego do wstępnych badań przesiewowych.

Widma FT-IR surowicy – markery prognostyczne

Porównano wartości absorpcji dla widm pacjentów z grupy wysokiego ryzyka oraz pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka. Pomimo zauważalnych dla uśrednionych widm FT-IR surowicy różnic w wartości absorpcji w zakresach $3500\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$, $1450\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ i $1150\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, różnice w wartości absorpcji dla wyznaczonych pików nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej. Dla oryginalnych uśrednionych widm grup nie także stwierdzono istotnych przesunięć, podczas gdy dla widm drugiej pochodnej zauważono, iż piki przy pozycji minimum 1059 cm^{-1} i 924 cm^{-1} obecny były tylko w widmie grupy HR. Piki te przypisuje się odpowiednio drganiom rozciągającym C=O węglowodanów, glikogenu, deoksyrybozy i rybozy DNA i RNA oraz lewoskrętnej helisie kwasu DNA, a ich występowanie może być związane ze znacznymi różnicami struktury krążącej w surowicy chromatyny. Zależność tą zweryfikowano i z uwagi na fakt, iż piki te występowały w widmach drugiej pochodnej zarówno pacjentów z grupy wysokiego ryzyka jak i pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka, nie mogą być uznane za wiarygodne wskaźniki prognostyczne.

Przeprowadzono także integrację widma drugiej pochodnej w zakresie amidu I dla porównania udziału poszczególnych struktur drugorzędowych białka. Analiza ta wykazała istotną statystycznie różnicę dla grup HR i non-HR dla udziału procentowego struktury beta-kartki z minimum przy 1630 cm^{-1} , który był wyższy dla grupy non-HR (28,74% dla uśrednionego widma HR i 31,45% dla grupy non-HR, $p=0,00124$). W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się strukturom beta-kartki w związku z ich rolą w procesie agregacji białek, która obserwowana jest w przypadku choroby Alzheimera, zespołu nabytego niedoboru odporności czy chorób prionowych, ale także chorób nowotworowych [158]. Rasuleva i współ. zaobserwowali iż pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular vesicles, EVs) uwalniane z komórek raka trzustki były bogatsze w struktury beta-kartki od tych uwalniane z odpowiadającym im komórek prawidłowych. Liczne doniesienia wskazują iż w przypadku ALL, bogate w kwasy nukleinowe, białka i lipidy pęcherzyki odgrywają kluczową rolę zarówno w rozwoju, progresji jak i nabywaniu oporności przez komórki białaczkowe na leczenie [159-161]. Nie znaleziono jednak doniesień odnoszących się bezpośrednio do struktur beta-kartki obecnych w EVs, jako czynników rokowniczych w ALL. Czułość i specyficzność

odróżnienia pacjentów z grupy HR i non-HR wynosiła 77,14% i 88,89% (AUC= 0,85397). Tylko dla 9 spośród 39 pacjentów z grupy non-HR i dla wszystkich pacjentów z grupy HR udział tej struktury był mniejszy niż 32%, co obrazuje duży potencjał oceny procentowego udziału struktury β -kartki na podstawie widm FT-IR surowicy jako marker prognostycznego.

Następnie przeprowadzono analizy HCA i PCA, dla których to wyniki dla grupy HR jak i non-HR są rozproszone, nie wykazano dla nich klastrowania się względem analizowanych komponentów. Dodatkowo wyniki dla pacjentów z grupy HR nie są rozmieszczone na wykresie w korelacji z wykazywaniem przez pacjentów wczesnych czynników wysokiego ryzyka czy poziomem MRD. Nie wykazano także związku z położeniem wyniku na wykresie i wznową bądź zgonem pacjenta.

Należy jednak zwrócić na dysproporcje w liczebności prób jakimi dysponowano w tym badaniu. Do grupy wysokiego ryzyka w badanej grupie zakwalifikowano tylko 9 pacjentów spośród 48 wszystkich włączonych do badania, co związane jest z epidemiologią tego nowotworu.

Widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego – markery diagnostyczne

Przeanalizowano widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Ze względu na inwazyjny charakter zabiegu biopsji szpiku kostnego, jego uzyskanie od zdrowych dzieci, nie było możliwe. Mała liczebność grupy badanej stanowi istotne ograniczenie w analizie uzyskanych wyników, co jest związane z małą zapadalnością dzieci na ciężkie schorzenia hematologiczne. Z tego powodu analiza widm spektroskopowych lizatu komórkowego szpiku kostnego została przeprowadzona również bez uwzględniania szczegółowych rozpoznań.

Obserwowano różnice w wartości absorpcji dla uśrednionych widm, w szczególności niższą absorpcję w zakresie ok. $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ dla widma grupy pacjentów z małopłytkowością, a także w zakresie $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ dla pacjentów z białaczką. Istotne przesunięcie stwierdzono dla piku $2987\text{--}2986\text{ cm}^{-1}$, który nie pojawiał się w widmie uśrednionym pacjentów z pancytopenią, a u pacjentów z małopłytkowością

obserwowano go przy 2981 cm^{-1} . Dla widm drugiej pochodnej wykazano jednak, iż tylko dla 2 przypadków pacjentów z małopłytkowością obserwowane jest istotne przesunięcie w kierunku wyższych liczb falowych, a dla pozostałych obserwowano minima przy $2988\text{--}2986\text{ cm}^{-1}$. Ponadto przesunięcia te stwierdzono także u pacjentów z białaczką, leukopenią i pancytopenią przez co nie można ich uznać za powiązanych wyłącznie z małopłytkowością. Kolejne przesunięcie stwierdzono dla pików charakterystycznego dla drgań symetrycznych grup fosforylowych, który dla pacjentów z leukopenią, pancytopenią oraz białaczką, obserwowano przy 1085 cm^{-1} , dla pacjentów z małopłytkowością przy 1087 cm^{-1} , a dla pacjentów z anemią przy 1081 cm^{-1} . Co więcej, dodatkowy pik wykazano w uśrednionym widmie pacjentów z anemią przy 1068 cm^{-1} . Dalsza analiza wykazała jednak, iż w omawianym zakresie widma wykazują dużą zmienność związaną z położeniem pików jak i obecnością mniejszych dodatkowych pików, przez co podobnie jak w przypadku poprzedniego pików nie można ich uznać za kluczowe dla stworzenia modelu diagnostycznego dla pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi i pacjentów z ALL.

Gdy uwzględniano poszczególne zaburzenia hematologiczne istotne statystycznie różnice w wartości absorpcji dla zidentyfikowanych pików stwierdzono dla grupy pacjentów z pancytopenią i pacjentów z leukopenią dla pików przy $1633\text{--}1632\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,045468$), który w literaturze drganiom rozciągającym grup $\text{C}=\text{O}$ wiązania amidu I obecnego w białkach. W moim badaniu czułość i specyficzność różnicowania pacjentów z pancytopenią oraz pacjentów z leukopenią na podstawie wartości absorpcji dla pików przy $1633\text{--}1632\text{ cm}^{-1}$ wynosiła $66,67\%$ i 800% ($\text{AUC}=0,71667$), co nie pozwala na stworzenie wiarygodnego modelu klasyfikacyjnego dla wyżej wymienionych zaburzeń. Dodatkowo, przeprowadzona dla wszystkich grup integracja widma w zakresie $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ amidu I nie wykazała istotnych statystycznie różnic w udziale procentowych poszczególnych struktur drugorzędowych białek, co potwierdza powyższą tezę.

Dla pików przy $2928\text{--}2925\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,000782$) i $2958\text{--}2956\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,008207$) odpowiadającym odpowiednio drganiom asymetrycznym rozciągającym grup CH_3 i grup CH_2 lipidów, a także dla pików przy $2871\text{--}2870\text{ cm}^{-1}$ ($p=0,030664$) przypisywanemu dla drgań symetrycznych grup CH_2 lipidów, istotne statystycznie różnice stwierdzono gdy nie uwzględniano poszczególnych zaburzeń hematologicznych. Różnice te podobnie jak w przypadku surowicy powiązań można ze zwiększonym wykorzystaniem i akumulacją związków lipidowych przez komórki białaczkowe. Z uwagi na osiągniętą czułość

i specyficzność, które mieściły się w przedziale 52-63,15% i 65,22-76,93% (AUC=0,60984-0,76769) nie można jednoznacznie stwierdzić, iż na podstawie wyznaczonej wartości absorpcji dla wyżej wymienionych pików lizatu komórkowego szpiku kostnego można różnicować pacjentów z białaczką i pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi innymi niż białaczka.

Wyniki te znajdują potwierdzenie na wykresach wyników PCA i dendrogramach HCA, w których to nie obserwuje się klastrowania się wyników dla pacjentów z białaczką, a które to położone są wśród wyników pacjentów z pozostałymi zaburzeniami hematologicznymi. Jedynie dla pacjentów z pancytopenią zauważalne jest grupowanie się wyników względem dodatnich wartości PC1 (57,90% wariancji wyjściowych danych), które objaśniają ujemne obciążenia. Obciążenia te powiązane były z pikami charakterystycznymi dla drgań asymetrycznych i symetrycznych rozciągających grup CH_2 (odpowiednio 2944 cm^{-1} i 2859 cm^{-1}), a także dla drgań rozciągających grup C-H (3000 cm^{-1}).

Z uwagi na fakt, iż u 81,25 % pacjentów z białaczką w tym badaniu odsetek blastów w szpiku kostnym wynosił przynajmniej 70%, a u jednej trzeciej z nich przynajmniej 90% założono, iż analiza lizatu komórkowego pozwoli na identyfikację markerów diagnostycznych dla ALL. Jedną z prawdopodobnych przyczyn uzyskania wyników, które nie wydorebniają w sposób jednoznaczny pacjentów z ALL, jest maskowanie ważnych zmian spektralnych przez obecność hemoglobiny w próbkach, uwolnionej z prekursorów erytrocytów. Hemoglobina wykazuje widmo podobne do widma szpiku kostnego, z dominującymi pikami w regionie amidu I, amidu II, a także w zakresie $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, dla którego przypisuje się drgania rozciągające grup CH_3 i CH_2 kwasów tłuszczowych i cholesterolu [162-163].

Widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego – markery prognostyczne

Porównując położenie jak i wartość absorpcji dla wyznaczonych pików widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z grupy wysokiego ryzyka i pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie, pomimo iż dla uśrednionego widma tej pierwszej grupy w zakresie 3500--

3000 cm^{-1} oraz 1000-800 cm^{-1} wartość absorpcji była wyższa od tej obserwowanej dla uśrednionego widma pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka. Przeprowadzona integracja w zakresie amidu I nie wykazała także istotnych statystycznie różnic dla udziału procentowego poszczególnych struktur drugorzędowych. Z uwagi na położenie wyników dla pacjentów z grupy wysokiego ryzyka na wykresie PCA wśród wyników pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka, nie było możliwe potwierdzenie skuteczności tej analizy w celu stworzenia modelu klasyfikacyjnego, co potwierdza również dendrogram HCA.

Widma surowicy spektroskopii Ramana - markery diagnostyczne

Obiecujące wyniki uzyskano porównując widma ramanowskie surowicy. Podobnie jak w przypadku widm FT-IR obserwowano różnice w intensywności uśrednionych widm badanych grup, jednocześnie nie stwierdzając istotnych przesunięć dla uśrednionych widm grup, które mieściły się w zakresie 1 cm^{-1} . Najwyższą intensywność widma obserwowano dla pików przypisywanych dla drgań fenyloalaniny przy 1004 cm^{-1} , drgań wahadłowych grup CH_3 i CH_2 białek i lipidów (1449 cm^{-1}) i drgań rozciągającym grup $\text{C}=\text{O}$ amidu I i $\text{C}-\text{C}$ lipidów (1658 cm^{-1}), dla którego istotnie statystycznie wyższą wartość intensywności obserwowano dla pacjentów zdrowych w porównaniu do pacjentów z białaczką ($p=0,001537$) jak i pacjentów zdrowych oraz pacjentów z leukopenią ($p=0,000589$), małopłytkowością ($p=0,002681$) i pancytopenią ($p=0,005238$). Pik ten przypisuje się dla głównej frakcji białek osoczowych – albumin, obok innych przy 828 cm^{-1} , 850 cm^{-1} , 950 cm^{-1} , 1002 cm^{-1} , 1350 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} i 1650 cm^{-1} [164]. Czułość i specyficzność rozróżnienia pacjentów zdrowych od pacjentów z małopłytkowością oraz pancytopenią 100% ($\text{AUC}=1$), podczas gdy dla pacjentów z białaczką 78,95% i 85,71% ($\text{AUC}=0,82331$). Dla pacjentów z leukopenią wartości te były niższe niż w przypadku pacjentów z pancytopenią i małopłytkowością i wynosiły 85,71 % i 92,86% ($\text{AUC}=0,93878$).

Inne statystycznie istotne różnice dla grupy pacjentów zdrowych i pacjentów z białaczką opisano również dla pików przypisywanego dla tyrozyny i tryptofanu (1618 cm^{-1} , $p=0,020316$), dla tyrozyny i fenyloalaniny pikowi pojawiającemu się w widmie przy

1606 cm^{-1} ($p=0,032299$), a także dla pików charakterystycznych dla drgań deformacyjnych grup CH białek, drgań pierścieni aromatycznych guaniny i adeniny i fenyloalaniny (1340-1339 cm^{-1} , $p=0,025736$) i powiązanego z deformacyjnymi struktury amidu III-rzędowego białek oraz guaniny piku przy 1319 cm^{-1} przesunięcia Ramana ($p=0,014566$). Dla wszystkich z tych pików, ich intensywność była istotnie wyższa dla grupy pacjentów zdrowych. W odróżnieniu od wyników analiz FT-IR surowicy, dla widm Ramana uzyskano mniej obiecujące parametry dla czułości i specyficzności odróżnienia pacjentów zdrowych i pacjentów z białaczką, które dla poszczególnych pików sięgały odpowiednio 68,42% i 78,57% ($\text{AUC}=0,75564$) dla piku przy 1618 cm^{-1} , 68,42% i 71,43% ($\text{AUC}=0,72556$) dla piku przy 1606 cm^{-1} , następnie 78,57% i 63,16% ($\text{AUC}=0,74436$) dla piku przy 1340-1339 cm^{-1} oraz 63,16% i 92,86% ($\text{AUC}=0,75188$) dla piku przy 1319 cm^{-1} .

Jednocześnie dla pików przy 1618 cm^{-1} , 1606 cm^{-1} , 1340-1339 cm^{-1} , 1319 cm^{-1} i 1271-1270 cm^{-1} istotne statystycznie różnice zaobserwowano dla pacjentów zdrowych i pacjentów z leukopenią (odpowiednio $p=0,05087$, $p=0,003065$, $p=0,008792$, $p=0,017523$, $0,022274$). Inne piki dla których stwierdzono istotne statystycznie różnice w wartości intensywności pomiędzy grupą pacjentów zdrowych i pacjentów z leukopenią powiązane są z drganiami wahadłowymi grup CH_3 i CH_2 lipidów i białek (1449 cm^{-1} , $p=0,001131$) i drganiami pierścieni aromatycznych fenyloalaniny (1004 cm^{-1} , $p=0,039295$), a także tyrozyny i tryptofanu oraz drganiami skręcającymi grup CH_2 metioniny (1209 cm^{-1} , $p=0,0017523$). Osiągnięte wartości czułości i specyficzności mieściły się w przedziale 71,43-100% i 85,71-100% ($\text{AUC}=0,84184-1$).

Dla pacjentów zdrowych i pacjentów z anemią istotną statystycznie różnicę dla wartości intensywności uzyskano tylko dla omawianego powyżej piku przy 1209 cm^{-1} , przy czym czułość i specyficzność w tym przypadku wynosiła odpowiednio 100% i 93,33% ($\text{AUC}=0,9333$). Równie obiecujące wyniki uzyskano gdy porównano wartości intensywności dla pików przy 958 cm^{-1} , 944 cm^{-1} i 900 cm^{-1} pomiędzy grupą pacjentów z białaczką i pacjentów z pancytopenią, dla których to czułość mieściła się w przedziale 79,07-100%, a specyficzność w przedziale 78,57-100%. Piki te przypisywane są odpowiednio drgań grup CH_3 (białka), drgań rozciągających grup C-C (lipidy) oraz drgań pierścieni aromatycznych tryptofanu, tyrozyny, drgań rozciągających grup C-C glutationu i drgań deformacyjnych pierścieni aromatycznych DNA. Nie stwierdzono innych statystycznie istotnych różnic pomiędzy pacjentami z zaburzeniami hematologicznymi,

a pacjentami z białaczką, jednakże porównanie intensywności pików przy 1658 cm^{-1} i 1449 cm^{-1} pozwoliło na odróżnienie pacjentów z białaczką i pancytopenią z czułości i specyficzności odpowiednio 68,89% i 75% ($\text{AUC}=0,7556$) oraz 80% i 90% ($\text{AUC}=0,88333$). Pozwala to założyć, iż ocena intensywności dla wymienionych 5 pików może potencjalnie zostać wykorzystana do wskazania ALL jako przyczyny pancytopenii w krwi obwodowej.

Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w analizie PCA i HCA. Analizując wykresy względem PC1 wyjaśniającej 42,44% wariancji danych wyjściowych, nie uwidoczniło klastrowania się wyników dla pacjentów z białaczką, ale zaobserwowano tendencję do klastrowania się względem dodatnich wartości PC1 wyników pacjentów z pancytopenią, które związane były z pikami charakterystycznymi dla drgań rozciągających C=O amidu I i drgań rozciągających C=C lipidów (1658 cm^{-1}), tyrozyny i fenyloalaniny (1604 cm^{-1}), drgań wahadłowych grup CH_3 i CH_2 lipidów oraz białek (1449 cm^{-1}), drgań deformacyjnych grup CH białek, zasad azotowych DNA i RNA oraz fenyloalaniny (1336 cm^{-1} i 1320 cm^{-1}) oraz glicerolu i cholesterolu (606 cm^{-1}) [97,165-166]. Z kolei wyniki pacjentów zdrowych w większości zlokalizowane były w obszarze wykresu odpowiadającemu wartościom dodatnim PC1, dla którego obciążenia powiązane były z zakresem ok. $1050\text{-}850\text{ cm}^{-1}$, dla którego obserwuje się piki przypisywane zarówno dla aminokwasów, zasad azotowych, białek i lipidów, a także z pikiem charakterystycznym dla tryptofanu (758 cm^{-1}) [96,97,105,165-166]. Analiza wykresu względem PC2 (21,29% wariancji) nie wnosi znaczących informacji i najprawdopodobniej komponent ten wyodrębnia zakresy widma w których występowały nieznaczne różnice związane ze zmiennością międzypersonalną, bądź które mogą być wynikiem występowania szumów. Gdy w analizie uwzględniono komponent 3 (10,77% wariancji) zaobserwowano tendencję do klastrowania się wyników dla pacjentów z anemią w obrębie wykresu odpowiadającemu ujemnym wartościom PC3, tłumaczonym przez dodatnie obciążenia, dla których charakterystyczny był pik opisywany dla tyrozyny i fenyloalaniny (1604 cm^{-1}) [96,100]. Otrzymane wyniki nie pozwoliły na stworzenie na ich podstawie modelu klasyfikacyjnego dla ALL.

Sprzeczne do moich wyniki uzyskali Gonzales-Solis i współ. którzy wykorzystując RS i PCA rozróżnili pacjentów zdrowych oraz pacjentów z białaczką analizując widmo surowicy z czułością i specyficznością sięgającą 100%, obserwując wyraźnie mniejszą intensywność widma surowicy pacjentów z białaczką dla pików przy

1654 cm^{-1} , 1603 cm^{-1} i 1338 cm^{-1} , a także dla innych pików, dla których w niniejszym badaniu nie stwierdzano istotnych statystycznie różnic m.in. przy 1447 cm^{-1} (drgania wahadłowe grup CH_3 , CH_2 , białka, lipidy), 1523 cm^{-1} (drgania rozciągające $\text{C}=\text{C}$ i $\text{C}-\text{N}$, beta-karoten), 1587 cm^{-1} (tyrozyna, białka). Należy zauważyć, iż dysponowali oni materiałem uzyskanym od pacjentów z trzema różnymi typami białaczki – AML, ALL i CLL, dla których rozróżnienia uzyskali również 100% czułość i specyficzność [99]. Da Silva i współ. wykorzystując RS oraz PCA i analizę dyskryminacyjną z użyciem częściowych najmniejszych kwadratów (ang. partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) wykazali mniejszą intensywność dla pików przy 1666 cm^{-1} , 1659 cm^{-1} , 1344 cm^{-1} , a dodatkowo obciążenia uzyskane dla analiz PCA potwierdziły istotność pików tj. 1609 cm^{-1} i 1007-1004 cm^{-1} w różnicowaniu pacjentów zdrowych i pacjentów z białaczką [96]. W innych badaniach, Lima i współ. za pomocą PCA i PLS-DA stworzyli model, który pozwalała na różnicowanie pacjentów zdrowych i pacjentów z białaczką z dokładnością 66%, czułością 99% i specyficznością 57%, a także pacjentów z białaczką (AML i ALL) od pacjentów z innymi nowotworami wieku dziecięcego z dokładnością, czułością i specyficznością wynoszącą odpowiednio 67%, 72% i 60% [95]. Istotne różnice stwierdzili oni dla pików przy 1004 cm^{-1} , 1002 cm^{-1} i 1443 cm^{-1} , ale także dla pików przy 622 cm^{-1} i 645 cm^{-1} powiązanych odpowiednio z drganiami skręcającymi grup $\text{C}-\text{C}$ fenyloalaniny i drganiami skręcającymi lub skręcającymi tyrozyny, dla których w mojej pracy nie odnotowano znaczących różnic. Istotne różnice dla pików przy 1655 cm^{-1} zauważyli także Bai. i współ., którzy analizowali osocze pacjentów zdrowych, pacjentów z CLL i chłoniakiem z dużych rozlanych limfocytów B (DLBCL), dla którego w porównaniu do grupy kontrolnej obserwowano zwiększoną intensywność w przypadku DLBCL, a zmniejszoną dla CLL [101].

Widma surowicy spektroskopii Ramana - markery prognostyczne

Uśrednione widma dla grup pacjentów z grupy wysokiego ryzyka i pacjentów spoza wysokiego ryzyka wykazywały podobną intensywność w niemal pełnym zakresie, z wyjątkiem 1450-1250 cm^{-1} przesunięcia Ramana, dla którego intensywność była wyższa dla uśrednionego widma grupy HR. Dla żadnego z analizowanych pików nie stwierdzono jednak różnicy w intensywności pomiędzy tymi dwoma grupami pacjentów,

a także nie stwierdzono istotnych przesunięć w położeniu pików, na podstawie czego można by stworzyć model klasyfikacyjny. Wyniki te są zbieżne z tymi uzyskanymi w analizach HCA i PCA, w której to analizując wykresy względem trzech komponentów wyjaśniających odpowiednio 51,35% (PC1), 15,67 % (PC2) i 15,16 % (PC3) wariancji wyjściowych danych spektralnych, zauważalne jest rozmieszczenie wyników dla grupy wysokiego wśród wyników pacjentów spoza tej grupy. Rozproszenie wyników dla grupy HR nie powiązano także z wykazywaniem czynników wczesnego wysokiego ryzyka i poziomem MRD. Jako, że nie dysponowano próbkami lizatu komórkowego dla pacjentów ze wznową oraz pacjenta, u którego odnotowano zgon, nie było możliwe przeprowadzenie analiz względem wymienionych danych klinicznych.

Widma lizatu komórkowego szpiku kostnego spektroskopii Ramana - markery diagnostyczne

Analizując widma ramanowskie szpiku, podobnie jak dla surowicy, intensywność pików porównano również bez uwzględnienia rodzaju zaburzenia hematologicznego. Gdy porównano intensywność pików pomiędzy grupą pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi i pacjentami z ALL istotną statystycznie różnicę stwierdzono dla pików charakterystycznego dla drgań rozciągających C=O amidu I-rzędowego białek (1657 cm^{-1} , $p=0,009841$), a także dla pików powiązanego z amidem III-rzędowym białek ($1248\text{-}1247\text{ cm}^{-1}$, $p=0,033208$) oraz dla pików przypisywanemu dla fenyloalaniny ($1003\text{-}1002\text{ cm}^{-1}$, $p=0,033883$). Czułość i specyficzność wyznaczone dla tych pików nie były obiecujące i wynosiły odpowiednio: 76,92% i 62,5% ($\text{AUC}=0,70252$), 52,38% i 59,38% ($\text{AUC}=0,47024$) oraz 60% i 78,13% ($\text{AUC}=0,66198$). Gdy uwzględniono rodzaj zaburzenia, tylko dla pików 1236 cm^{-1} (amid III, białka) obserwowano istotną statystycznie różnicę w intensywności widma dla grupy pacjentów z białaczką oraz pacjentów pancytopenią ($p=0,015237$, czułość 90%, specyficzność 80%, $\text{AUC}=0,88$). Zbieżne wyniki uzyskano przeprowadzając analizę PCA i HCA, w których to nie obserwuje się klastrowania wyników dla pacjentów z białaczką. Wyniki te rozproszone są wśród wyników dla pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi,

a jedynie wyniki dla pacjentów z pancytopenią grupowały się względem PC1 wyjaśniającej 52,59% wariancji wyjściowych danych, w zakresie jej dodatnich wartości, tłumaczone przez ujemne wyniki obciążeń, dla których przypisywane są piki charakterystyczne dla drgań rozciągających grup C-C tyrozyny i grup C=C tryptofanu (1620 cm^{-1}), drgań rozciągających grup C-N i zginających NH amidu II (1561 cm^{-1}) oraz pik powiązany z fenyloalaniną (1004 cm^{-1}).

Sprzeczne do opisanych wyżej wyniki uzyskali Manago i współ., którzy porównując widma komórek linii komórkowej MN60 z komórkami prawidłowych limfocytów B, stwierdzili zwiększoną intensywność dla komórek białaczkowych dla pików powiązanych z białkami i lipidami, w tym pik 1660 cm^{-1} , 1310 cm^{-1} , 1337 cm^{-1} i $1607\text{-}1617\text{ cm}^{-1}$ oraz pików w zakresie $1485 - 1420\text{ cm}^{-1}$. W innej pracy Manago i współ., w której analizowali trzy linie komórkowe B-ALL (RS4;11, REH i MN60) uzyskali podobne rezultaty obserwując obniżoną intensywność pików przypisywanych dla amidu III (1310 cm^{-1}), amidu I (1650 cm^{-1}), drgań grup C-H i C-C w zakresie $1485\text{-}1420\text{ cm}^{-1}$ i $1617\text{-}1607\text{ cm}^{-1}$ [167-168].

W swoim badaniach Chan i współ. [169] skutecznie rozróżnili prawidłowe i białaczkowe komórki, przy czym analizie poddano wyizolowane komórki. Podobnie jak w przypadku analiz FT-IR lizatu szpiku kostnego, jako jedną z prawdopodobnych przyczyn nieskuteczności analizy RS w moim badaniu należy rozważyć wpływ hemoglobiny uwolnionej z prekursorów erytrocytów. Największą intensywność piku obserwuje się w widmie hemoglobiny przy $1380\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$ przesunięcia Ramana. W moim badaniu zaobserwowano pik przy 1371 cm^{-1} w widmie lizatu komórkowego, który nie pojawiał się w widmie surowicy, a który może pochodzić od wolnej hemoglobiny [170]. Istnieją doniesienia, które bezpośrednio traktują o wpływie wolnej hemoglobiny jako istotnego czynnika utrudnianającego interpretację widm RS poprzez maskowanie istotnych zmian spektralnych [171-172].

Widma lizatu komórkowego szpiku kostnego spektroskopii Ramana - markery prognostyczne

Uśrednione widmo RS lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z grupy wysokiego wykazywało niższą intensywność w zakresie $1630\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$, jak również $960\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ i $630\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ w porównaniu do uśrednionego widma pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka. Nie wykazano jednak istotności statystycznej dla zaobserwowanych różnic, a także istotnych przesunień w położeniu pików. Wyniki te znajdują potwierdzenie na wykresach PCA i dendrogramach HCA, dla których obserwuje się rozmieszczenie wyników dla pacjentów z grupy wysokiego ryzyka wśród wyników pacjentów z grupy spoza wysokiego ryzyka.

Ograniczenia

Poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych i prognostycznych jest niezwykle ważne dla uzyskania dalszej poprawy wyników leczenia dzieci z ALL. Duża zmienność biologiczna i genetyczna ALL utrudnia wskazanie uniwersalnych i jednoznacznych markerów. Przedstawione badanie posiada pewne ograniczenia. Należą do nich m.in.:

- mała liczebność grupy badanej, co wynika z epidemiologii ALL i ogólnie, chorób nowotworowych u dzieci, które zaliczają się do chorób rzadkich i ultrarzadkich
- wynikająca także z epidemiologii mała liczebność grupy HR oraz mała liczba niepowodzeń leczenia (nawroty, zgony), która wynika ze skuteczności prowadzonego leczenia, także utrudnia analizę statystyczną widm spektralnych jako potencjalnych markerów prognostycznych
- brak możliwości uzyskania ze względów etycznych próbek szpiku kostnego od zdrowych dzieci powoduje, że uzyskane wyniki muszą zostać przede wszystkim odniesione do innych zaburzeń hematologicznych

- duża heterogenność profilu genetycznego w badanej grupie nie pozwoliła na analizę jego wpływu na budowę fizykochemiczną badanych komórek

Powyższe ograniczenia są przyczyną, że liczba badań nad wykorzystaniem spektroskopii wibracyjnej do diagnozowania, monitorowania i prognozowania przebiegu choroby u dzieci z ALL jest bardzo mała, a badane grupy pacjentów są także małe i heterogenne. Dlatego niniejsze badanie na 48 dzieciach z ALL jest największym i najbardziej kompleksowym badaniem oceniającym możliwość zastosowania spektroskopii wibracyjnej w tym nowotworze. Uzyskane wyniki są obiecujące i uzasadniają dalsze badania w tym kierunku. Na uwagę szczególnie zasługuje potencjalna możliwość wykorzystania różnic w składzie biochemicznym oraz budowie fizykochemicznej dzieci zdrowych i dzieci z różnymi chorobami hematologicznymi do opracowania szybkich i tanich testów przesiewowych. Ponadto uzyskane różnice w składzie fizykochemicznym prawidłowych komórek szpiku kostnego i blastów białaczkowych poszerzają wiedzę o zmianach molekularnych, jakie zachodzą w wyniku transformacji nowotworowej oraz progresji ALL, a także pokazują kierunki dalszych badań nad lepszym zrozumieniem patogenezy i biologii tego nowotworu. W przypadku potwierdzenia w dalszych badaniach zdolności dyskryminacyjnej spektroskopii Ramana w identyfikacji pacjentów z ALL, narzędzie to mogłoby wspierać proces diagnostyczny oparty na immunofenotypowaniu, a także ułatwiać na podstawie badania surowicy krwi decyzję o wykonaniu inwazyjnej procedury biopsji szpiku kostnego.

VI. Wnioski

1. Spektroskopia w podczerwieni i spektroskopia Ramana wykazują niski potencjał dla identyfikacji i konkretnych zmian molekularnych zachodzących w przebiegu ALL u dzieci. Niemniej jednak analiza widma FTIR krwi obwodowej ujawniła istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną (HC) a pacjentami z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC) i ALL (LEUK-PD) dla następujących pasm przy $1398\text{--}1396\text{ cm}^{-1}$, $1309\text{--}1306\text{ cm}^{-1}$, $1239\text{--}1238\text{ cm}^{-1}$, $1170\text{--}1168\text{ cm}^{-1}$ i $1103\text{--}1102\text{ cm}^{-1}$, którym odpowiadają m.in. drgania rozciągające grup $\text{C}=\text{O}$ (białka, kwasy tłuszczowe) i grup PO_2^- kwasów nukleinowych, fosfolipidów i białek fosforylowanych oraz drgania rozciągające grup $\text{C}-\text{N}$ i zginające w płaszczyźnie NH amidu III (białka). Świadczy to o możliwym wpływie schorzeń związanych ze zmianą składu komórkowego krwi, niezależnie od przyczyny, na skład fizykochemiczny osocza.
2. Struktura drugorzędowa białek nie różniła się istotnie w grupie kontrolnej oraz w grupach HEMC i LEUK-PD. Jedynie udział struktury nieuporządkowanej dla grup LEUK-PD i HEMC-E z minimum przy pozycji $1646\text{--}1644\text{ cm}^{-1}$ wykazał istotną różnicę ($\text{AUC}=0,89935$, cut-off: 19,40%, sens.= 85,71%, spec.=90,90%, $p=0,030408$), a dla struktury alfa-helisy z minimum przy $1661\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ dla różnicowania grup HEMC-W i LEUK-PD metryki te przyjmują wartość (cut-off 11,663% $\text{AUC}=0,77273$, sens.= 75%, spec.= 85,71%) ale udział nie różnił się w sposób istotny. Obydwa parametry mogą zostać potencjalnie wykorzystane dla modeli diagnostycznych identyfikujących ALL jako przyczynę anemii lub pancytopenii krwi obwodowej.
3. Analiza białek surowicy dzieci z ALL w spektroskopii FTIR wykazała istotną różnicę w udziale struktury beta-kartki z minimum w zakresie 1630 cm^{-1} pomiędzy grupami HR oraz non-HR ALL. U wszystkich pacjentów z grupy HR (9/9) udział tej struktury wynosił $< 31,9\%$, podczas gdy w grupie non-HRG tylko u 9 spośród 39. Metryki potencjalnego testu diagnostycznego różnicującego HR vs non-HR w oparciu o ten parametr to: $\text{AUC} = 0,85397$, sens.=100%, spec. = 65,71%. Poza tym nie zaobserwowano istotnych różnic w widmach FTIR i Ramana krwi obwodowej oraz szpiku kostnego u pacjentów z ALL wysokiego ryzyka vs ALL ryzyka standardowego i pośredniego.

4. Dla 5 zakresów widma spektroskopii Ramana dla surowicy krwi obwodowej (1658 cm^{-1} , 1449 cm^{-1} , 958 cm^{-1} , 944 cm^{-1} i 900 cm^{-1}) oraz w 1 zakresie widma lizatu komórek szpiku kostnego (1236 cm^{-1}) zaobserwowano różnice w intensywności pików pomiędzy grupą dzieci z pancytopenią w przebiegu ALL oraz pancytopenią z innych przyczyn ($\text{AUC}=0,7556\text{-}0,9444$, $\text{sens.}=68,89\text{-}86,67\%$, $\text{spec.}=75\text{-}100\%$). W przypadku potwierdzenia występowania powyższych różnic w badaniach na większych grupach pacjentów, mogłyby one zostać podstawą dla opracowania testów diagnostycznych opartych na spektroskopii Ramana. Co istotne, większość z tych różnic dotyczy krwi obwodowej, co daje potencjalnie możliwość szybkiej, przesiewowej diagnostyki pancytopenii u dzieci bez konieczności wykonywania badania inwazyjnego, jakim jest biopsja szpiku kostnego. Istotnym ograniczeniem uzyskanych wyników są małe liczebności poszczególnych grup badanych schorzeń, co wpłynęło na niską dokładność klasyfikacji opartych na wielowymiarowych testach statystycznych (PCA, HCA). Dlatego powyższe wnioski powinny zostać zweryfikowane w badaniach na dużych grupach pacjentów.

VII. Piśmiennictwo

1. You M, Xie Z, Zhang N i współ. Signaling pathways in cancer metabolism: mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 May 10;8(1):196.
2. Szala S. Komórki mikrośrodowiska nowotworowego: cel terapii przeciwnowotworowej. *Nowotowory*, Number 6, 633–645.
3. Na podstawie: World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Childhood Cancer w: <https://www.iarc.who.int/cancer-type/childhood-cancer/>
4. Cancer incidence and mortality in Poland in 2020. *Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego NOWOTWORY* 2023, tom 8, nr 3, 167–183.
5. Mess E, Misiąg W, Klaszczyk T, Kryś K. Depressive and Anxiety Disorders of Parents of Children with Cancer. *J Clin Med.* 2022 Sep 26;11(19):5670
6. Huang J, Chan SC, Ngai CH, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE 3rd, Xu W, Zheng ZJ, Elcarte E, Withers M, Wong MCS; NCD Global Health Research Group, Association of Pacific Rim Universities (APRU). Global incidence, mortality and temporal trends of cancer in children: A joinpoint regression analysis. *Cancer Med.* 2023 Jan;12(2):1903-1911.
7. Alibek K, Mussabekova A, Kakpenova A i współ. Childhood cancers: what is a possible role of infectious agents? *Infect Agent Cancer.* 2013 Dec 10;8(1):48.
8. Cao J, An Q, Wang L. Pediatric sarcomas. *Oncol Lett.* 2018 Feb;15(2):1397-1402. doi: 10.3892/ol.2017.7467. Epub 2017 Nov 21. Retraction in: *Oncol Lett.* 2018 Apr;15(4):5391.
9. Zekri W, Yacoub DM, Ibrahim A, Madney Y. Relapsed Wilms' tumor in pediatric patients: challenges in low- to middle-income countries-a single-center experience. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2020 May 1;32(1):21.
10. Agarwal S. Pediatric Cancers: Insights and Novel Therapeutic Approaches. *Cancers (Basel).* 2023 Jul 8;15(14):3537.
11. Méndez-López LF. Revisiting Epithelial Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 4;23(13):7437.
12. Kattner P, Strobel H, Khoshnevis N i współ. Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 2019 Dec;38(4):673-682.

13. Erdmann F, Frederiksen LE, Bonaventure A i współ. Childhood cancer: Survival, treatment modalities, late effects and improvements over time. *Cancer Epidemiol.* 2021 Apr;71(Pt B):101733.
14. He L, Long LR, Antani S, Thoma GR. Histology image analysis for carcinoma detection and grading. *Comput Methods Programs Biomed.* 2012 Sep;107(3):538-56.
15. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia, *Journal of Immunological Methods*, Volume 243, Issues 1–2, Pages 59-75.
16. Balan V, Mihai C-T, Cojocaru F-D i współ. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials.* 2019; 12(18):2884.
17. Lustosa de Sousa DW, de Almeida Ferreira FV, Cavalcante Félix FH, de Oliveira Lopes MV. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2015 Jul-Aug;37(4):223-9.
18. Chennamaneni R, Gundeti S, Konatam ML, Bala S, Kumar A, Srinivas L. Impact of cytogenetics on outcomes in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *South Asian J Cancer.* 2018 Oct-Dec;7(4):263-266.
19. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (PDQ®): Patient Version. 2024 Nov 7. W: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-.
20. Chen B, Jiang L, Zhong ML i współ. Identification of fusion genes and characterization of transcriptome features in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115(2):373-378.
21. You MJ, Medeiros LJ, Hsi ED. T-lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2015 Sep;144(3):411-22.
22. Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood.* 2017 Mar 2;129(9):1113-1123.
23. Romiszewska M, Malinowska I. Zaburzenia genetyczne u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, ich znaczenie kliniczne i terapeutyczne. *Acta Haematologica Polonica.* 48 (2017) 300-307.
24. Górecki M, Kozioł I, Kopystiecka A, Budzyńska J, Zawitkowska J, Lejman M. Updates in KMT2A Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biomedicines.* 2023 Mar 8;11(3):821.
25. Jia M, Hu BF, Xu XJ, Zhang JY, Li SS, Tang YM. Clinical features and prognostic impact of TCF3-PBX1 in childhood acute lymphoblastic leukemia: A single-center

- retrospective study of 837 patients from China. *Curr Probl Cancer*. 2021 Dec;45(6):100758.
26. Cario G, Leoni V, Conter V, Baruchel A, Schrappe M, Biondi A. BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia in childhood and targeted therapy. *Haematologica*. 2020 Sep 1;105(9):2200-2204.
27. Pastorczak A, Młynarski W, Szczepański T. Prognostyczne i terapeutyczne implikacje zaburzeń genetycznych w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej. *Hematologia* 2011, tom 2 nr 1 43-50.
28. Pui CH, Roberts KG, Yang JJ, Mullighan CG. Philadelphia Chromosome-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017 Aug;17(8):464-470.
29. Carroll AJ, Shago M, Mikhail FM i współ. Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer Genet*. 2019 Oct;238:62-68.
30. Hakeem A, Shiekh AA, Bhat GM, Lone AR. Prognostification of ALL by Cytogenetics. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015 Sep;31(3):322-31.
31. Shahriari M, Shakibazad N, Haghpanah S, Ghasemi K. Extramedullary manifestations in acute lymphoblastic leukemia in children: a systematic review and guiFne-based approach of treatment. *Am J Blood Res*. 2020 Dec 15;10(6):360-374.
32. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int*. 2018 Jan;60(1):4-12.
33. Jensen E, Kristensen JK, Bjerglund RT, Johnsen SP, Thomsen JL. The pathway and characteristics of patients with non-specific symptoms of cancer: a systematic review. *BMC Cancer*. 2022 May 23;22(1):574.
34. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017 Jun 30;7(6):e577.
35. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014 Nov 1;6(1):e2014073.
36. Na podstawie: AIEOP-BFM 2017 POLAND - Wspólny protokół leczenia dzieci i młodzieży z ostrą białaczką limfoblastyczną. Randomizowane badanie III fazy prowadzone w porozumieniu z grupą badawczą AIEOP-BFM.
37. Na podstawie: AIEOP-BFM-ALL-2009 - Wspólny protokół leczenia dzieci i młodzieży z ostrą białaczką limfoblastyczną. Ostatnia modyfikacja: 2018/05/31.

38. Oshima K, Khiabanian H, da Silva-Almeida AC i współ. Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 (40) 11306-11311.
39. Kakaje A, Alhalabi MM, Ghareeb A i współ. Rates and trends of childhood acute lymphoblastic leukaemia: an epidemiology study. *Sci Rep.* 2020 Apr 21;10(1):6756.
40. He YY, Wu XJ, Zhou DH i współ. A Nomogram for Predicting Event-Free Survival in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Multicenter Retrospective Study. *Front Oncol.* 2022 Mar 29;12:854798.
41. Lee JW, Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean J Pediatr.* 2017 May;60(5):129-137.
42. Inaba H, Pui CH. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1096-106.
43. Della Starza I, Chiaretti S, De Propriis MS i współ. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances. *Front Oncol.* 2019 Aug 7;9:726.
44. Cooper SL, Brown PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 2015 Feb;62(1):61-73.
45. Fousek K, Watanabe J, Joseph SK i współ. CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression. *Leukemia.* 2021 Jan;35(1):75-89.
46. Sheykhhasan M, Manoochehri H, Dama P. Use of CAR T-cell for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment: a review study. *Cancer Gene Ther.* 2022 Aug;29(8-9):1080-1096.
47. Lejman M, Kuśmierczuk K, Bednarz K, Ostapińska K, Zawitkowska J. Targeted Therapy in the Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia-Therapy and Toxicity Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 11;22(18):9827.
48. Hołyst, R., Poniewierski, A. Internal Energy, Work and Heat. In: *Thermodynamics for Chemists, Physicists and Engineers* (2012) w: Springer, Dordrecht.
49. Keresztury, G. Raman Spectroscopy: Theory w: *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 2006 (Online, John Wiley & Sons, Ltd)
50. Hackshaw KV, Miller JS, Aykas DP, Rodriguez-Saona L. Vibrational Spectroscopy for Identification of Metabolites in Biologic Samples. *Molecules.* 2020 Oct 15;25(20):4725.
51. Petibois C, Délérís G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Trends Biotechnol.* 2006 Oct;24(10):455-62.

52. Bunaciu AA, Hoang VD, Aboul-Enein HY. Applications of FT-IR spectrophotometry in cancer diagnostics. *Crit Rev Anal Chem.* 2015;45(2):156-65.
53. Bunaciu AA, Hoang VD, Aboul-Enein HY. Vibrational Micro-Spectroscopy of Human Tissues Analysis: Review. *Crit Rev Anal Chem.* 2017 May 4;47(3):194-203.
54. Su KY, Lee WL. Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Cancer Screening and Diagnostic Tool: A Review and Prospects. *Cancers (Basel).* 2020 Jan 1;12(1):115.
55. Lilo T, Morais CLM, Shenton C, Ray A, Gurusinghe N. Revising Fourier-transform infrared (FT-IR) and Raman spectroscopy towards brain cancer detection. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022 Jun;38:102785.
56. Finlayson D, Rinaldi C, Baker MJ. Is Infrared Spectroscopy Ready for the Clinic? *Anal Chem.* 2019 Oct 1;91(19):12117-12128.
57. Tiernan H, Byrne B, Kazarian SG. ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2020 Nov 5;241:118636.
58. Khan SA, Khan SB, Khan LU, Farooq A, Akhtar K, Asiri AM. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. W: Sharma S. (eds) *Handbook of Materials Characterization.* Springer, Cham (2018).
59. Usha S. Fourier transform infrared spectroscopy: A power full method for creating fingerprint of molecules of nanomaterials. *Journal of Molecular Structure, Volume 1322, Part 2, 2025, 140454.*
60. Fadlelmoula A, Pinho D, Carvalho VH, Catarino SO, Minas G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines (Basel).* 2022 Jan 26;13(2):187.
61. Orlando A, Franceschini F, Muscas C i współ. A Comprehensive Review on Raman Spectroscopy Applications. *Chemosensors.* 2021; 9(9):262.
62. Brzózka P. Spektroskopia Ramana: nowoczesna technika w diagnostyce medycznej i analizie biochemicznej. *Prospect. Pharm. Sci.* 4. 27-36 (2013).
63. Devpura S, Barton KN, Brown SL i współ. Vision 20/20: the role of Raman spectroscopy in early stage cancer detection and feasibility for application in radiation therapy response assessment. *Med Phys.* 2014 May;41(5):050901.
64. Auner GW, Koya SK, Huang C i współ. Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer Metastasis Rev.* 2018 Dec;37(4):691-717.

65. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016 Apr 13;374(2065):20150202.
66. Kimes PK, Liu Y, Neil Hayes D, Marron JS. Statistical significance for hierarchical clustering. *Biometrics.* 2017 Sep;73(3):811-821.
67. Dritsa V. (2012). FT-IR Spectroscopy in Medicine w: *Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences.* Theophanides T. (Ed.). InTech.
68. Capriel P, Beck T, Borchert H, Gronholz J, Zachmann G. Hydrophobicity of the organic matter in arable soils. *Soil Biol. Biochem* 27 (1995): 1453-1458.
69. Maity P, Kasisomayajula SV, Parameswaran V, Basu S, Gupta N. Improvement in surface degradation properties of polymer composites due to pre-processed nanometric alumina filler. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 15, no. 1, pp. 63-72, February 2008,
70. Baker M, Gazi E, Brown M i współ. FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. *Br J Cancer* 99, 1859–1866 (2008).
71. Igci N, Sharafi P, Demiralp DO, Demiralp CO, Yuce A, Emre SD. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to biomolecular profiling of cultured fibroblast cells from Gaucher disease patients: A preliminary investigation. *Adv Clin Exp Med.* 2017 Oct;26(7):1053-1061.
72. Medipally DKR, Nguyen TNQ, Bryant J i współ. Monitoring Radiotherapeutic Response in Prostate Cancer Patients Using High Throughput FTIR Spectroscopy of Liquid Biopsies. *Cancers (Basel).* 2019 Jul 2;11(7):925.
73. Miller LM, Bourassa MW, Smith RJ. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Oct;1828(10):2339-46.
74. Zhang J, Li B, Wang Q i współ. Application of Fourier transform infrared spectroscopy with chemometrics on postmortem interval estimation based on pericardial fluids. *Sci Rep.* 2017 Dec 21;7(1):18013.
75. Sadat A, Joye IJ. Peak Fitting Applied to Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopic Analysis of Proteins. *Applied Sciences.* 2020; 10(17):5918.
76. Cameron JM, Rinaldi C, Butler HJ i współ. Stratifying Brain Tumour Histological Sub-Types: The Application of ATR-FTIR Serum Spectroscopy in Secondary Care. *Cancers (Basel).* 2020 Jun 27;12(7):1710

77. Mehra S, Chadha P. Alterations in structure of biomolecules using ATR-FTIR and histopathological variations in brain tissue of *Channa punctatus* exposed to 2Naphthalene sulfonate. *Toxicol Res (Camb)*. 2020 Aug 8;9(4):530-536.
78. Pan SW, Lu HC, Lo JI i współ. Using an ATR-FTIR Technique to Detect Pathogens in Patients with Urinary Tract Infections: A Pilot Study. *Sensors (Basel)*. 2022 May 10;22(10):3638.
79. Oleszko A, Hartwich J, Wójtowicz A, Gąsior-Głogowska M, Huras H, Komorowska M. Comparison of FTIR-ATR and Raman spectroscopy in determination of VLDL triglycerides in blood serum with PLS regression. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2017 Aug 5;183:239-246.
80. Cai S, Singh BR. Identification of beta-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophys Chem*. 1999 Jul 19;80(1):7-20.
81. Pevsner A, Diem M. Infrared Spectroscopic Studies of Major Cellular Components. Part II: The Effect of Hydration on the Spectra of Nucleic Acids. *Appl. Spectrosc*. 55:1502-1505 (2001).
82. Malek K, Wood B, Bamberg K. FTIR Imaging of Tissues: Techniques and Methods of Analysis. W: Baranska, M. (eds) *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine. Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*, vol 14. Springer, Dordrecht (2014).
83. Dovbeshko GI, Chegel VI, Gridina NY i współ. Surface enhanced IR absorption of nucleic acids from tumor cells: FTIR reflectance study. *Biopolymers*. 2002;67(6):470-86. doi: 10.1002/bip.10165. PMID: 12209454.
84. Uckermann O, Juratli TA, Galli R i współ. Optical Analysis of Glioma: Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Reveals the IDH1 Mutation Status. *Clin Cancer Res*. 2018 Jun 1;24(11):2530-2538.
85. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am. J. Cancer Res*. 2012, 2, 1–21.
86. Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev*. 2008, 43, 134–179.
87. Blat A, Dybas J, Chrabaszcz K i współ. FTIR, Raman and AFM characterization of the clinically valid biochemical parameters of the thrombi in acute ischemic stroke. *Sci Rep*. 2019 Oct 29;9(1):15475.

88. Rehman I, Farooq M, Botelho S. Biochemistry, Secondary Protein Structure. 2022 Dec 11. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–.
89. Al-Kelani M, Buthelezi N. Advancements in medical research: Exploring Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy for tissue, cell, and hair sample analysis. *Skin Res Technol*. 2024 Jun;30(6):e13733.
90. Zupančič B, Umek N, Ugwoke CK, Cvetko E, Horvat S, Grdadolnik J. Application of FTIR Spectroscopy to Detect Changes in Skeletal Muscle Composition Due to Obesity with Insulin Resistance and STZ-Induced Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 18;23(20):12498.
91. Erukhimovitch V, Talyshinsky M, Souprun Y, Huleihel M. Spectroscopic characterization of human and mouse primary cells, cell lines and malignant cells. *Photochem Photobiol*. 2002 Oct;76(4):446-51.
92. Zhang F, Huang Q. Characterization of Z-DNA by Infrared Spectroscopy. *Methods Mol Biol*. 2023;2651:53-58.
93. Auner AW, Kast RE, Rabah R, Poulik JM, Klein MD. Conclusions and data analysis: a 6-year study of Raman spectroscopy of solid tumors at a major pediatric institute. *Pediatr Surg Int*. 2013 Feb;29(2):129-40.
94. Delfino I, Ricciardi V, Manti L, Lasalvia M, Lepore M. Multivariate Analysis of Difference Raman Spectra of the Irradiated Nucleus and Cytoplasm Region of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Sensors*. 2019; 19(18):3971.
95. Lima AMF, Daniel CR, Pacheco MTT, de Brito PL, Silveira L Jr. Discrimination of leukemias and non-leukemic cancers in blood serum samples of children and adolescents using a Raman spectral model. *Lasers Med Sci*. 2022 Dec 24;38(1):22.
96. da Silva AM, de Siqueira E, Oliveira FSA, de Brito PL, Silveira L. Spectral model for diagnosis of acute leukemias in whole blood and plasma through Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2018 Oct;23(10):1-11.
97. Leszczenko P, Borek-Dorosz A, Nowakowska AM i współ. Towards Raman-Based Screening of Acute Lymphoblastic Leukemia-Type B (B-ALL) Subtypes. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 31;13(21):5483.
98. Zhou Y, Xu Y, Hou X, Daozong X. Raman Analysis of Lipids in Cells: Current Applications and Future Prospects, *J. Pharm. Anal.*, 2024, 101136.

99. González-Solís JL, Martínez-Espinosa JC, Salgado-Román JM, Palomares-Anda P. Monitoring of chemotherapy leukemia treatment using Raman spectroscopy and principal component analysis. *Lasers Med Sci.* 2014 May;29(3):1241-9.
100. Chan JW, Taylor DS, Thompson DL. The effect of cell fixation on the discrimination of normal and leukemia cells with laser tweezers Raman spectroscopy. *Biopolymers.* 2009 Feb;91(2):132-9.
101. Bai Y, Yu Z, Yi S, Yan Y, Huang Z, Qiu L. Raman spectroscopy-based biomarker screening by studying the fingerprint characteristics of chronic lymphocytic leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. *J Pharm Biomed Anal.* 2020 Oct 25;190:113514.
102. Polis B, Imiela A, Polis L, Abramczyk H. Raman spectroscopy for medulloblastoma. *Childs Nerv Syst.* 2018 Dec;34(12):2425-2430.
103. Sigle M, Rohlfing AK, Kenny M i współ. Translating genomic tools to Raman spectroscopy analysis enables high-dimensional tissue characterization on molecular resolution. *Nat Commun.* 2023 Sep 19;14(1):5799.
104. Harris G, Stickland CA, Lim M, Goldberg Oppenheimer P. Raman Spectroscopy Spectral Fingerprints of Biomarkers of Traumatic Brain Injury. *Cells.* 2023 Nov 8;12(22):2589.
105. Bouzy P, O'Grady S, Madupalli H i współ. A time-course Raman spectroscopic analysis of spontaneous in vitro microcalcifications in a breast cancer cell line. *Lab Invest.* 2021 Sep;101(9):1267-1280.
106. Kourouski D, Postiglione T, Deckert-Gaudig T, Deckert V, Lednev IK. Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens. *Analyst.* 2013 Mar 21;138(6):1665-73.
107. Elumalai S, Managó S, De Luca AC. Raman Microscopy: Progress in Research on Cancer Cell Sensing. *Sensors (Basel).* 2020 Sep 27;20(19):5525.
108. D'Acunto M, Gaeta R, Capanna R, Franchi A. Contribution of Raman Spectroscopy to Diagnosis and Grading of Chondrogenic Tumors. *Sci Rep.* 2020 Feb 7;10(1):2155.
109. Unal M, Ahmed R, Mahadevan-Jansen A, Nyman JS. Compositional assessment of bone by Raman spectroscopy. *Analyst.* 2021 Dec 6;146(24):7464-7490.
110. Carlomagno C, Giannasi C, Niada S, Bedoni M, Gualerzi A, Brini AT. Raman Fingerprint of Extracellular Vesicles and Conditioned Media for the Reproducibility Assessment of Cell-Free Therapeutics. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 Apr 13;9:640617.

111. Fosca M, Basoli V, Della Bella E i współ. Raman Spectroscopy in Skeletal Tissue Disorders and Tissue Engineering: Present and Prospective. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022 Oct;28(5):949-965.
112. Rocha RA, Fox JM, Genever PG, Hancock Y. Biomolecular phenotyping and heterogeneity assessment of mesenchymal stromal cells using label-free Raman spectroscopy. *Sci Rep.* 2021 Feb 23;11(1):4385.
113. Jin L, Dai N, Yang X. Preliminary study on the optical diagnosis of orbital rhabdomyosarcoma by Raman spectroscopy. *Sci Rep* 14, 9735 (2024).
114. Ruggiero A, Skinner R, Khaled Zekri WZ. Editorial: Adverse and Toxic Effects of Childhood Cancer Treatments. *Front Oncol.* 2021 Nov 3;11:795664.
115. Chemaitilly W, Sklar CA. Childhood Cancer Treatments and Associated Endocrine Late Effects: A Concise Guide for the Pediatric Endocrinologist. *Horm Res Paediatr.* 2019;91(2):74-82.
116. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2020 Nov 1;105(11):2524-2539.
117. Rheingold SR, Bhojwani D, Ji L i współ. Determinants of survival after first relapse of acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia.* 2024 Nov;38(11):2382-2394.
118. Wills H, Kast R, Stewart C i współ. Raman spectroscopy detects and distinguishes neuroblastoma and related tissues in fresh and (banked) frozen specimens. *J Pediatr Surg.* 2009 Feb;44(2):386-91.
119. Zúñiga WC, Jones V, Anderson SM i współ. Raman Spectroscopy for Rapid Evaluation of Surgical Margins during Breast Cancer Lumpectomy. *Sci Rep* 9, 14639 (2019).
120. Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 30;102(35):12371-6.
121. Hanna K, Krzoska E, Shaaban AM, Muirhead D, Abu-Eid R, Speirs V. Raman spectroscopy: current applications in breast cancer diagnosis, challenges and future prospects. *Br J Cancer.* 2022 May;126(8):1125-1139.
122. Elmi F, Movaghar AF, Elmi MM, Alinezhad H, Nikbakhsh N. Application of FT-IR spectroscopy on breast cancer serum analysis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2017 Dec 5;187:87-91.

123. Sitnikova VE, Kotkova MA, Nosenko TN, Kotkova TN, Martynova DM, Uspenskaya MV. Breast cancer detection by ATR-FTIR spectroscopy of blood serum and multivariate data-analysis. *Talanta*. 2020 Jul 1;214:120857.
124. Kluz-Barłowska M, Kluz T, Paja W i współ. FT-Raman data analyzed by multivariate and machine learning as a new methods for detection spectroscopy marker of platinum-resistant women suffering from ovarian cancer. *Sci Rep*. 2023 Nov 26;13(1):20772.
125. Chen F, Sun C, Yue Z i współ. Screening ovarian cancers with Raman spectroscopy of blood plasma coupled with machine learning data processing. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2022 Jan 15;265:120355.
126. Li L, Wu J, Yang L, Wang H, Xu Y, Shen K. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: An Innovative Method for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Cancer Manag Res*. 2021 Mar 12;13:2389-2399.
127. Fousková M, Vališ J, Synytsya A i współ. In vivo Raman spectroscopy in the diagnostics of colon cancer. *Analyst*. 2023 May 30;148(11):2518-2526.
128. Tiwari S, Falahkheirkhah K, Cheng G, Bhargava R. Colon Cancer Grading Using Infrared Spectroscopic Imaging-Based Deep Learning. *Appl Spectrosc*. 2022 Apr;76(4):475-484.
129. Jenkins CA, Lewis PD, Dunstan PR, Harris DA. Role of Raman spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2016 May 15;8(5):427-38.
130. Liu Y, Chen C, Xie X, Lv X, Chen C. For cervical cancer diagnosis: Tissue Raman spectroscopy and multi-level feature fusion with SENet attention mechanism. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2023 Dec 15;303:123147.
131. Shaikh R, Daniel A, Lyng FM. Raman Spectroscopy for Early Detection of Cervical Cancer, a Global Women's Health Issue-A Review. *Molecules*. 2023 Mar 9;28(6):2502.
132. Xue Y, Zheng X, Wu G, Wang J. Rapid diagnosis of cervical cancer based on serum FTIR spectroscopy and support vector machines. *Lasers Med Sci*. 2023 Nov 25;38(1):276.
133. Łach K, Kowal A, Perek-Polnik M i współ. Infrared Spectroscopy as a Potential Diagnostic Tool for Medulloblastoma. *Molecules*. 2023 Mar 5;28(5):2390.
134. Lieber CA, Kabeer MH. Characterization of pediatric Wilms' tumor using Raman and fluorescence spectroscopies. *J Pediatr Surg*. 2010 Mar;45(3):549-54.

135. Serdiuk V, Shogren KL, Kovalenko T i współ. Detection of macromolecular inversion-induced structural changes in osteosarcoma cells by FTIR microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 2020 Oct;412(26):7253-7262.
136. Li J, Qin J, Zhang X i współ. Label-free Raman imaging of live osteosarcoma cells with multivariate analysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019 Aug;103(16):6759-6769.
137. Chiang YH, Wu SH, Kuo YC, Chen HF, Chiou A, Lee OK. Raman spectroscopy for grading of live osteosarcoma cells. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Apr 18;6(1):81.
138. Kast R, Rabah R, Wills H, Poulik J, Auner GW, Klein MD. Differentiation of small round blue cell tumors using Raman spectroscopy. *J Pediatr Surg.* 2010 Jun;45(6):1110-4..
139. Chaber R, Arthur CJ, Łach K i współ. Predicting Ewing Sarcoma Treatment Outcome Using Infrared Spectroscopy and Machine Learning. *Molecules.* 2019 Mar 19;24(6):1075.
140. Chaber R, Arthur CJ, Depciuch J i współ. Distinguishing Ewing sarcoma and osteomyelitis using FTIR spectroscopy. *Sci Rep.* 2018 Oct 10;8(1):15081.
141. Chaber R, Łach K, Arthur CJ i współ. Prediction of Ewing Sarcoma treatment outcome using attenuated tissue reflection FTIR tissue spectroscopy. *Sci Rep.* 2018 Aug 17;8(1):12299.
142. Chaber R, Łach K, Szmuc K i współ. Application of infrared spectroscopy in the identification of Ewing sarcoma: A preliminary report. *Infrared Phys Technol*, 83, 200-205 (2017).
143. Chaber R, Kowal A, Jakubczyk P i współ. A Preliminary Study of FTIR Spectroscopy as a Potential Non-Invasive Screening Tool for Pediatric Precursor B Lymphoblastic Leukemia. *Molecules.* 2021 Feb 22;26(4):1174.
144. Sheng D, Liu X, Li W, Wang Y, Chen X, Wang X. Distinction of leukemia patients' and healthy persons' serum using FTIR spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013 Jan 15;101:228-32.
145. Ramesh J, Kapelushnik J, Mordehai J i współ. Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy. *J Biochem Biophys Methods.* 2002 May 31;51(3):251-61.
146. Mogensen PR, Grell K, Schmiegelow K i współ. Dyslipidemia at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One.* 2020 Apr 6;15(4):e0231209.

147. Jin Y, Tan Y, Wu J i współ. Lipid droplets: a cellular organelle vital in cancer cells. *Cell Death Discov.* 9, 254 (2023).
148. Tucci J, Chen T, Margulis K i współ. Adipocytes Provide Fatty Acids to Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Front Oncol.* 2021 Apr 22;11:665763.
149. Khan W, Augustine D, Rao RS i współ. Lipid metabolism in cancer: A systematic review. *J Carcinog.* 2021 May 6;20:4.
150. Cruz ALS, Barreto EA, Fazolini NPB, Viola JPB, Bozza PT. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis.* 2020 Feb 6;11(2):105.
151. Pilátová MB, Solárová Z, Mezencev R, Solár P. Ceramides and their roles in programmed cell death. *Adv Med Sci.* 2023 Sep;68(2):417-425.
152. Iessi E, Marconi M, Manganelli V i współ. On the role of sphingolipids in cell survival and death. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2020;351:149-195.
153. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech.* 2013 Nov;6(6):1353-63.
154. Thadikkaran L, Siegenthaler MA, Crettaz D, Queloz PA, Schneider P, Tissot JD. Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics.* 2005 Aug;5(12):3019-34. doi: 10.1002/pmic.200402053. PMID: 16041673.
155. Zelig U, Mordechai S, Shubinsky G i współ. Pre-screening and follow-up of childhood acute leukemia using biochemical infrared analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Sep;1810(9):827-35.
156. Schultz CP, Liu KZ, Johnston JB, Mantsch HH. Differentiation of Leukemic from Normal Human Lymphocytes by FT-IR Spectroscopy and Cluster Analysis. *Leukemia Res.* 1996;20:649–655.
157. Benedetti E, Palatresi MP, Vergamini P, Papineschi F, Spremolla G. New Possibilities of Research in Chronic Lymphatic Leukemia by Means of Fourier Transform-Infrared Spectroscopy—II. *Leuk. Res.* 1985;9:1001–1008.
158. Benedetti E, Papineschi F, Vergamini P, Consolini R, Spremolla G. Analytical Infrared Spectral Differences between Human Normal and Leukaemic Cells (CLL)—I. *Leuk. Res.* 1984;8:483–489.
159. Cheng PN, Pham JD, Nowick JS. The supramolecular chemistry of β -sheets. *J Am Chem Soc.* 2013 Apr 17;135(15):5477-92.

160. Rasuleva K, Elamurugan S, Bauer A i współ. β -Sheet Richness of the Circulating Tumor-Derived Extracellular Vesicles for Noninvasive Pancreatic Cancer Screening. *ACS Sens.* 2021 Dec 24;6(12):4489-4498.
161. Izadirad M, Huang Z, Jafari F i współ. Extracellular Vesicles in Acute Leukemia: A Mesmerizing Journey With a Focus on Transferred microRNAs. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Oct 6;9:766371.
162. Polakovs M, Mironova-Ulmane N, Kurjane N, Reinholds E, Grube M. Micro-Raman scattering and infrared spectra of hemoglobin, *Proc. SPIE 7142*, Sixth International Conference on Advanced Optical Materials and Devices (AOMD-6), 714214 (2 December 2008)
163. Aksoy C, Kaya FA, Kuşkonmaz BB, Uçkan D, Severcan F. Structural investigation of donor age effect on human bone marrow mesenchymal stem cells: FTIR spectroscopy and imaging. *Age (Dordr).* 2014;36(4):9691.
164. Lykina A, Artemyev D, Bratchenko I. Analysis of albumin Raman scattering registration efficiency from different volume and shape cuvette. *J. Biomed. Photonics Eng.* 3.020309 (2017).
165. Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. *Br J Cancer.* 2006 May 22;94(10):1460-4.
166. Majzner K, Deckert-Gaudig T, Baranska M, Deckert V. DOX-DNA Interactions on the Nanoscale: In Situ Studies Using Tip-Enhanced Raman Scattering. *Anal Chem.* 2024 Jun 4;96(22):8905-8913.
167. Managò S, Mirabelli P, Napolitano M, Zito G, De Luca AC. Raman detection and identification of normal and leukemic hematopoietic cells. *J Biophotonics.* 2018 May;11(5):e201700265.
168. Managò S, Valente C, Mirabelli P i współ. A reliable Raman-spectroscopy-based approach for diagnosis, classification and follow-up of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep.* 2016 Apr 19;6:24821.
169. Chan JW, Taylor DS, Zwerdling T, Lane SM, Ihara K, Huser T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophys J.* 2006 Jan 15;90(2):648-56.
170. Matthiae M, Zhu X, Marie R, Kristensen A. In-line whole blood fractionation for Raman analysis of blood plasma. *Analyst*, 144, 602-610 (2019).

171. Atkins CG, Buckley K, Blades MW, Turner RFB. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components. *Appl Spectrosc.* 2017 May;71(5):767-793.
172. Medipally DKR, Cullen D, Untereiner V i współ. Effect of hemolysis on Fourier transform infrared and Raman spectra of blood plasma. *J Biophotonics.* 2020 Jul;13(7):e201960173.

Streszczenie

Wstęp: Najczęściej diagnozowanym nowotworem i typem białaczki wśród dzieci jest ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) odpowiadająca za niemal jedną trzecią wszystkich przypadków nowotworów wśród dzieci. Szczyt zachorowań w tej grupie pacjentów obserwuje się między 1 i 4 rokiem życia, przy czym nieznacznie częściej diagnozuje się ALL wśród chłopców. Osiągnięcie współczynników przeżywalności sięgających 90% to efekt wielośrodkowych badań i wypracowania schematów terapeutycznych opartych o ocenę czynników rokowniczych, szczególnie kluczowych dla zwiększenia efektywności leczenia problematycznej postaci opornej i nawrotowej ALL jak i minimalizacji odległych skutków ubocznych chemioterapii. Istotne dla osiągnięcia odpowiednich efektów leczenia jest jak najszybsze rozpoznanie ALL i wdrożenie odpowiedniej formy chemioterapii dostosowanej do profilu molekularnego zmienionych nowotworowo komórek prekursorów limfoidalnych. Zarówno ocena cytologiczna szpiku kostnego, badanie immunofenotypu i zmian genetycznych wymagają dużego nakładu czasu, środków i doświadczenia osób wykonujących badanie, a sama biopsja jako zabieg inwazyjny, przeprowadzany w stanie głębokiej sedacji lub znieczulenia ogólnego niesie za sobą ryzyko powikłań. Techniki spektroskopii wibracyjnej – spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FT-IR) i spektroskopia Ramana (RS) pozwalają na pozyskanie informacji o strukturze i kompozycji biochemicznej analizowanego materiału, którym mogą być zarówno komórki, tkanki jak i płyny biologiczne, badając oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z budującymi je cząstkami i atomami. Ich szybki i nieinwazyjny charakter sprawia, iż zyskują coraz większą uwagę jako nowe potencjalne narzędzia w medycynie, które śledząc zmiany zachodzących między innymi w przebiegu chorób metabolicznych, neurodegeneracyjnych, jak również chorób nowotworowych, będą mogły zostać wykorzystane do ich rozpoznawania jak i monitorowania skuteczności terapii.

Cel pracy: Wykorzystano spektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera oraz spektroskopię Ramana dla analizy spektralnej surowicy krwi obwodowej i lizatu komórkowego szpiku kostnego w celu śledzenia zmian molekularnych w przebiegu ALL u dzieci, które potencjalnie mogą zostać wykorzystane w diagnostyce medycznej jako markery diagnostyczne i prognostyczne. Zbadano występowanie różnic w widmach FT-IR i widmach Ramana surowicy i lizatu komórkowego szpiku kostnego pomiędzy

pacjentami pediatrycznymi z ALL, pacjentami zdrowymi bądź z zaburzeniami hematologicznymi innymi niż choroba nowotworowa. Uzyskane dane spektralne analizowano zestawiono także z danymi klinicznymi którymi dysponowano dla pacjentów z ALL powiązanych z przynależnością do danej grupy ryzyka, profilem molekularnym i wynikiem minimalnej choroby resztkowej, a także wystąpieniem wznowy bądź zgonu pacjenta.

Wyniki: Pod względem wykazywania i położenia pasm oraz pików nie zaobserwowano istotnych różnic dla widm FT-IR i widm RS surowicy oraz lizatu komórkowego szpiku kostnego dla pacjentów z ALL i pacjentów z pozostałych grup, podobnie jak gdy porównano widma pacjentów z grupy wysokiego ryzyka oraz pacjentów z grup ryzyka standardowego i pośredniego. Wykazano natomiast istotne statystycznie różnice w wartości absorpcji dla pików oryginalnych widm FT-IR, procentowego udziału poszczególnych struktur drugorzędowych dokonując integracji w zakresie amidu I drugiej pochodnej widma FT-IR oraz wartości intensywności pików widm RS, ale czułość i specyficzność odróżnienia pacjentów z ALL od pozostałych grup jak również pacjentów z grupy HR i non-HR w większości nie była zadawalająca, co potwierdziły analizy PCA i HCA.

Wnioski: Spektroskopia FTIR i Ramana wykazały ograniczoną przydatność w identyfikacji specyficznych zmian molekularnych w przebiegu ALL u dzieci, jednak ujawniły istotne różnice między grupą kontrolną a pacjentami z zaburzeniami hematologicznymi, włącznie z ALL. Zaobserwowano m.in. różnice w udziale struktur α -helisy i beta-kartki białek, które mogą posłużyć jako potencjalne markery diagnostyczne, zwłaszcza w różnicowaniu ALL jako przyczyny anemii i pancytopenii krwi obwodowej u dzieci oraz do wstępnej stratyfikacji do grupy ryzyka. Spektroskopia Ramana umożliwiła także odróżnienie pancytopenii w przebiegu ALL od innych przyczyn na podstawie badania surowicy krwi, co sugeruje potencjalną możliwość opracowania nieinwazyjnych testów przesiewowych. Wyniki wymagają walidacji na większych grupach pacjentów z uwagi na ograniczoną liczebność próby.

Abstract

Introduction: The most frequently diagnosed cancer and type of leukemia in children is acute lymphoblastic leukemia (ALL), which accounts for almost one third of all childhood cancer cases. The peak incidence in this group of patients is observed between the ages of 1 and 4, with boys being slightly more often diagnosed with ALL. Achieving survival rates of up to 90% is the result of multicenter studies and developing therapeutic regimens based on the assessment of prognostic factors, which are especially meaningful for improving the effectiveness of treatment of the problematic refractory and relapsed ALL, as well as minimizing long-term side effects of chemotherapy. It is crucial to diagnose ALL at the earliest possible time and implement an appropriate form of chemotherapy adapted to the molecular profile of neoplastic lymphoid precursor cells to achieve adequate treatment outcome. Both cytological evaluation of bone marrow, immunophenotype and genetic changes testing require a large expenditure of time, resources and experience of the people performing the test, and the biopsy itself, as an invasive procedure, performed under deep sedation or general anesthesia, carries a risk of complications. Vibrational spectroscopy techniques – Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and Raman spectroscopy (RS) allow for obtaining information on the structure and biochemical composition of the analyzed material, which may include cells, tissues and biological fluids, examining the interaction of electromagnetic radiation with the particles and atoms which they are composed of. As a rapid and non-invasive techniques they have been receiving increasing attention as new potential tools in medicine, which, by tracking changes occurring in the course of metabolic, neurodegenerative and neoplastic diseases, can be used to its diagnosis and to monitor the effectiveness of therapy.

Aim of the study: Fourier transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy were used for spectral analysis of peripheral blood serum and bone marrow cell lysate to identify molecular changes in the course of ALL in children, which could potentially be used in medical diagnostics as diagnostic and prognostic markers. Investigated differences in FT-IR spectra and Raman spectra of serum and bone marrow cell lysate of paediatric ALL patients and healthy patients or patients with haematological disorders other than cancer. The obtained spectral data were also analyzed with regards to clinical data available for patients with ALL associated with assessment of risk group, molecular

profile and the result of minimal residual disease, as well as the occurrence of recurrence or death of the patient.

Results: In terms of the presence and position of bands and peaks, no significant differences were observed for FT-IR spectra and RS spectra of serum and bone marrow cell lysate for patients with ALL and patients from other groups, similarly to the comparison of spectra of patients from the high-risk group and patients from the standard and intermediate risk groups. However, statistically significant differences were shown in the absorption value for the peaks of the original FT-IR spectra, the percentage share of individual secondary structures evaluated by integration in the amide I range of the second derivative of the FT-IR spectrum and the peak intensity values of RS spectra, but the sensitivity and specificity of distinguishing patients with ALL from other groups as well as patients from the HR and non-HR groups were not satisfactory in most cases, which was confirmed by PCA and HCA analyses.

Conclusions: FTIR and Raman spectroscopy have shown limited utility in identifying specific molecular alterations in the course of ALL in children, but have revealed significant differences between controls and patients with haematological disorders, including ALL. Among other things, differences were observed in the contribution of structures α -helix and beta-sheet proteins, which may serve as potential diagnostic markers, especially in differentiating ALL as a cause of peripheral blood anaemia or pancytopenia in children and for initial stratification into risk groups. Raman spectroscopy also made it possible to distinguish pancytopenia in ALL from other causes on the basis of serum testing, suggesting the potential possibility of developing non-invasive screening tests. The results need to be validated on larger patient groups due to the limited sample size.

Wykaz rycin

Rycina 1. Schemat przejść pomiędzy poszczególnymi poziomami energetycznymi. ...	22
Rycina 2. Widma uśrednione dla surowicy zdrowej kontroli (HC – kolor niebieski), pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC – kolor czarny) oraz pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (LEUK-PD – kolor czerwony). Widma przedstawiono dla zakresu $3500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ z pominięciem zakresu $2800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ wolnego od absorpcji podczerwieni dla próbek biologicznych.	31
Rycina 3. Widma uśrednione surowicy dla poszczególnych podgrup wydzielonych dla grupy HEMC (HEMC-E – kolor zielony, HEMC-P – kolor szary, HEMC-L – kolor różowy, HEMC-W – kolor pomarańczowy) oraz HC (kolor niebieski) i LEUK-PD (kolor czerwony). Widma przedstawiono dla zakresu $3500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ z pominięciem zakresu $2800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ wolnego od absorpcji podczerwieni dla próbek biologicznych.	34
Rycina 4. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji $3106\text{-}3104\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0301$).	36
Rycina 5. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji $3096\text{-}3094\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0319$).	37
Rycina 6. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji $2957\text{-}2956\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0003$).	38
Rycina 7. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji $2926\text{-}2924\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0013$).	38
Rycina 8. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji $2870\text{-}2869\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0002$).	39
Rycina 9. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji $2855\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0009$).	40
Rycina 10. Widmo drugiej pochodnej uzyskane dla surowicy dla zakresu $3500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$, z pominięciem zakresu $2800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ pacjentów grupy HC (kolor niebieski)	

i LEUK-PD (kolor czerwony) oraz podgrup pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC-E – kolor zielony, HEMC-P – kolor szary, HEMC-L – kolor różowy, HEMC-W – kolor pomarańczowy).	40
Rycina 11. Widmo drugiej pochodnej uzyskane dla surowicy dla zakresu 3100-2800 cm^{-1} . Strzałką wyznaczono minimum dla zakresu 2988-2986 cm^{-1}	41
Rycina 12. Widmo drugiej pochodnej surowicy obejmujące zakres 1750-1550 cm^{-1} podgrup HEMC (HEMC-E – kolor zielony, HEMC-P – kolor szary, HEMC-L – kolor różowy, HEMC-W – kolor pomarańczowy) oraz grupy HC (kolor niebieski) i LEUK-PD (kolor czerwony).	42
Rycina 13. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1451-1449 cm^{-1} widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0004$).	43
Rycina 14. A - Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1398-1395 cm^{-1} widma FT-IR surowicy (KW ANOVA, $p=0,0010$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla pików przy 1398-1395 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p=0,000020$). Różnice istotne statystycznie.	44
Rycina 15. A - Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1239-1238 cm^{-1} (KW ANOVA - $p=0,0001$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla pików przy 1239-1238 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p=0,000001$). Różnice istotne statystycznie.	46
Rycina 16. A - Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1170-1168 cm^{-1} widma FT-IR surowicy (KW ANOVA - $p<0,0001$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla pików przy 1170-1168 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p<0,0001$). Różnice istotne statystycznie.	47
Rycina 17. A - Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1309-1306 cm^{-1} widma FT-IR surowicy (KW ANOVA - $p=0,0014$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla pików przy 1309-1306 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p=0,000034$). Różnice istotne statystycznie.	48

Rycina 18. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1078-1075 cm^{-1} widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0159$).	49
Rycina 19. A -Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1103-1102 cm^{-1} (KW ANOVA - $p=0,0156$). B – Wykres porównujący wartości absorpcji dla pików przy 1103-1102 cm^{-1} dla grupy HC oraz pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi włącznie z białaczką (UMW - $p=0,001524$). Różnice istotne statystycznie.	50
Rycina 20. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 934-931 cm^{-1} widma FT-IR surowicy. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0102$).	51
Rycina 21. Schemat integracji widma FT-IR surowicy w zakresie 1700-1600 cm^{-1} na przykładzie uśrednionych widm HC (oznaczone na rycinie numerem 1), HEMC (numer 2) i LEUK-PD (numer 3).	53
Rycina 22. Wykres porównujący procentowy udział struktury drugorzędowej β -zakrętu dla grup z minimum przy pozycji 1680-1679 cm^{-1} . Różnica bliska istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0378$).	56
Rycina 23. Wykres porównujący procentowy udział struktury nieuporządkowanej dla grup z minimum przy pozycji 1646-1644 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0028$).	57
Rycina 24. Wykres porównujący procentowy udział struktury α -helisy dla grup z minimum przy pozycji 1661-1660 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0035$).	57
Rycina 25. Zestawienie udziału procentowego struktur drugorzędowych białek dla poszczególnych grup HEMC, HC i LEUK-PD. Wyniki dla pacjentów w grupie zaznaczono kształtem rombu $\blacklozenge$	58
Rycina 26. Wykres wyników PCA względem składowych głównych PC1 i PC2 dla podgrup HEMC, HC i LEUK-PD w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością ($\circ$), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią ($\blacksquare$).	59
Rycina 27. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 dla podgrup HEMC (kolor czarny), HC (kolor niebieski) i LEUK-PD (kolor czerwony) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup	

HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).60

Rycina 28. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 dla podgrup HEMC (kolor czarny), HC (kolor niebieski) i LEUK-PD (kolor czerwony) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).60

Rycina 29. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 w zakresie 3500-2800 cm^{-1} oraz 1800-800 cm^{-1} widma FT-IR surowicy podgrup HEMC, HC i LEUK-PD.....62

Rycina 30. Widma oryginalne surowicy reprezentatywne dla pacjentów z białaczką z grupy HR (kolor czarny) oraz grupy non-HR (kolor czerwony). Widma FT-IR surowicy przedstawiono dla zakresu 3500-800 cm^{-1} z pomięciem zakresu 2800-1800 cm^{-1}63

Rycina 31. Widma drugiej pochodnej surowicy reprezentatywne dla pacjentów z białaczką z grupy HR (kolor czarny) oraz grupy non-HR (kolor czerwony). Widma FT-IR surowicy przedstawiono dla zakresu 3500-800 cm^{-1} z pomięciem zakresu 2800-1800 cm^{-1}65

Rycina 32. Widma drugiej surowicy reprezentatywne dla pacjentów z białaczką z grupy HR (kolor czarny) oraz grupy non-HR (kolor czerwony). Widma FT-IR surowicy przedstawiono dla zakresu 1200-900 cm^{-1} . Strzałkami wskazano zakres, w którym obserwowano przesunięcia bądź dodatkowe minima.66

Rycina 33. Wykres porównujący procentowy udział struktury drugorzędowej struktury β -kartki z minimum przy pozycji 1630 cm^{-1} widma FT-IR surowicy dla grup HR i non-HR. Różnica istotna statystycznie ($p=0,001240$).....67

Rycina 34. Zestawienie udziału procentowego struktur drugorzędowych białek dla grup HR i non-HR.....68

Rycina 35. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grupy HR (kolor niebieski) i grupy non-HR (kolor czerwony) LEUK-PD w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR surowicy. Czarnymi strzałkami wskazano wyniki dla pacjentów, u których obserwowano wznowę. Zieloną strzałką wskazano pacjenta, u którego obserwowano wznowę i odnotowano zgon.69

Rycina 36. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 (wykres po prawej stronie) oraz PC1 i PC3 (wykres po lewej stronie) dla grupy HR (kolor niebieski) i grupy non-HR (kolor czerwony) LEUK-PD w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR

surowicy. Czarnymi strzałkami wskazano wyniki dla pacjentów, u których obserwowano wznowę. Zieloną strzałką wskazano pacjenta, u którego obserwowano wznowę i odnotowano zgon.....69

Rycina 37. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 w zakresie $3500-2800\text{ cm}^{-1}$ oraz $1800-800\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR surowicy grupy HR i grupy non-HR.....71

Rycina 38. Widma reprezentatywne dla lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC – kolor czarny) oraz pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (LEUK-PD – kolor czerwony). Widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego przedstawiono dla zakresu $3500-800\text{ cm}^{-1}$ z pominięciem zakresu $2800-1800\text{ cm}^{-1}$ wolnego od absorpcji podczerwieni dla próbek biologicznych..72

Rycina 39. Widma reprezentatywne dla szpiku kostnego dla poszczególnych podgrup utworzonych dla podgrup pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC-E – kolor zielony, HEMC-P – kolor szary, HEMC-L – kolor różowy, HEMC-W – kolor pomarańczowy) i LEUK-PD (kolor czerwony). Widma FT-IR przedstawiono dla zakresu $3500-800\text{ cm}^{-1}$ z pominięciem zakresu $2800-1800\text{ cm}^{-1}$ wolnego od absorpcji IR dla próbek biologicznych.....74

Rycina 40. Wykres porównujący wartość absorpcji dla grup dla piku z maksimum przy pozycji $2957-2956\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Różnica istotna statystycznie ($p=0,008207$).77

Rycina 41. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piku z maksimum przy pozycji $2928-2925\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,000782$).77

Rycina 42. Wykres porównujący wartości absorpcji dla grup dla piku z maksimum przy pozycji $2871-2870\text{ cm}^{-1}$ widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Różnica istotna statystycznie ($p=0,008065$).78

Rycina 43. Wykres drugiej pochodnej lizatu komórkowego szpiku kostnego dla grupy LEUK-PD (kolor czerwony) i podgrup HEMC (HEMC-E – kolor zielony, HEMC-P – kolor szary, HEMC-L – kolor różowy, HEMC-W – kolor pomarańczowy) w zakresie $3500-800\text{ cm}^{-1}$ z pominięciem zakresu $2800-1800\text{ cm}^{-1}$ 79

Rycina 44. Widmo drugiej pochodnej lizatu komórkowego szpiku kostnego uśrednione dla grupy LEUK-PD (kolor czerwony) i podgrup HEMC (HEMC-E – kolor zielony, HEMC-P – kolor szary, HEMC-L – kolor różowy, HEMC-W – kolor

pomarańczowy) w zakresie 3100-2900 cm^{-1} . Strzałką zaznaczono region, w którym obserwowano istotne przesunięcia.....	79
Rycina 45. Wykres porównujący wartość absorpcji dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1633-1632 cm^{-1} widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0377$).....	81
Rycina 46. Widmo drugiej pochodnej lizatu komórkowego szpiku kostnego dla uśrednionych dla grupy LEUK-PD (kolor czerwony) i podgrup HEMC (HEMC-E – kolor zielony, HEMC-P – kolor szary, HEMC-L – kolor różowy, HEMC-W – kolor pomarańczowy) w zakresie 1100-1000 cm^{-1} . Strzałkami zaznaczono regiony, dla których obserwowano różnice dla grupy HEMC-E.....	82
Rycina 47. Metoda integracji widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego w zakresie 1700-1600 cm^{-1} na przykładzie uśrednionych widm drugiej pochodnej LEUK-PD (A) i HEMC (B).....	84
Rycina 48. Zestawienie udziału procentowego struktur drugorzędowych białek dla poszczególnych podgrup HEMC i LEUK-PD.....	86
Rycina 49. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grupy LEUK-PD (kolor czerwony) oraz podgrup HEMC (kolor czarny) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).	87
Rycina 50. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 (wykres po prawej stronie) oraz PC1 i PC3 (wykres po lewej stronie) grupy LEUK-PD (kolor czerwony) oraz podgrup HEMC (kolor czarny) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm lizatu komórkowego szpiku kostnego. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).....	88
Rycina 51. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 w zakresie 3500-2800 cm^{-1} oraz 1800-800 cm^{-1} widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego grupy LEUK-PD oraz podgrupy HEMC.....	89
Rycina 52. Uśrednione widma FT-IR lizatu komórkowego dla pacjentów zakwalifikowanych do grupy wysokiego ryzyka (HR – kolor czarny) i spoza grupy wysokiego ryzyka (non-HR – kolor czerwony) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1}	90

Rycina 53. Widmo drugiej pochodnej lizatu komórkowego szpiku kostnego grup HR (kolor czarny) i non-HR (kolor czerwony) w zakresie 3500-800 cm^{-1} z pominięciem zakresu 2800-1800 cm^{-1} wolnego od absorpcji światła podczerwonego dla próbek biologicznych.....	92
Rycina 54. Zestawienie udziału procentowego struktur drugorzędowych białek dla grupy HR i non-HR.....	94
Rycina 55. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 dla grupy HR (kolor niebieski) i grupy non-HR (kolor czerwony) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego.....	95
Rycina 56. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 (prawa strona) oraz PC1 i PC2 (lewa strona) grupy HR (kolor niebieski) i grupy non-HR (kolor czerwony) w zakresie 3500-2800 cm^{-1} i 1800-800 cm^{-1} widm lizatu komórkowego szpiku komórkowego.	95
Rycina 57. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 w zakresie 3500-2800 cm^{-1} oraz 1800-800 cm^{-1} widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego grupy HR i grupy non-HR LEUK-PD.....	96
Rycina 58. Uśrednione widma ramanowskie surowicy zdrowej kontroli (HC – kolor niebieski), pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC – kolor czarny) oraz pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (LEUK-PD – kolor czerwony). Widma przedstawiono dla zakresu 1800-500 cm^{-1}	97
Rycina 59. Uśrednione widma ramanowskie surowicy dla poszczególnych podgrup utworzonych dla pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC-E – kolor zielony, HEMC-P – kolor szary, HEMC-L – kolor różowy, HEMC-W – kolor pomarańczowy) oraz HC (kolor niebieski) i LEUK-PD (kolor czerwony).....	100
Rycina 60. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piku z maksimum przy pozycji 1658 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p < 0,0001$).	102
Rycina 61. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piku z maksimum przy pozycji 1618 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p = 0,0057$).	103
Rycina 62. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla piku z maksimum przy pozycji 1606 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p = 0,0059$).	104

Rycina 63. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1340-1339 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0135$).	105
Rycina 64. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1319 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0108$).	105
Rycina 65. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1271-1270 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0243$).	106
Rycina 66. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1209 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,008$).	107
Rycina 67. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 900 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0045$).	108
Rycina 68. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 943 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0185$).	108
Rycina 69. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1004 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0402$).	109
Rycina 70. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 958 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0232$)	110
Rycina 71. Wykres porównujący wartości znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1449 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0002$)	110
Rycina 72. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grupy HC (kolor niebieski), LEUK-PD (kolor czerwony) i podgrup HEMC (kolor czarny) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).	112
Rycina 73. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 dla grupy HC (kolor niebieski), LEUK-PD (kolor czerwony) i podgrup HEMC (kolor czarny) w zakresie	

1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■). 113

Rycina 74. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 dla grupy HC (kolor niebieski), LEUK-PD (kolor czerwony) i podgrup HEMC (kolor czarny) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■). 113

Rycina 75. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 dla grupy HC, LEUK-PD i podgrup HEMC w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy. 115

Rycina 76. Widma Ramanowskie surowicy pacjentów z białaczką z grupy HR (kolor czarny) i grupy non-HR (kolor czerwony). Widma przedstawiono dla zakresu 1800-500 cm^{-1} 116

Rycina 77. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grup HR (kolor niebieski) i non-HR (kolor czerwony) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy. Czarnymi strzałkami wskazano wyniki dla pacjentów, u których obserwowano wznowę. Zieloną strzałką wskazano pacjenta, u którego obserwowano wznowę i odnotowano zgon. 118

Rycina 78. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 (prawa strona) oraz PC2 i PC3 (lewa strona) dla grupy HR (kolor niebieski) i non-HR (kolor czerwony) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm RS surowicy. Czarnymi strzałkami wskazano wyniki dla pacjentów, u których obserwowano wznowę, a zieloną strzałką pacjenta, u którego obserwowano wznowę i odnotowano zgon. 119

Rycina 79. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 dla grupy HR i non-HR w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich surowicy. 119

Rycina 80. Widmo ramanowskie lizatu komórkowego szpiku kostnego uśrednione dla grupy pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC – kolor czarny) i pacjentów z białaczką w momencie diagnozy (LEUK-PD – kolor czerwony). Widmo przedstawiono w zakresie 1800-500 cm^{-1} 120

Rycina 81. Widmo ramanowskie lizatu komórkowego szpiku kostnego uśrednione dla grupy pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC-E – kolor zielony, HEMC-P – kolor szary, HEMC-L – kolor różowy, HEMC-W – kolor pomarańczowy) oraz HC

(kolor niebieski) i LEUK-PD (kolor czerwony). Widmo przedstawiono w zakresie 1800-500 cm^{-1}	123
Rycina 82. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1657 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (UMW - $p=0,009841$).	125
Rycina 83. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1002 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (UMW - $p=0,033883$).	126
Rycina 84. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1248-1247 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (UMW - $p=0,033208$).	126
Rycina 85. Wykres porównujący wartość znormalizowanej intensywności Ramana dla grup dla pików z maksimum przy pozycji 1236 cm^{-1} . Różnica istotna statystycznie (KW ANOVA - $p=0,0261$).	127
Rycina 86. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grupy HC (kolor niebieski), LEUK-PD (kolor czerwony) oraz podgrup HEMC (kolor czarny) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).	129
Rycina 87. Wykres wyników PCA względem PC2 i PC3 (prawa strona) oraz PC1 i PC3 (lewa strona) dla grupy HC (kolor niebieski), LEUK-PD (kolor czerwony) oraz podgrup HEMC (kolor czarny) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego. Ze względu na rodzaj zaburzenia dla podgrup HEMC kolorem czarnym wyróżniono pacjentów z anemią (symbol +), małopłytkowością (○), leukopenią (Δ) oraz pancytopenią (■).	129
Rycina 88. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 dla grupy HC, LEUK-PD i podgrup HEMC w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego.	130
Rycina 89. Uśrednione widma ramanowskie dla pacjentów z grupy wysokiego ryzyka (LEUK-PD HR - kolor czarny) i pacjentów z poza grupy wysokiego ryzyka (LEUK-PD non-HR - kolor czerwony) w zakresie 1800-500 cm^{-1} przesunięcia Ramana.	131
Rycina 90. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC2 dla grupy HR (kolor niebieski) i non-HR (kolor czerwony) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego.	133

Rycina 91. Wykres wyników PCA względem PC1 i PC3 (prawa strona) oraz PC2 i PC3 (lewa strona) dla grupy HR (kolor niebieski) i non-HR (kolor czerwony) w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego..... 134

Rycina 92. Wykresy obciążeń analizy PCA dla komponentów PC1, PC2 i PC3 dla grupy HR i non-HR w zakresie 1800-500 cm^{-1} widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego..... 134

Wykaz tabel

Tabela 1. Charakterystyka grup badanych.....	26
Tabela 2. Przypisy biochemiczne dla pików obserwowanych w widmie FT-IR surowicy.....	32
Tabela 3. Pozycja maksimów dla widm FT-IR surowicy zdrowej kontroli (HC), pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (HEMC) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (LEUK-PD) wraz z odpowiadającymi im wartościami absorpcji. Na czerwono zaznaczono piki, które nie były obserwowane w widmie dla co najmniej jednej z analizowanych grup.	33
Tabela 4. Zestawienie wartości czułość i specyficzności oraz punktu odcięcia i AUC dla poszczególnych zmiennych dla widm FT-IR surowicy.....	51
Tabela 5. Wyznaczone pozycje minimum w zakresie 1700-1600 cm ⁻¹ widma FT-IR surowicy uśrednionych dla analizowanych grup.	54
Tabela 6. Zestawienie procentowego udział poszczególnych struktur drugorzędowych dla uśrednionych widm analizowanych grup.....	55
Tabela 7. Wyznaczona pozycja pików wraz z odpowiadającą im wartością absorpcji wyznaczona dla widma FT-IR surowicy pacjentów z grupy HR i non-HR.	64
Tabela 8. Udział procentowy poszczególnych struktur drugorzędowych dla uśrednionych widm surowicy FT-IR pacjentów z białaczką zakwalifikowanych do grup wysokiego ryzyka (grupa HR) i pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka (grupa non-HR).....	67
Tabela 9. Pozycja maksimów dla widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (HEMC) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (LEUK-PD) wraz z odpowiadającymi im wartościami absorpcji i przypisami biochemicznymi.	73
Tabela 10. Pozycja maksimów dla widm FT-IR lizatu szpiku kostnego pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi z wydzielonymi podgrupami	75
Tabela 11. Zestawienie wartości czułość i specyficzności oraz punktu odcięcia i AUC dla poszczególnych zmiennych dla widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego..	83
Tabela 12. Wyznaczone pozycje minimum w zakresie 1700-1600 cm ⁻¹ widma FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego uśrednionych dla analizowanych grup.....	84

Tabela 13. Udział procentowy poszczególnych struktur drugorzędowych dla uśrednionych widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego podgrup HEMC i LEUK-PD	85
Tabela 14. Pozycja pików wraz z odpowiadającą im wartością absorpcji dla uśrednionych widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego grup HR i non-HR.	91
Tabela 15. Udział procentowy poszczególnych struktur drugorzędowych dla uśrednionych widm FT-IR lizatu komórkowego szpiku kostnego dla pacjentów z białaczką zakwalifikowanych do grup wysokiego ryzyka (grupa HR) i pacjentów spoza grupy wysokiego ryzyka (grupa non-HR)	93
Tabela 16. Pozycje uwidocznionych maksimów dla widm ramanowskich surowicy zdrowej kontroli (HC), pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (HEMC) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (LEUK-PD) wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana.	98
Tabela 17. Pozycja uwidocznionych maksimów widma ramanowskiego wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana dla poszczególnych podgrup pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi.	101
Tabela 18. Wartości czułości i specyficzności wraz z punktem odcięcia i AUC dla zmiennych, dla których zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości intensywności widma ramanowskiego surowicy.....	111
Tabela 19. Pozycja pików wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności wyznaczone dla uśrednionych widm ramanowskich surowicy pacjentów z grupy HR i non-HR.....	117
Tabela 20. Pozycje uwidocznionych maksimów dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (HEMC) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (LEUK-PD) wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana.	121
Tabela 21. Pozycje uwidocznionych maksimów dla widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego pacjentów z zaburzeń hematologicznymi (HEMC) i pacjentów z białaczką w czasie rozpoznania (LEUK-PD) wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana.	124
Tabela 22. Wartości czułości i specyficzności wraz z punktem odcięcia dla zmiennych, dla których zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości intensywności widma ramanowskiego lizatu komórkowego szpiku kostnego.	128

Tabela 23. Pozycja pików wraz z odpowiadającymi im wartościami znormalizowanej intensywności Ramana dla uśrednionych widm ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego grup HR i non-HR.....	132
---	-----

Aktywność naukowa Osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora

Publikacje w czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej:

1. Mahlovanyi B, Król N, Lopushansky A, Shpotyuk Y, Boussard-Pledel C, Bureau B, Szmuc K, Gruzeł G, Łach K, **Kowal A**, Truax M, Golovchak R, Gala-Błądzińska A, Cebulski J. Diagnostic and prognostic perspectives of Fabry disease via fiber evanescent wave spectroscopy advanced by machine learning. Biosens Bioelectron. 2025 Apr 1;273:117139. Punktacja MNiSW: 200. IF: 12,6.
2. Tołpa B, Paja W, Trojnar E, Łach K, Gala-Błądzińska A, **Kowal A**, Gumbarewicz E, Frączek P, Cebulski J, Depciuch J. FT-Raman spectra in combination with machine learning and multivariate analyses as a diagnostic tool in brain tumors. Nanomedicine. 2024 Apr;57:102737. Punktacja MNiSW: 140. IF: 4,2.
3. Tołpa B, Paja W, Jakubczyk P, Łach K, Trojnar E, Gala-Błądzińska A, **Kowal A**, Klębowski B, Cebulski J, Depciuch J. Differentiation of glioblastoma G4 and two types of meningiomas using FTIR spectra and machine learning. Anal Biochem. 2025 Apr;699:115754. Punktacja MNiSW: 70. IF: 3,191.
4. Łach K, **Kowal A**, Perek-Polnik M, Jakubczyk P, Arthur CJ, Bal W, Drogosiewicz M, Dembowska-Bagińska B, Grajkowska W, Cebulski J, Chaber R. Infrared Spectroscopy as a Potential Diagnostic Tool for Medulloblastoma. Molecules. 2023 Mar 5;28(5):2390. Punktacja MNiSW: 140. IF: 4,2.
5. Chaber R, Gurgul A, Tabarkiewicz J, Wróbel G, Szmatoła T, Jasielczuk I, Haus O, Lejman M, Rybka B, Ryczan-Krawczyk R, Jaśkowiec A, Paszek S, Potocka N, Arthur CJ, Bal W, Łach K, **Kowal A**, Zawlik I, Latos-Grażyńska E. MicroRNA gene methylation landscape in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Adv Clin Exp Med. 2022 Jan 29. Punktacja MNiSW: 70. IF: 2,1.
6. Chaber R, **Kowal A**, Jakubczyk P, Arthur C, Łach K, Wojnarowska-Nowak R, Kusz K, Zawlik I, Paszek S, Cebulski J. A Preliminary Study of FTIR Spectroscopy as a Potential Non-Invasive Screening Tool for Pediatric Precursor B Lymphoblastic Leukemia. Molecules. 2021 Feb 22;26(4):1174. Punktacja MNiSW: 140. IF: 4,2.

Pozostałe publikacje:

1. **Kowal A**, Bieńko K, Działak P, Gil-Kulik P, Feldo M, Kocki J. Ocena ekspresji genu XAF1 w limfocytach krwi pacjentów z miażdżycą. Problematyka z zakresu medycyny i nauk pokrewnych - przegląd i badania. T. 1. Red. Monika Maciąg, Alicja Danielewska Lublin 2019, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, pp.7-19. Punktacja MNiSW: 80.
2. Gil-Kulik P, **Kowal A**, Bieńko K, Działak P, Kulesza A, Mazurek M, Kulec E, Dziarmaga A, Madej A, Filipczak D, Chomik P, Wawer J, Wawer GA, Cioch M, Jojczuk M, Nogalski A, Kocki J. The POU5F1 gene in human leukemia cells. TEKA. Commission of Medical Sciences, An International Journal on Medical Sciences – 2018, Vol. 6. No 1. Punktacja MNiSW: 5

Najnowsze doniesienia konferencyjne:

1. Badania laboratoryjne w zaburzeniach gospodarki żelazowej u dzieci – Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Postępy w diagnostyce laboratoryjnej” (14.12.2024 r., Rzeszów)
2. Stężenie ferrytyny oraz saturacja transferyny jako marker niedoboru żelaza u dzieci przedszkolnych (2-5 rż) - XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Onkologii i Hematologii Dziecięcej 'Status quo et quo vadis' (2-4.06.2022 r., Bydgoszcz)
3. Obrazowanie FTIR w diagnostyce gruczolakoraka płuc - Polish Scientific Conference NATURE 2021 (12.06.2021 r.)

Projekty naukowe:

1. Opracowanie widm referencyjnych i algorytmu analizy widm spektroskopowych celem implementacji w diagnostyce medycznej - projekt finansowany w ramach programu grantowego na prace B+R jednostek naukowych w ramach projektu pt. „Podkarpackie Centrum Innowacji” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Osi Priorytetowej nr I "Konkurencyjna i innowacyjna gospodarka" z Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podkarpackiego na lata 2014-2020 Nabór III (numer grantu N3_134). Funkcja: wykonawca w grancie.

2. Widmo spektroskopowe nanoIR pojedynczej komórki białaczkowej jako potencjalny marker diagnostyczny i prognostyczny w ostrych białaczkach u dzieci – projekt realizowany w ramach uczelnianego grantu dla młodych naukowców Uniwersytetu Rzeszowskiego (numer identyfikacyjny grantu NIG/36/2022). Funkcja: główny badacz.

Załączniki

Załącznik nr 1: Uchwała nr 1/01/2020 Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim z dnia 30/01/2020 r.



KOMISJA BIOETYCZNA UNIwersYTETU RZESZOWSKIEGO
UNIwersYTET RZESZOWSKI
Kolegium Nauk Medycznych
al. mjr. W. Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów

UCHWAŁA Nr 1/01/2020

Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim

30/01/2020

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Rzeszowskim, działając na podstawie art. 29 ust. 3 pkt 2 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z dnia 26 marca 1997 roku, Nr 28, poz.152), zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 roku (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 roku) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, po zapoznaniu się z wnioskiem obejmującym również zgłoszenie badania oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę, w wyniku przeprowadzonej dyskusji i głosowania,

postanawia

projekt badawczy: „Zastosowanie spektroskopii IR i spektroskopii Ramana w poszukiwaniu potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych w surowicy i szpiku kostnym pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL).”

zaopiniować pozytywnie.

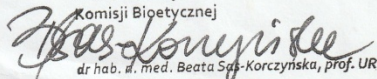
Uwagi: Uchwała jest ważna na okres objęty planem badań.

Do wiadomości:

Wnioskodawca

dr hab. n. med. Radosław Chaber, prof. UR, mgr Anna Kowal, mgr inż. Kornelia Łach, mgr Sylwia Paszek, dr hab. Józef Cybulski, prof. UR, dr hab. n. med. Izabela Zawlik, prof. U

Uniwersytet Rzeszowski
Przewodnicząca
Komisji Bioetycznej


dr hab. n. med. Beata Sas-Korczyńska, prof. UR

Załącznik nr 2: Uchwała nr 2022/045/W Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim z dnia 04/05/2022 r.



KOMISJA BIOETYCZNA UNIwersYTETU RZESZOWSKIEGO
UNIwersYTET RZESZOWSKI
Kolegium Nauk Medycznych
Al. mjr. Wacława Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów
email: komisjabioetyczna@ur.edu.pl

UCHWAŁA nr 2022/045/W
Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego
z dnia 04/05/2022 roku
w sprawie wniosku dotyczącego
eksperymentu badawczego z wykorzystaniem ludzkiego materiału biologicznego
„Opracowanie widm referencyjnych i algorytmu analizy widm spektroskopowych celem implementacji w diagnostyce medycznej”
złożonego przez mgr Anetę Kowal

§ 1

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Rzeszowskiego, działając na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5 grudnia 1997 roku o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2021 r. poz. 790) i Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 roku w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych (Dz. U. 1999 r. Nr 47 poz. 480) w związku z art. 27 pkt 10¹ ustawy z dnia 16 lipca 2020r. o zmianie ustawy o zawodach lekarza i lekarza dentysty oraz niektórych innych ustaw (Dz.U. 2021 poz.790) oraz zgodnie z zasadami GCP (*Good Clinical Practice*), po zapoznaniu się z wnioskiem i dokumentacją eksperymentu badawczego z wykorzystaniem ludzkiego materiału biologicznego, w wyniku dyskusji i głosowania przeprowadzonych dn. 04.05.2022 roku w formie kontaktu bezpośredniego liczbą 10 głosów akceptujących spośród 10 oddanych głosów

postanawia

eksperyment badawczy z wykorzystaniem ludzkiego materiału biologicznego
„Opracowanie widm referencyjnych i algorytmu analizy widm spektroskopowych celem implementacji w diagnostyce medycznej”
oraz dokumentację badania, w tym:
opis projektu planowanego badania,
informacja przeznaczona dla osób objętych badaniem,
wzór formularza świadomości zgody na udział w badaniu,
klauszula informacyjna o przetwarzaniu danych osobowych,
wzór kwestionariusza wykorzystanego w badaniu,
oświadczenie o nienaruszeniu praw autorskich wykorzystywanych kwestionariuszy,
zgody dyrektorów ośrodków i JM Rektora UR na przeprowadzenie badania,
CV wszystkich członków zespołu badawczego,

zaopiniować pozytywnie pod warunkiem,

że do rozpoczęcia eksperymentu **niezbędnym** jest zawarcie „przez podmiot przeprowadzający eksperyment medyczny **umowy ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej** na rzecz jego uczestnika oraz osoby, której skutki eksperymentu mogą bezpośrednio dotknąć”, zgodnie z art.23c ust.1 Ustawy o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2021 poz. 790)

§ 2

Uchwała wchodzi w życie z dniem jej podjęcia z mocą obowiązującą od dnia powstania obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej, o której mowa w niniejszej Uchwale i której szczegółowy zakres określa Rozporządzenie Ministra Finansów, Funduszy i Polityki Regionalnej w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej podmiotu przeprowadzającego eksperyment medyczny (Dz. U. 2020 poz. 2412).

¹ ma zastosowanie do czasu wydania przez ministra właściwego do spraw zdrowia rozporządzenia regulującego szczegółowy tryb powoływania oraz sposób działania komisji bioetycznej oraz Odwoławczej Komisji Bioetycznej

Komisja Bioetyczna UR zobowiązuje Wnioskodawcę do **niezwłocznego** dostarczenia kopii zawartej umowy obowiązkowego ubezpieczenia OC.
W załączeniu lista członków Komisji Bioetycznej UR uczestniczących w głosowaniu.

Przewodnicząca
Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego



dr hab. med. Beata Sas-Korczyńska, prof. UR

Do wiadomości:
Wnioskodawca: **mgr Aneta Kowal**

Strona 2

PKBUR-V.001.2021-załącznik nr 011