OPTYKA LINIOWA I NIELINIOWA W BADANIACH NOWOTWORÓW. PRZYSZŁOŚĆ DIAGNOSTYKI MEDYCZNEJ

Prof. dr hab. Halina Abramczyk

POLITECHNIKA ŁÓDZKA LABORATORIUM LASEROWEJ SPEKTROSKOPII MOLEKULARNEJ http://mitr.p.lodz.pl/raman/



POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ CHEMICZNY, LABORATORIUM LASEROWEJ SPEKTROSKOPII MOELKULARNEJ

mitr.p.lodz.pl/raman

Jacek Musiał² Radzislaw Kordek² Alina Morawiec-Sztandera² Krystyna Fabianowska² Eric Freysz³ Lech Polis⁴ Bartosz Polis⁴

²Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Katedra onkologii, Zakład Patomorfologii Paderewskiego 4, 93-509 Łódź, Polska

³ Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine (LOMA), UMR 5798 Université Bordeaux 1, France

⁴ Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Odział Neurochirurgii i Neurotraumatologii, 3-338 Łódź, Polska



prof. dr hab. Halina Abramczyk head of Laboratory of Laser

website

Molecular Spectroscopy abramczy@mitr.p.lodz.pl pok. 233





dr inż. Jakub Surmacki jsurmacki@mitr.p.lodz.pl pok. 303 website



dr inż. Arkadiusz Jarota ajarota@mitr.p.lodz.pl pok. 309 website



dr inż. Monika Kopeć mkopec@mitr.p.lodz.pl pok. 303 website



mgr Anna Imiela anna.imiela@p.lodz.pl pok. 309 website

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ CHEMICZNY, LABORATORIUM LASEROWEJ SPEKTROSKOPII MOELKULARNEJ

WSPÓŁPRACA Z OŚRODKAMI MEDYCZNYMI

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Katedra Onkologii Prof. dr hab. n med. Radzisław Kordek Dr n med. Jacek Musiał

WSS i M. Kopernika w Łodzi

Prof. dr hab. n med. Z. Morawiec Lekarz med. Marek Tazbir



mitr.p.lodz.pl/raman

<u>Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. WAM –</u> <u>Centralny Szpital Weteranów</u> Prof. dr hab. n. med. Adam Dziki

Uniwersytet Medyczny w Łodzi Klinika Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi Oddział Laryngologii Onkologicznej – Regionalny Ośrodek Onkologiczny Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego i m. Kopernika

Prof. dr hab. n med. Alina Morawiec-Sztandera Dr n med. Izabela Niedźwiecka

Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi Prof. dr hab. n. med. Lech Polis Dr n. med. Bartosz Polis

LABORATORIUM LASEROWEJ SPEKTROSKOPII MOELKULARNEJ

www.mitr.p.lodz.pl/raman



Laboratorium spektroskopii Ramana

Ramanor U 1000 (Jobin Yvon), 488-514nm Konfokalny mikroskop Raman (Renishaw)

Laboratorium obrazowania Ramana

Laboratorium spektroskopii femtosekundowej

Microscope Raman/AFM/SNOM/TERS Millennia, Tsunami, Empower30, Spitfire Ace, Topas (Spectra Physics)



Laboratorium obrazowania IR

Mikroskop FTIR (Agilent Technologies Cary 600 Series)



System Ramana do diagnostyki *in-vivo*, w czasie rzeczywistym podczas neurooperacji w trybie





Właściwości fal elektromagnetycznych zależą od długości fali. Promieniowaniem elektromagnetycznym o różnej długości fali są fale radiowe, mikrofale, podczerwień, światło widzialne, ultrafiolet, promieniowanie rentgenowskie i promieniowanie gamma. Każdy zakres spektralny promieniowania jest związany z określonym rodzajem spektroskopii.



TECHNOLOGIA 5G

Raman



Roentgen , Tomografi<mark>a</mark>



Frequency SPECTRUM

| 0 Hertz | Hertz Steady direct current | | | | | |
|----------|---------------------------------|---|--|--|--|--|
| 50-60 He | tz (5000] | Km) AC power | | | | |
| USA | | | | | | |
| 16-16.00 | 0 kHz | Audio frequencies | | | | |
| 10-30 | kHz 30 | -10Km v.l.f -very low frequency | | | | |
| 30-30000 | KHz | Radio Frequencies | | | | |
| 30-300 | kHz 10 | 0-1Km l.f. low frequency | | | | |
| 30-35 | kHz | Marine com & navigation, aero nav. | | | | |
| 300-3000 | kHz | 1000-100m m.f medium frequencies | | | | |
| 535-1635 | kHz | AM broadcast bands | | | | |
| 1800-200 | 0 kHz | 160 meter band | | | | |
| | Foo | otball_Field | | | | |
| 3-30 | MHz 10 | 0-10m h.f high frequencies | | | | |
| 3.5-4 | MHz | 80 melerband | | | | |
| 7-7.3 | MHz | 40 band | | | | |
| 14-14.35 | MHz | 20 meter band | | | | |
| 21-21.45 | MHz | 15meterbend | | | | |
| 26.85-27 | Industrial, Scientific, medical | | | | | |
| 28-29.7 | MHz | 10 meterband | | | | |
| 26.86-27 | .455 MH | z Citizens Band Class D | | | | |
| | Hı | 1man | | | | |
| 30-300 | MHz | IO-1m very high frequencies | | | | |
| 44-49 | Mhz | Analog cordless phone | | | | |
| 30-50 | MHz | Police,fire,highway,railroad | | | | |
| 50-54 | MHz | 6 meter band | | | | |
| 54-72 | MHz | TV channels 2 to 4 | | | | |
| 72-76 | MHz | Government, Aero,Marker 75MHz | | | | |
| 76-88 | MHz | TV channels 5 and 6 | | | | |
| 88-108 | MHz | FM broadcast band | | | | |
| 108-118 | MHz | Aeronautical navigation | | | | |
| 118-136 | MHz | Civil Communication Band | | | | |
| 148-174 | MHz | Government | | | | |
| 144-148 | MHz | 2 meter band | | | | |
| 174-216 | MHz | TV channels 7 to 13 | | | | |
| 216-470 | MHz | Amateur, government. CB Bend | | | | |
| | | non-gov ,fixed or mobile ,aero navigate | | | | |
| 220-225 | MHz | Amateur band. 1-1/4 meter | | | | |
| 225-400 | MH ₇ | Military | | | | |



OBRAZOWANIE RAMANA



Spektroskopia i obrazowanie Ramana mogą identyfikować składniki tkanki, takie jak komórki nabłonkowe i macierz zewnątrzkomórkowa, która tworzy środowisko, w którym proliferują komórki nowotworowe. Dlatego obrazowanie Ramana jest doskonałą metodą badania składu biochemicznego, w tym zmian, które prowadzą do transformacji nowotworowej i umożliwia wykrywanie nieprawidłowości genetycznych w komórkach nowotworowych bardziej precyzyjne i kompleksowo niż metody klasyczne.





MIĘDZYRESORTOWY INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ WYDZIAŁ CHEMICZNY POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ













adhezja

sztywność

topografia





Raman Imaging in Biochemical and Biomedical Applications. Diagnosis and Treatment of Breast Cancer

Halina Abramczyk* and Beata Brozek-Pluska

Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Institute of Applied Radiation Chemistry, Lodz University of Technology, Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz, Poland





Dziedzina diagnostyki nowotworów stała się tak rozległą, że nie sposób przedyskutować całej tej dziedziny na jednym wykładzie. Dlatego wybrałam tylko kilka tematów, preferując te, które były bezpośrednio związane z naszym osobistym wkładem w dziedzinę.

MOTYWACJA -DLACZEGO?



Prawidłowa i nowotworowa ludzka tkanka gruczołu piersiowego, mózgu, głowy i szyi, jelita

Ludzkie linie komórkowe: pierś komórki prawidłowe (MCF-10A,) i nowotworowe epitelialne: (MCF-7, MDA-MB-231) ludzkie komórki glejowe mózgu: NHA Astrocytes CC2565), astrocyty (CCF-STTG1 (ATCC CLR1718) i glejaki (U87MG) (ATCC[®] HTB-14)

Modele zwierzęce in-vivo (mózg)

Leki (temodal,erlotinib) i fotouczulacze w terapii antynowotworowej

ZASTOSOWANIA BIOMEDYCZNE



- Wysoka rozdzielczość przestrzenna OBRAZOWANIE RAMANA
- mikroskopia SNOM (poniżej limitu dyfrakcyjnego, SNOM)
- Wzmocnienie sygnału umożliwiające monitorowanie genetycznych i immunologicznych odpowiedzi ukłaów biologicznych (SERS połączony z nanoczastkami)
- Swoistość oddziaływań (biokonjugaty)
- AFM topografia, sztywność, adhezja, moduł Younga (AFM)
- Wysoka rozdzielczość czasowa (spektroskopia femtosekundowa pump-probe (metodą wiązki pompującej-sondującej))

STATYSTYKA PACJENTÓW-GRUCZOŁ PIERSIOWY

*250 pacjentów





Carcinoma lobulare infiltrans Carcinoma ductale infiltrans + carcinoma lobulare infiltrans Carcinoma multifocale infiltrans Papillare intracysticum noninasium Carcinoma mucinosum sinistri Carcinma intraductale Fibroademona Carcinoma metaplasticum Dysplasia benigna Hyperplasia ductalo-lobularis Adenosis Leasio-fibroso-cysticum Proliferating breast disease

Raporty patologiczne wskazują, że 70% próbek raka to raki przewodowe; pozostałe próbki to raki zrazikowe lub nietypowe raki sutka, przerzuty stwierdzono u 60% chorych

Zajmiemy się nowotworami nabłonkowymi. Większość raków ma pochodzenie nabłonkowe (epitelialne) i stanowią około 80-85% wszystkich nowotworów.³⁸

STATYSTYKA PACJENTÓW-MÓZG



Komórki nabłonka pokrywają ciało i większości narządów, takich jak przewody mleczne w gruczole piersiowym czy przewodzie pokarmowym i biorą udział w wchłanianiu pokarmu, chociaż jest to tylko jedna z wielu cech nabłonka³⁷. Komórki wyściełające mózg, zwane ependymocytami, to rodzaj komórek glejowych pokrywających ściany układu komorowego mózgu: komory mózgowe i rdzeń kręgowy. Są zaangażowane w wymianę materiału między płynem mózgowo-rdzeniowym a tkanką nerwową i w przeciwieństwie do komórek nabłonka, nie mają błony podstawnej. Pomimo tych różnic, dla uproszczenia obie grupy będą nazywane epitelialnymi.

STATYSTYKA PACJENTÓW-JELITO





rectal tumor

□ large intestine

STATYSTYKA PACJENTÓW- GŁOWA - SZYJA



Komórki nabłonka pokrywają ciało i większości narządów, takich jak przewody mleczne w gruczole piersiowym czy przewodzie pokarmowym i biorą udział w wchłanianiu pokarmu, chociaż jest to tylko jedna z wielu cech nabłonka37. Komórki wyściełające mózg, zwane ependymocytami, to rodzaj komórek glejowych pokrywających ściany układu komorowego mózgu: komory mózgowe i rdzeń kręgowy. Są zaangażowane w wymianę materiału między płynem mózgowordzeniowym a tkanką nerwową i, w przeciwieństwie do komórek nabłonka, nie mają błony podstawnej. Pomimo tych różnic, dla uproszczenia obie grupy będą nazywane epitelialnymi.

ZJAWISKA LINIOWE I NIELINIOWE

KONFOKALNA MIKROSPEKTROSKOPIA RAMANA

WYMUSZONE ROZPRASZANIE RAMANA

Absorpcja przejściowa pump-probe, spektroskopia femtosekundowa, CARS

GENEROWANIE DRUGIEJ HARMONICZNEJ (SHG)

Indukowana polaryzacja makroskopowa *P* dipoli elektrycznych w materiale zależy od natężenia przyłożonego pola optycznego *E*. W przypadku słabych pól elektrycznych (w porównaniu z polami wiążącymi elektrony z jądrem) zależność tę można sformułować jako zależność liniową. Wraz z konstrukcją laserów impulsowych o wysokich mocach szczytowych można by zbadać i zastosować więcej procesów nieliniowych. W takich procesach polaryzacja indukowana w materiale spowodowana padającym polem elektrycznym (światłem) nie jest już liniowo zależna od amplitudy pola. Istnieje wiele procesów obserwowanych w reżimie nieliniowym.



Introduction to Laser Spectroscopy







Introduction to Laser Spectroscopy 1st Edition

☆☆☆☆ Write a review

Authors: Halina Abramczyk

eBook ISBN: 9780080455259 Hardcover ISBN: 9780444516626

Imprint: Elsevier Science Published Date: 6th May 2005

Page Count: 384

Teoria optyki nieliniowej w ogólności, a szczególnie spójne rozpraszanie Ramana została szczegółowo opisana w podręcznikach

| Technika | Rozdzielczoś ć przestrzenna | Penetracja w głąb | Czułość w detekcji markerów molekularnych | Gęstość danych na piksel | Szybkość akwizycji danych | Zjawisko badane | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|--------------------------------|------------------------------|--|---------------------------|
| CLSM/RLSM | $\sqrt{\sqrt{2}}$ | \checkmark | \checkmark | \checkmark | $\sqrt{\sqrt{2}}$ | Rozpraszanie, fluorescencja | |
| ост | $\sqrt{}$ | $\sqrt{}$ | \checkmark | \checkmark | $\sqrt{\sqrt{\sqrt{1}}}$ | Rozpraszanie, polaryzacja | |
| PAI | $\sqrt{}$ | $\sqrt{\sqrt{\sqrt{1}}}$ | \checkmark | \checkmark | $\sqrt{}$ | Absorpcja | |
| TPEF ^f | $\sqrt{\sqrt{\sqrt{1}}}$ | $\checkmark\checkmark$ | $\checkmark\checkmark$ | $\checkmark\checkmark$ | $\checkmark\checkmark$ | Fluorescencja | |
| SHG ^f | $\sqrt{\sqrt{4}}$ | $\checkmark\checkmark$ | $\checkmark\checkmark$ | $\checkmark\checkmark$ | $\checkmark\checkmark$ | Niecentrosymetryczność zespołów molekularnych | |
| FLIM ^f | $\sqrt{\sqrt{2}}$ | $\sqrt{}$ | $\sqrt{}$ | $\sqrt{}$ | $\sqrt{}$ | Czasy życia fluorescencj | CH16-Popp ARI 25 May 2015 |
| Raman | $\sqrt{\sqrt{\sqrt{1}}}$ | \checkmark | 111 | J.J. | \checkmark | Drgania cząsteczek | |
| SRS | $\sqrt{\sqrt{2}}$ | $\sqrt{}$ | chemiczny √√ | odcisk | palca "Finge | Print " Drgania cząsteczek | |
| CARS | $\sqrt{\sqrt{2}}$ | $\sqrt{}$ | $\checkmark\checkmark$ | $\checkmark\checkmark$ | $\checkmark\checkmark$ | Drgania cząsteczek | |

14:47

JAK SPEKTROSKOPIA I OBRAZOWANIE RAMANA WSPOMAGAJĄ BADANIA NAD **RAKIEM?**

BIOMARKERY RAMANA ZMIAN NOWTWOROWYCH





Surmacki J, Brozek-Pluska B, Kordek R, Abramczyk H, The lipid-reactive oxygen species phenotype of breast cancer. Raman spectroscopy and mapping, PCA and PLSDA for invasive ductal carcinoma and invasive lobular carcinoma. Molecular tumorigenic mechanisms beyond Warburg effect, Analyst, 2015, 140, 2121 - 2133, (IF=4.2)

JAK SPEKTROSKOPIA I OBRAZOWANIE RAMANA WSPOMAGAJĄ BADANIA NAD RAKIEM??

• OPTYCZNA BIOPSJA



Progress in Biophysics and Molecular Biology 108 (2012) 74–81
Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Progress in Biophysics and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pbiomolbio

Review

Raman 'optical biopsy' of human breast cancer

Halina Abramczyk^{a, *}, Beata Brozek-Pluska^a, Jakub Surmacki^a, Joanna Jablonska-Gajewicz^b, Radzisław Kordek^b

^a Technical University of Lodz, Institute of Applied Radiation Chemistry, Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Lodz, Poland ^b Medical University of Lodz, Department of Pathology, Chair of Oncology, Lodz, Poland

ARTICLE INFO ABSTRACT

Article history: Available online 19 November 2011 Keywords:

Reywords: Raman spectroscopy Raman mapping Medical diagnostics Breast cancer Raman imaging (RI) is a novel method of medical diagnostics of human breast cancer and has a potential to become a routine optical biopsy. Up to date the present study is the most statistically reliable Raman analysis based on data of normal, benign, and cancerous breast tissues for 146 patients. This paper present the first Raman 'optical biopsy' images of the normal and cancerous breast tissue of the same patient. The results presented here demonstrate the ability of Raman spectroscopy to accurately characterize cancer tissue and distinguish between normal (noncancerous) and cancerous types. The results provide evidence that carotenoids and lipids composition of cancerous breast tissue differs significantly from that of the surrounding noncancerous breast tissue and may be a key factor responsible for mechanisms of carcinogenesis. We have found that fatty acid composition of the cancerous breast tissue is markedly different from that of the surrounding noncancerous breast tissue. The cancerous breast tissue is use seems to be dominated by the metabolism products of the aradidonic aid - derived cyclic eicosanoids catalyzed by cyclooxygenase, while the noncancerous breast tissue is dominated by monounstaturated objec aid and its derivatives.

 $\ensuremath{\textcircled{}}$ 0 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2.012.

H. Abramczyk, B. Brozek-Pluska, J. Surmacki, J. Jablonska-Gajewicz, R. Kordek, *PBMB* 108 (2012) 74-81

RAMANA

Kompletność resekcji chirurgicznej jest kluczowym czynnikiem w prognozowaniu przeżywalności chorych na nowotwory. Margines bezpieczeństwa może być dodatni, co oznacza, że nie wszystkie komórki rakowe zostały usunięte podczas operacji. Pacjenci z dodatnim marginesem wymagają ponownej operacji, aby upewnić się, że cały nowotwór został usunięty. Zaletą "biopsji Ramana" jest to, że dostarcza bezpośredniej informacji biochemicznej (odcisk palca) w czasie rzeczywistym, nie jest podatna na subiektywne interpretacje i monitoruje tkankę biologiczną bez czynników zewnętrznych, w przeciwieństwie do oceny histopatologicznej.

WIRTUALNA HISTOPATOLOGIA RAMANA





Abramczyk H et al., patent application

STANDARDOWA HISTOPATOLOGIA H&E

OBRAZ HISTOPATOLOGII RAMANOWSKIEJ

- Szybka analiza histopatologiczna w praktyce klinicznej
- Analiza histopatologiczna bez znaczników zewnętrznych (bez procedur barwienia)
- Diagnostyka w czasie rzeczywistym w celu uzyskania dostępu do marginesu bezpieczeństwa podczas operacji nawigowanej ramanowsko
- Wysoka rozdzielczość przestrzenna (małe zmiany nowotworowe można łatwo zidentyfikować)
- Diagnoza obiektywna (bez interpretacji człowieka, widma Ramana)
- Rozróżnianie stopni rozwoju nowotworów z wysoką specyficznością i czułością(ok. 90%)
- Monitorowanie heterogenności tkanki nowotworowej

SPEKTROSKOPIA RAMANA JAKO NARZĘDZIE NAWIGUJĄCE W BIOPSJI OPTYCZNEJ MÓZGU IN-VIVO



OPTYCZNA BIOPSJA RAMANA MÓZGU SZCZURA W LLSM







CZUŁOŚĆ MOLEKULARNA RÓŻNYCH METOD OBRAZOWANIA

Naukowcy pracują również nad stworzeniem aktywowanych molekularnie i ilościowych sond, które wytwarzają sygnał tylko wtedy, gdy wiążą się z określonym receptorem. Sondy te sa głównym celem obrazowania optycznego, w rozpraszania Ramana. tym ponieważ mechanizmy przełączników optycznych mogą być z natury elektroniczne lub wibracyjne.



Pogue et al., Adapted from Am. J. Roentgen 195, 321 (2010)

Obrazowanie molekularne wymaga czułości i swoistości. O jego zastosowaniu decyduje czułość obrazowania na niskie stężenia molekularne. Obrazowanie optyczne ma nanomolową czułość, podobną do metod takich jak PET i SPECT, i umożliwia wykrycie kilkunastu różnych znaczników molekularnych jednocześnie.



ŁATWOŚĆ WYKRYWALNOŚCI

POTENCJALNY WZROST SPECYFICZNOŚ

Wykrywalne cechy molekularne w tkance można podzielić na pięć kategorii fizjologicznych: strukturalne, metaboliczne, epigenetyczne, immunologiczne i genetyczne. Kluczowym czynnikiem ograniczającym większość metod obrazowania jest stosunek sygnału do szumu związany ze stężeniem "obrazowanej cechy". Ryc. 1 przedstawia wykrywalne markery molekularne w tkance (swoistość) w funkcji stężenia (czułość). Markery metaboliczne i markery immunologiczne (czynniki wzrostu, cytokiny czy hormony) mogą być wydzielane w stężeniach kilkakrotnie wyższych niż receptory powierzchniowe, co ułatwia ich wykrycie. Pogue et al. 2015





Glejak o wysokim stopniu złośliwości, komórki U-87 MG

Biologia raka z protokołami genomiki i proteomiki zapewnia tylko częściowy obraz patologii raka. Protokoły izolacji DNA, białek, lipidów lub organelli z komórek i tkanek obejmują rozerwanie niszczenie komórek w celu "otwarcia" komórek i uwolnienia badanych struktur komórkowych. W obrazowaniu ramanowskim i IR nie musimy rozrywać, niszczyć struktury komórek. aby dowiedzieć się ich składzie 0 biochemicznym np. składzie kropli lipidowych, mitochondriów, cytoplazmy, jądra lub błony, w tym w żywych komórkach.

Bright field

Raman imaging

Fluorescence imaging of Oil Red O

Bright field after lipid staining with Oil Red O



ANALIZA POJEDYNCZEJ KOMÓRKI TECHNIKĄ RAMANA: NOWA JAKOŚĆ W TECHNIKACH "OMICS"

 Połączenie metod immunohistopatologii i profilowania genów jest uważane za złoty standard identyfikacji wielu podtypów raka. Podejścia diagnostyczne mają jednak ograniczenia, takie jak fałszywie dodatnie wyniki, długi czas analizy, ból i urazy pacjentów, co zachęca badaczy do odkrywania nowych, nieinwazyjnych, pozbawionych znaczników i mniej bolesnych metod. Spektroskopia Ramana (RS), technika spektroskopii oscylacyjnej, nie tylko zapewnia biochemiczny profil tkanek w czasie rzeczywistym, ale także pozwala zrozumieć przebieg choroby.

PRZYSZŁE KIERUNKI W BADANIACH NOWOTWORÓW TECHNIKI OMICZNE W BADANIACH NOWOTWORÓW (ANG.CANCER-OMICS)



Konwencjonalne obrazowanie biologii molekularnej vs obrazowanie Ramana

| Techniki konwencjonalne (np. SEM, IHC, H&E i obrazowanie fluorescencyjne) | Diagnostyka oparta na spektroskopii Ramana | |
|---|---|--|
| Destruktywne | Nieinwazyjne, niedestruktywne | |
| Wymaga wcześniejszej wiedzy dotyczącej oznaczanych cząsteczek (markerów) | Zapewnia pełen zakres informacji chemicznych w widmie Wymagane minimalne przygotowanie próbki, można zastosować bezpośrednio do żywych komórek i zwierząt | |
| Pracochłonne procedury przygotowawcze | | |
| Optymalizacja protokołu - często czasochłonna | Warunki pomiaru są łatwe i szybkie do optymalizacji | |
| Często wymagane utrwalenie, nieodpowiednie dla żywych komórek | Żywe komórki - można analizować bez powodowania uszkodzeń komórek | |
| Używanie znaczników może prowadzić do artefaktów | Bezznacznikowa | |
| Nie nadaje się do próbek niejednorodnych konwencjonalne metody często wymagały dużej liczby próbek substancji czystych do charakteryzacji próbki badanej | Może być wykorzystywana do analizy pojedynczych próbek lub uzyskiwania informacje in situ (bez przenoszenia ich na jakiś specjalny nośnik) | |
| Wysoka czułość (stężenie), ale niższa specyficzność (cechy molekularne) | Niższa czułość, ale wyższa specyficznc 💿 | |

Konwencjonalne obrazowanie biologii molekularnej vs obrazowanie Ramana

| Techniki konwencjonalne w histologii, cytologii i biologii molekularnej (H&E, IHC, qPCR, spektroskopia mas) | Diagnostyka oparta na spektro Ramana | skopii |
|---|--|------------------|
| Destruktywne | Nieinwazyjne, niedestruktywne | |
| Wymaga wcześniejszej wiedzy dotyczącej oznaczanych cząsteczek (markerów) | Zapewnia pełen zakres informacji chemicznych w widmie | |
| Przygotowanie próbki może zająć od kilku godzin do kilku dni (np. przygotowanie DNA, testy PCR i western blot) | Wymagane jest minimalne przygotowanie próbki lub brak specjalnego przygotowania próbki | |
| Optymalizacja protokołu - często czasochłonna (np. western blot i PCR) | Warunki pomiaru można łat zoptymalizować. Można wdrożyć pomiar " | wo "szybki |
| Utrata informacji przestrzennej (np. PCR i spektroskopia mas) | Zachowuje informacje przestrze Wysoka rozdzielczość przestrzenna mikrometra) | enne (poniżej |
| Wymagane znakowanie (np. PCR i western blot) możliwość tworzenia artefaktów, kosztochłonność (czas, odczynniki i pracochłonność) | Bezznacznikowa | © 2019 F |

qPCR Quantitative reverse transcription

Konwencjonalne obrazowanie biologii molekularnej vs obrazowanie Ramana

(badana omiczne)

| Techniki konwencjonalne (mikromacierz DNA, sekwencjonowanie, spektrometria mas, PCR, immunoprecypitacja, western blot) | Spektroskopia i obrazowanie | Ramana | |
|--|--|------------------|--|
| Destrukcyjne (np. QPCR i spektrometria mas) | Nieinwazyjne, niedestruktywne | | |
| Wymaga wcześniejszej wiedzy dotyczącej oznaczanych cząsteczek – markerów (np. IHC and qPCR) | Zapewnia pełen zakres informacji chemicznych w widmie | | |
| Przygotowanie próbki może zająć kilka dniu lub tygodni np. skrawanie i barwienie tkanek, posiewy mikrobiologiczne) | Wymagane jest minimalne lub żadne przygotowanie próbki, dzięki czemu są szybsze i tańsze w wykonaniu -> szybsza diagnoza pacjenta i mniejsze koszty dla szpitali | | |
| Optymalizacja protokołu - często czasochłonna (np. IHC i qPCR) | Warunki pomiaru są łatwe i szybkie o | lo optymalizacji | |
| Utrata informacji przestrzennej (np. QPCR i spektrometria mas) | Zachowuje informacje przestrzenne Wysoka rozdzielczość przestrzenna (poniżej mikrometra) | | |
| Często wymagane jest utrwalanie, nie nadaje się do żywych komórek | Żywe komórki - można analizować bez powodowania io uszkodzeń | | |
| Wymagane znakowanie (np. IHC i qPCR) nożliwość tworzenia artefaktów, kosztowne (czas, odczynniki i pracochłonność) | Bezznacznikowe | © 2019 Renishav | |
| | | RENISHAW | |

ZJWSKA LINIOWE I NIELINIOWE

 $P_{i} = \chi_{ii}^{(1)}E + \chi_{iik}^{(2)}E_{i}E_{k} + \chi_{iikl}^{(3)}E_{i}E_{k}E_{l}$

Konfokalna mikroskopia Ramana

Indukowana makroskopowa polaryzacja *P* dipoli elektrycznych w materiale zależy od natężenia przyłożonego pola optycznego *E*. W przypadku słabych pól elektrycznych (w porównaniu z polami wiążącymi elektrony z jądrem) zależność tę można sformułować jako zależność liniową. Wraz z konstrukcją laserów impulsowych o wysokich mocach szczytowych można by zbadać i zastosować więcej procesów nieliniowych. W takich procesach polaryzacja indukowana w materiale spowodowana padającym polem elektrycznym (światłem) nie jest już liniowo zależna od amplitudy pola. Istnieje wiele procesów, które mogą wystąpić w reżimie nieliniowym.

KONFOKALNA MIKROSKOPIA RAMANA

1.5 Confocal Raman Microscopy

Confocal microscopy requires a point source (usually a laser), which is focused onto the sample. The reflected light (Raman, fluorescence) is collected with the same objective and focused through a pinhole at the front of the detector (Fig. 3). This ensures that only light from the image focal plane can reach the detector, which greatly increases image contrast and with the proper selection of pinhole size, slightly increases resolution (max. gain in resolution: factor $\sqrt{2}$).

For Raman microscopy, the enhancement of image contrast and depth resolution is very important. An enhancement of the lateral resolution in confocal microscopy requires extremely small pinhole diameters and will therefore decrease the detection efficiency to a level usually unacceptable in most experiments (Fig. 4).





Fig. 8: Schematic illustration of the beam path for confocal Raman microscopy.




MIKROSKOPIA BLISKIEGO POLA PRZEŁAMUJE LIMIT DYFRAKCYJNY!

WITec

focus innovations





Rys. 3 Ilustracja ideej pomiarów SNOM (a) i zasada działania na podstawie instrukcji <u>Witec</u> near-field-<u>Raman imaging</u>, Ulm, Germany (b).

3.1 SNOM AC in transmission configuration



AFM (MIKROSKOPIA SIŁ ATOMOWYCH)



AFM nie jest oparty na rozdzielczości przestrzennej ograniczonej dyfrakcją. Rozdzielczość przestrzenna zależy od rozmiaru ostrza i jest znacznie poniżej granicy dyfrakcji. AFM to typ mikroskopii z sondą skanującą (SPM) o bardzo wysokiej rozdzielczości, z rozdzielczością rzędu ułamków nanometra, ponad 1000 razy lepszą niż granica dyfrakcji optycznej.



Wykrywanie poziomu światła laserowego w oparciu o matrycę fotodiodową

ROZDZIELCZOŚĆ PRZESTRZENNA RÓŻNYCH METODY OBRAZOWANIA



Zatem pomyślne obserwacje dynamiki nanostrukturalnej w żywych neuronach mogą w najbliższej przyszłości otworzyć możliwość wizualizacji morfologii plastyczności synaps w rozdzielczości nanometrycznej w czasie rzeczywistym.



AFM jest przydatna do uzyskiwania informacji topograficznej 3D próbek o rozdzielczości poprzecznej (w płaszczyźnie x / y) do 0,3 nm i rozdzielczości pionowej (w osi z) do 0,1 nm [26]. Próbki te obejmują skupiska atomów i cząsteczek [27], pojedyncze makrocząsteczki [28] i cząsteczki biologiczne (komórki, DNA, białka) [29, 30].

TOPOGRAFIA AFM W PROFILOWANIU POWIERZCHNI







SZTYWNOŚĆ

- Korzystając z tych krzywych siła-odległość (czasami nazywanych krzywymi wgłębienia (indentation)), można łatwo obliczyć sztywność, która jest definiowana jako pochodna siły F w odniesieniu do penetracji z
- (wgłębienie), dF/dz.



Mapa adhezji (Ē), mapa sztywności (F) i topografia(G) komórek glejaka ludzkiego U87MG.

ADHEZJA

 Kolejną interesującą cechą krzywej retracting jest niezerowa siła wymagana do oderwania końcówki sondy od powierzchni. Jest to tak zwana siła adhezji. Pojawia się z powodu słabych sił (takich jak siły van der Waalsa) działających między końcówką sondy a powierzchnią

próbki podczas kontaktu

Int. J. Mol. Sci. 2015, 16



Figure 1. Schematic representation of activated integrin and formation of ECM-integrin-cytoskeleton linkages in the focal adhesion site upon application of an external tensile load. Reproduced "in part" from [24] with permission of The Royal Society of Chemistry.



Figure 2. A typical force-distance curve recorded by AFM in force mode. Both the approaching and retracting curves are shown.

WARTOŚCI MODUŁU YOUNGA RÓŻNYCH PRÓBEK BIOLOGICZNYCH



Figure 4. Range of Young's modulus values of various biological samples. Young's modulus is an indicator of a cell's response to stress (force). Depending on their type, eukaryotic cells can exhibit very different mechanical properties. Neurons are extremely soft (down to 1 kPa), whereas bone cells are as robust as bacteria.

ZALETY OPTYKI NIELINIOWEJ W BADANIACH NOWOTWORÓW

| OPTYKA NIELINIOWA | OPTYKA LINIOWA |
|--|------------------------|
| Wywołanie zjawiska i odczyt dla oddziaływań nieliniowych uzyskuje się za pomocą co najmniej dwóch impulsów o dobrze określonych właściwościach: wiązka pompująca i wiązka sondująca. Różnica w stosunku do innych nieliniowych metod obrazowania optycznego, takich jak fluorescencja i niespójna mikroskopia Ramana. | |
| Odczyt wymuszony tłumi procesy niespójne, takie jak emisja spontaniczna | Emisja spontaniczna |
| Połączenie wysokiej mocy lasera i czułej detekcji skutkuje wysoką wydajnością interakcji nieliniowej | |
| Umożliwia to szybkie uzyskiwanie obrazów | Długie czasy akwizycji |
| Krótki czas naświetlania przez laser redukuje foto- uszkodzenie próbki spowodowane przez laser o dużej mocy | |
| Cząsteczki znakujące nie są potrzebne do przygotowania próbki, jak ma to miejsce w obrazowaniu fluorescencyjnym | |
| Jednym z kluczowych celów obecnych badań jest skrócenie czasu potrzebnego do uzyskania obrazu. Jest to często bezpośrednio związane z czułością wykrywania. Dzięki nowoczesnemu mikroskopowi skaningowemu czas akwizycji do 30 fs jest możliwy dla obrazu 512 na 512 pikseli | |

OPTYKA NIELINIOWA

OPTYKA LINIOWA

Zastosowanie femtosekundowych impulsów laserowych zamiast szeroko stosowanych impulsów pikosekundowych w kolejnej innowacyjnej funkcji mikroskopu. Dzięki zwiększonej szerokości pasma wzbudzenia krótszych impulsów femtosekundowe impulsy laserowe są w stanie lepiej wzbudzać izolowane rezonanse wibracyjne

Ważnym zagadnieniem ze względu na wysokie moce wiązek laserowych jest fotouszkodzenie próbki podczas analizy. Musi nastąpić zbalansowanie mocy wiązki wzbudzającej – dla impulsów zakresu NIR do około 40mW. Na takim poziomie niebezpieczeństwo uszkodzenia próbki jest relatywnie niższe niż np. dla mocy rzędu 10mW dla światła z zakresu widzialnego. Obrazowanie może być rejestrowane z wysoką czułością i szybkością. Ekspozycja pojedynczego pixela na wiązkę laserową jest poniżej 4 ms.



$$P_{i} = \chi_{ij}^{(1)}E + \chi_{ijk}^{(2)}E_{j}E_{k} + \chi_{ijkl}^{(3)}E_{j}E_{k}E_{l}$$





W naszym systemie absorpcji przejściowej metodą wiązki pompującej i sondującej występuje wiele procesów zachodzących w reżimie nieliniowym

METODY GENEROWANIA ULTRAKRÓTIKICH IMPULSÓW-SYNCHRONIZACJA MODÓW



Aby zbadać interakcje nieliniowe, potrzebujemy laserów impulsowych o wysokich mocach szczytowych

METODY SYNCHRONIZACJI MODÓW



a) przetworniki akusto-optyczne
b) przetworniki elektro-optyczne
c) nasycające się absorbenty
d) zjawisko samoogniskowania Kerra
e) zwierciadła Bragga

METODY GENEROWANIA KRÓTKICH IMPULSÓW-PRZEŁĄCZANIE DOBROCI (Q-SWITCHING)



Mechanizm generowania impulsu techniką z przełączaniem dobroci (Q-Switch), a) pompowanie, b) przełączanie dobroci,

- c) magazynowanie energii,
- d) generowanie impulsów

CHIRPED PULSE AMPLIFICATION (CPA)



CPA dla laserów został opracowany przez Donnę Strickland i Gérarda Mourou na University of Rochester w połowie lat 80., w 2018 roku otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki.



Oprócz tych najnowocześniejszych systemów badawczych, wielu komercyjnych producentów sprzedaje CPA na bazie Ti: szafiru o mocy szczytowej od 10 do 100 GW.



CPA to najnowocześniejsza technika używana przez wszystkie lasery o największej mocy (powyżej 100 TW)

ZJAWISKA NIELINIOWE DRUGIEGO RZĘDU



GENERACJA DRUGIEJ HARMONICZNEJ (SHG)



SPEKRTROSKOPIA ABSORPCJI PRZEJŚCIOWEJ METODĄ WIĄZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ

WYMUSZONE ROZPRASZANIE RAMANA

$$P_{i} = \chi_{ij}^{(1)}E + \chi_{ijk}^{(2)}E_{j}E_{k} + \chi_{ijkl}^{(3)}E_{j}E_{k}E_{l}$$

ZJAWISKA NIELINIOWE TRZECIEGO RZĘDU

WYMUSZONE ROZPRASZANIE RAMANA



ZJAWISKA NIELINIOWE TRZECIEGO RZĘDU



Rys. 6.19. Schematyczny diagram najczęściej stosowanych technik nieliniowego wymuszonego rozpraszania Ramana



KIERUNEK PROPAGACJI STYMULOWANEGO ANTYSTOKESOWSKIEGO ROZPRASZANIA RAMANA



SPEKTROSKOPIA ABSORPCJI PRZEJŚCIOWEJ METODĄ WIĄZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ



Eksperyment z wykorzystaniem pomiarów absorpcji przejściowej metoda wiązki pompującej i sondującej jest prawdopodobnie najczęściej stosowanym eksperymentem nieliniowym trzeciego rzędu. Może być używany do śledzenia wielu typów procesów relaksacji zależnych od czasu i dynamiki chemicznej i jest najczęściej używany do śledzenia relaksacji populacji, kinetyki chemicznej lub dynamiki pakietów falowych i dudnień kwantowych.

TRANSIENT ABSORPTION MICROSCOPY



Examples for nonlinear absorption processes

SPEKTROSKOPIA ABSORPCJI PRZEJŚCIOWEJ METODA WIĄZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ





detektor







ROLA RETINOIDÓW W PRZEWODZENIU SYGNAŁÓW KOMÓRKOWYCH

 Aby zrozumieć rolę retinoidów w przekazywaniu sygnałów komórkowych w wielu ważnych procesach w organizmach żywych, musimy znaleźć odpowiednie narzędzia do wykrywania retinoidów in vivo w celu monitorowania dystrybucji retinoidów w komórkach i tkankach oraz dynamiki czasowej.

Moja prezentacja nie jest w pełni wyczerpująca, ale raczej przedstawia przegląd ostatnich postępów z perspektywy badań w LLSM.

RETINOIDY



Retinyl palmitate

aldehyd

ester

alkohol

Podstawowa struktura hydrofobowej cząsteczki retinoidu składa się z cyklicznej grupy końcowej, polienowego łańcucha bocznego i polarnej grupy końcowej









Retinol

Retinoic acid

METABOLIZM RETINOIDÓW U KRĘGOWCÓW



Figure 5. Retinoid metabolism in vertebrates. Dietary *all-trans-\beta_{i}\beta*-carotene (i), obtained primarily from plants, is oxidatively cleaved in a symmetric manner by β -carotene monooxygenase I (BCMO I), yielding two molecules of *all-trans*-retinal (ii). Retinal can reversibly combine with an amino group to form a retinyl imine (Schiff base) (iv). Retinal is also subject to oxidation and reduction to form retinoic acid (iii) and retinol (vitamin A) v, respectively, the latter in a physiologically reversible manner. Retinoic acid can be converted into several conjugated and/or oxidized derivatives, some of which exert biological effects. Retinol also can be converted into several derivatives including retro-retinoids, saturated retinols, and phosphate conjugates. Retinol is also reversibly esterified to produce retinyl esters (vi), the main storage form of vitamin A in the body.

WCHŁANIANIE WITAMINY A, METABOLIZM I DOSTARCZANIE DO OKA

Komórki gwiaździste wątroby Komórki gwiaździste wątroby znajdują się pomiędzy hepatocytami a małymi naczyniami krwionośnymi w wątrobie. Charakteryzują się obecnością kropelek lipidowych i cienkimi wypustkami rozciągającymi się wokół naczyń krwionośnych. Ich aktywacja w uszkodzonej wątrobie prowadzi do wydzielania kolagenu i tworzenia się tkanki bliznowatej, prowadząc do przewlekłego zwłóknienia lub marskości.



FIGURE 30.1. Vitamin A absorption, metabolism, and delivery to the eye. This figure shows the mode of absorption of vitamin A and β carotene, the role of the liver, and transport of the vitamin A complex to the retina, ARAT: acyl coenzyme A retinol acyl transferase; AREH: acid retinyl ester hydrolase; CEL: carboxyl ester lipase; HL: hepatic lipase; LPL: lipoprotein lipase; LRAT: lacithin retinol acyl transferase; NREH: neutral retinyl ester hydrolase; RBP: retinol-binding protein.

Watroba gromadzi witamine A w postaci estru retinylu, gdy spożycie witaminy A przekracza zapotrzebowanie organizmu. W warunkach optymalnych dla witaminy A wiekszość uwolnionego retinolu jest przenoszona z hepatocytów do komórek gwiaździstych wątroby, gdzie retinol jest wiązany z CRBP2 i reestryfikowany przez LRAT, a następnie przechowywany jako estry retinylu w kropelkach cytoplazmatycznych lipidów.33 Przechowywanie służy również jako mechanizm detoksykacji. usuwając nadmiar "wolnego" retinolu. Gdy tkanki obwodowe wymagają retinolu, te zmagazynowane estry ulegaja hydrolizie, a retinol jest ponownie mobilizowany do hepatocytów. Hepatocyty są również głównym miejscem syntezy RBP. Nowo uwolniony retinol łączy się z apo-RBP, tworząc kompleks holo-RBP, który jest uwalniany z watroby do krwiobiegu.

Komórkowe białka wiążące retinoidy (CRBP) (ang. Cellular retinoid-binding proteins (CRBP))

Chylomikrony transportują zawarte w pożywieniu lipidy i estry z jelit do innych miejsc w organizmie.

LRAT ACYLOTRANSFERAZA RETINOLOWA LECYTYNY





a 1,2-diacyl-sn-

phosphocholine

glycero-3-







a 2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

an all-transretinyl ester

all-trans-retinol--[retinol-binding protein RBP]

LRAT przenosi grupę acylową z pozycji sn-1 fosfatydylocholiny na all-trans retinol, wytwarzając estry all-trans-retinylowe. Estry retinylu są magazynami witaminy A.

MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE W PATOGENEZIE GUZA MÓZGU

 Istnieje coraz więcej dowodów na to, że kwas retinowy i receptory kwasu retinowego (RAR) odgrywają ważną rolę w wywoływaniu zmian epigenetycznych i regulowaniu zmian epigenetycznych w karcynogenezie. <u>Subcell Biochem. 2014; 70: 129–149.</u>

Czy glejak wielopostaciowy jest złośliwą zmianą o podłożu epigenetycznym?

Cancers 2013, 5, 1120-1139; doi:10.3390/cancers5031120



cancers

GENY MODYFIKUJĄCE HISTONY I ZMIANY EPIGENETYCZNE W RDZENIAKU



KOMÓRKOWA TRANSDUKCJA SYGNAŁU

- Witamina A odgrywa ważną rolę w przewodzeniu sygnałów komórkowych w wielu ważnych procesach. Gradient protonowy wyzwala syntezę ATP. Istnieją dwa rodzaje generowania gradientu protonów.
- mechanizm aktywowany światłem w procesach widzenia (rodzina rodopsyn)

 łańcuch transportu elektronów tworzy gradient protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, który napędza syntezę ATP poprzez chemiosmozę.

 \bullet

Aktywowany światłem mechanizm generowania gradientu protonów



Aktywacja światłem wyzwala izomeryzację trans do cis związanego retinalu



Działa jak pompa protonowa; to znaczy wychwytuje energię świetlną i wykorzystuje ją do przemieszczania protonów przez błonę poza komórkę. Powstały gradient protonów w poprzek błony wyzwala syntezę ATP używaną do metabolizmu i fosforylacji przez syntazę ATP ŁAŃCUCH TRANSPORTU ELEKTRONÓW TWORZY GRADIENT PROTONÓW W POPRZEK WEWNĘTRZNEJ BŁONY MITOCHONDRIALNEJ, KTÓRY NAPĘDZA SYNTEZĘ ATP POPRZEZ CHEMIOSMOZĘ.



Image modified from "Oxidative phosphorylation: Figure 1", by OpenStax College, Biology (CC BY 3.0).

Overview: oxidative phosphorylation

cytoplasm



The **electron transport chain** is a series of proteins and organic molecules found in the inner membrane of the mitochondria. Electrons are passed from one member of the transport chain to another in a series of redox reactions. Energy released in these reactions is captured as a proton gradient, which is then used to make ATP in a process called **chemiosmosis**. Together, the electron transport chain and chemiosmosis make up **oxidative phosphorylation**. The key steps of this process, shown in simplified form in the

RETINOIDY ZWIĄZANE Z BIAŁKAMI

"WOLNE" RETINOIDY


RETINOIDY ZWIĄZANE Z BIAŁKAMI

- 1. H. ABRAMCZYK, *FEMTOSECOND PRIMARY EVENTS IN BACTERIORHODOPSIN. REVISION OF COMMONLY ACCEPTED INTERPRETATION OF ELECTRONIC SPECTRA OF TRANSIENT INTERMEDIATES*, J. CHEM.PHYS. 120 11120 (2004)
 - 1. A. TERENTIS, L.UJI, H. ABRAMCZYK, G. H. ATKINSON, *PRIMARY EVENTS IN BACTERIORHODOPSIN PHOTOCYCLE: TORSIONAL VIBRATIONAL DEPHASING IN THE FIRST EXCITED ELECTRONIC STATE*, CHEM. PHYS. 313(2005) 51-62



BR zawiera chromofor polienowy, retinal, który jest kowalencyjnie związany z resztą Lys216 białka przez protonowaną zasadę Schiffa

RETINOIDY ZWIĄZANE Z BIAŁKAMI



Absorpcja fotonu z zakresu widzialnego (568 nm) inicjuje w bakteriorodopsynie cykliczną sekwencję reakcji, która kończy się w milisekundowej skali czasu (Schemat 1), prowadząc do przemieszczania się protonu od strony cytoplazmatycznej do powierzchni zewnątrzkomórkowej i potencjał elektrochemiczny wykorzystywany jest przez bakterię do utrzymania jej metabolizmu. Jak widać na schemacie 1, obserwowane stałe czasowe fotocyklu BR obejmują około 11 rzedów. Fotocykl można podzielić na dwie odrębne części. Pierwsza obejmuje bardzo szybkie procesy molekularne zachodzące w femto- i pikosekundowej skali czasowej pod wpływem wzbudzenia BR-568 (all-trans), aż do powstania związku pośredniego K o konfiguracji 13-cis. Druga część fotocyklu jest znacznie wolniejsza.

FOTOAKTYWACJA BAKTERIORODOPSYNY



- Fast imaging AFM na BR Mutant D96N
- w 10 mM TRIS, 150 mM KCl, pH 7.6
- AM AFM z A=1.0 nm
- 1 kl / s (64 px2)
- Eksperyment trwał 200 fps
 - To samo miejsce (te same molekuły)





x,y-range=18x18nm², z=325pm

| ¹ Ando | T et al., | Nanotechnology | 23 (2012) 062001 |
|-------------------|-----------|----------------|---------------------|
| | | | |

Aby zoptymalizować AFM do . badania dynamicznych układów biologicznych, każdy element AFM można zmodyfikować celu W zwiększenia szybkości skanowania AFM. W rezultacie szybki AFM (HS-AFM) osiągnał prędkości skanowania o kilka rzędów wielkości szybsze niż w przypadku konwencjonalnego umożliwiając w ten AFM, sposób monitorowanie dynamiki konformacyjnej pojedynczych białek na substratach z nodsekundowa

MIKROSKOPIA SZEROKOPASMOWA CARS (BCARS) VS MIKROSKOPIA POJEDYNCZEJ CZĘSTOTLIWOŚCI CARS

 W celu zbadania pełnego widma BCARS, zwykle stosuje się szerokopasmową wiązkę Stokesa. Szerokopasmowe supercontinuum może być generowane wewnątrz włókna kryształu fotonicznego. Często używany jest detektor CCD, w którym binning pionowy generuje liniowy układ nieujemnych liczb całkowitych, tj. intensywności sygnału na liczbę falową. W każdym punkcie obrazu zbierane jest pojedyncze widmo, można przeprowadzić skanowanie próbki w celu uzyskania mapy widmowej.

CZSOWOROZDZIELCZY CARS DOMENA CZĘSTOŚCI

UNIVERSITY OF ARIZONA DEPARTMENT OF CHEMISTRY 85 721 TUSCON, AZ, USA

- H. Abramczyk, Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin. Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates, J. Chem. Phys. 120 11120 (2004)
- A. Terentis, L. Uji, H. Abramczyk, G. H. Atkinson, Primary events in Bacteriorhodopsin photocycle: torsional vibrational dephasing in the first excited electronic state, Chem. Phys. 313(2005) 51-62

CARS W SAKLI PIKOSEKUND





Fig. 4.5. Directions of propagation of the stimulated anti-Stokes scattering

Why the phase matching condition, $\Delta \mathbf{k} = 0$, that is always met for the stimulated Stokes scattering, it is not automatically complied with the stimulated anti-Stokes scattering? It results from the fact that the phase of vibrating molecules is defined by the more intense Stokes scattering.

To sum up, intense light of the frequency ω_L can cause intense stimulated Raman scattering: Stokes $\omega_s = \omega_L - \omega_{wib}$ and anti-Stokes $\omega_{AS} = \omega_L + \omega_{wib}$. As a result of photon interaction with matter, the energy exchange via optical phonons (or vibrations) takes place leading to the formation in a medium the third-order polarisation, $P^{(3)} \propto \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l$, that consists of the components changing with the frequency $\omega_{wib} = \omega_L - \omega_S$, $\omega_S = \omega_L - \omega_{wib}$ and $\omega_{AS} = \omega_L + \omega_{wib}$. The polarisation components generate new waves of the frequencies ω_S and ω_{AS} known as the stimulated Stokes and anti-Stokes Raman scattering. The phase matching condition is met in all directions. The anti-Stokes stimulated scattering is observed in directions, \mathbf{k}_{AS} , for which the phase matching condition $2\mathbf{k}_L - \mathbf{k}_S = \mathbf{k}_{AS}$ is met.

W skrócie, impulsy światła z wąskopasmowego (<4 cm1, FWHM) lasera barwnikowego pracującego przy 663 nm (11) i szerokopasmowego (700 cm1) lasera barwnikowego działającego w zakresie 700–750 nm (ls) są dopasowane fazowo w płynącym BR (natywny lub zmodyfikowany pigment siatkówki), generując sygnały CARS obejmujące obszar widmowy (las) około 700 cm1. Aby objąć cały interesujący zakres widmowy 750–1750 cm1, 11 jest odostrojony o kilka nanometrów lub ls jest regulowany przy użyciu innego roztworu barwnika laserowego.

CARS: teoria

intensywność sygnału CARS :

 $I_{as}(\omega_{as}) \mid \mu \mid \chi^{(3)}(\omega_{as}, \omega_1, \omega_s) \mid^2 . I_1^2 . I_s(\omega_s) . G^2$

Znormalizowana funkcja dopasowania widma CARS (2-species mixture):

$$\frac{I_{as}^{Sample}}{I_{as}^{Reference}} = \mu^{2} \left| 1 + (1 - \eta) \mathop{\otimes}\limits_{j=1}^{N_{A}} \frac{A_{j} e^{i\Theta_{j}}}{\Delta_{j} - i} + \eta \mathop{\otimes}\limits_{k=1}^{N_{B}} \frac{A_{k} e^{i\Theta_{k}}}{\Delta_{k} - i} \right|$$

Natężenie widma bez tła (linie Lorentza):

 $\Delta_{i} = (\Omega_{i} - (\omega_{1} - \omega_{s})) / \Gamma_{i}$

$$I_{raman} = \overset{N}{\overset{a}{\mathbf{a}}} \frac{A_{j}^{2}}{(\Omega_{j} - (\omega_{1} - \omega_{s}))^{2} + \Gamma_{j}^{2}}$$

 $\begin{aligned} & \Omega = Band \ Origin \\ & A = Amplitude \\ & \Gamma = Bandwidth \\ & \Theta = Vibrational \ phase \\ & \eta = relative \ conc. (0 \pounds \ \eta \ \pounds 1) \\ & \mu = Scaling \ factor \\ & N = Number \ of \ vibrations \\ & \chi^{(3)} = third-order \\ & susceptibility \end{aligned}$





Andrew C. Terentis, Laszlo Ujj, Halina Abramczyk, George H. Atkinson* Chemical Physics 313 (2005) 51–6

NATYWNA BR-568 I NIEZMKNIĘTE ANALOGI BR 6.11 AND 6.9

Native BR-568 and unlocked analogs BR 6.11 and 6.9







Primary events in the bacteriorhodopsin photocycle:Torsional vibrational dephasing in the first excited electronic stateAndrew C. Terentis, Laszlo Ujj, Halina Abramczyk, George H. Atkinson* Chemical Physics 313 (2005) 51–6

Locked analogs BR 5.12 and BR 5.13



W przypadku BR5.12 wiązanie retinalu C13 = C14 jest zablokowane w konfiguracji trans przez sztywny pięcioczłonowy pierścień węglowy

NATYWNA BR-568 I NIEZMKNIĘTE ANALOGI BR 6.11 AND 6.9

Native BR-568 and unlocked analogs BR 6.11 and 6.9





Primary events in the bacteriorhodopsin photocycle:Torsional vibrational dephasing in the first excited electronic stateAndrew C. Terentis, Laszlo Ujj, Halina Abramczyk, George H. Atkinson* Chemical Physics 313 (2005) 51–6

Badane tutaj sztuczne pigmenty BR zawierają retinal z sześcioczłonowym pierścieniem węglowym wbudowanym w szkielet retinalu, który nie zawiera wiązań 13C = C14 do izomeryzacji

NATYWNA BR-568 I NIEZMKNIĘTE ANALOGI BR 6.11 AND 6.9



vibrational spectra of BR-570 (top), J-625 (center, derived from the 0-ps PTR/CARS data), and K-590 (bottom, derived from the 200-ps PTR/CARS data) in the 1200–1700 cmlregion





by a rigid, five-membered carbon ring



Andrew C. Terentis, Laszlo Ujj, Halina Abramczyk, George H. Atkinson* Chemical Physics 313 (2005) 51–6



JAKIE INFORMACJE O DYNAMICE DRGAŃ ZAWIERA KSZTAŁT PASMA CARS?

1 Maxwell equation

$$\nabla^{2}E + \frac{1}{c^{2}}\frac{\partial^{2}(E(\vec{r},t))}{\partial t^{2}} = -\frac{4\pi}{c^{2}}\frac{\partial^{2}P}{\partial t^{2}}$$

2
$$\langle \vec{P}(\vec{r},t) \rangle = T_r(\vec{P}(\vec{r},t)) \rho(t)$$
 density operator

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} [H(t), \rho] \longrightarrow \rho(t) = \rho_0 \exp(-iHt) \\ H(t) = H_0$$

$$\rho = \rho^0 + \rho^{(1)} + \rho^{(2)} + \rho^{(3)} + \dots$$

$$P^3; S^{(3)}(t); \chi^{(3)}(\omega)$$

4 Time domain response

5

37

 $S_{CARS} \sim \left| S^{(3)}(t_3, t_2, t_1) \right|^2$

four time correlation functions $S^{(3)}(t) \Rightarrow \langle V(t_1)V(t_2)V(t_3)V(0) \rangle$ \downarrow factorization of the Green functions $\langle V(t)V(0) \rangle$ two time correlation functions





7
$$Q = Q_0 e^{-i(\omega_0 + \Delta \omega(t))t}$$
8
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i(\Delta \omega(t))t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i\omega_0 t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i\omega_0 t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i\omega_0 t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i\omega_0 t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i\omega_0 t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i\omega_0 t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i\omega_0 t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-i\omega_0 t} \rangle e^{-i\omega_0 t}$$
9
$$Q = Q_0 \langle e^{-$$

NATYWNA BR-568 I NIEZMKNIĘTE ANALOGI BR 6.11 AND 6.9



vibrational spectra of BR-570 (top), J-625 (center, derived from the 0-ps PTR/CARS data), and K-590 (bottom, derived from the 200-ps PTR/CARS data) in the 1200–1700 cmlregion

Locked analogs BR 5.12 and BR 5.13



For BR5.12, the C13=C14 retinal bond is locked in the trans configuration by a rigid, five-membered carbon ring

Locked analogs BR 5.12 and BR 5.13

BR 5.12



BR 5.13

28



DYNAMIKA ELEKTRONOWA BAKTERIORODOPSYNY I JEJ ZMODYFIKOWANYCH ANALOGÓW

Absorpcja ze stanu wzbudzonego





J. Phys. Chem. B, Vol. 103, No. 24, 1999 Transient spectral changes following excitation of native, all-trans, bR (bR570). Time values represent the delay between zero time, determined as described in the text and the probe pulse. Top: fast time scale; bottom: slower time scale. Insets enlarge the vertical scale of the intermediate region, where the DOD values are relatively small. Data points are missing around the interfering 620nm excitation wavelength.

Emisja wymuszona

Unanswered questions

- why the femtosecond spectra of native BR-568 and locked analogs are identical?
- why the stimulated emission spectrum does not overlap with the spontaneous fluorescence?

Absorpcja ze stanu wzbudzonego



Wybielanie stanu podstawowego

Wyniki wykazały, że początkowe ultraszybkie zmiany widmowe obserwowane w natywnej BR są praktycznie identyczne z tymi zarejestrowanymi dla zmodyfikowanych analogów, w tym wzrost pasm absorpcji / emisji (460/860 nm) w czasie krótszym niż 30 fs

Wybielanie stanu podstawowego

Emisja wymuszona

ODPOWIEDZI LINIOWE I NIELINIOWE SPRZĘŻENIE WIBRACYJNE MODEL TEORETYCZNY

$$I(\omega) = (2\pi)^{-1} \left[1 - \exp\left(-\frac{\hbar\omega}{kT}\right) \right]_{-\infty}^{+\infty} dt e^{i\omega t} \left\langle M_{01}^{+}(0)M_{10}(t) \right\rangle$$

 $S_{HB}(\omega_{1}\omega_{2}\tau) = \left(\frac{1}{\hbar}\right)^{3} 2\omega_{2} \int_{0}^{\infty} 2\omega_{2} \int_{0}^{\infty} dt_{1} \int_{0}^{\infty} dt_{3} \left[e^{i(\omega_{2}t_{3}+i\omega_{1}t_{1})\chi(t_{3}+t_{1})} \left[R_{1}^{H}(t_{3},\tau,t_{1}) + R_{4}^{H}(t_{3},\tau,t_{1})\right]\right] + e^{(i\omega_{2}t_{3}-i\omega_{1}t_{1})\chi(t_{3}-t_{1})} \left[R_{2}^{H}(t_{3},\tau,t_{1}) + R_{3}^{H}(t_{3},\tau,t_{1})\right]$

<u>Shaul Mukamel Principles</u> of Nonlinear Optical Spectroscopy



PROFILE WYPALANIA DZIUR



mod wysokiej częstości (drganie rozciągaj ece C =C), a nie mod torsyjny, jest podstaw owym modem pochłani ania energii

H. Abramczyk, Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin. Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates, J. Chem. Phys. 120 11120 (2004)

nhomogeneous

POPRZEDNIE MODELE



Pomimo dużej różnorodności tradycyjnych i współczesnych podejść do metod eksperymentalnych i teoretycznych stosowanych do badania rodziny rodopsyn odpowiedzialnych za procesy widzenia, nie ma ogólnie przyjętego modelu wyjaśniającego ultraszybkie procesy pierwotne

WNIOSEK-1 PROPONOWANY MECHANIZM ZDARZEŃ PIERWOTNYCH W FOTOCYKLU BR



H. Abramczyk, Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin. Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates, J. Chem. Phys. 120 11120 (2004)

WOLNE RETINOIDY I RETINOIDY ZWIĄZANE Z BIAŁKAMI

Czy dynamika femtosekundowa retinoidów "wolnych" w roztworze jest inna niż retinoidów związanych z białkami?

Odpowiedź na to pytanie jest bardzo ważna, ponieważ dynamika femtosekundowa może monitorować wolny retinol i retinol związany z białkami w komórkach, dostarczając informacji o mechanizmie wychwytu retinolu i sygnalizacji przez STRA6



Model of the mechanism of retinol uptake and signalling by STRA6

WOLEN RETINOIDY W ROZTWORZE



SPEKTROSKOPIA FEMTOSEKUNDOWA ABSORPCJI PRZEJSCIOWEJ METODA WIĄZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ



SPEKTROSKOPIA FEMTOSEKUNDOWA ABSORPCJI PRZEJSCIOWEJ METODĄ WIĄZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ



Mierzony sygnał pumpprobe jest proporcjonalny do części urojonej polaryzacji

$$\Delta I(\tau) = 2\omega_{sig}\ell \operatorname{Im}\left[E'_{pr}P^{(3)}(\tau)\right]$$

Eksperyment w konfiguracji pump-probe jest prawdopodobnie najczęściej stosowanym eksperymentem nieliniowym trzeciego rzędu. Może być używany do śledzenia wielu typów procesów relaksacji zależnych od czasu i dynamiki chemicznej i jest najczęściej używany do śledzenia relaksacji populacji, kinetyki chemicznej lub dynamiki pakietów fal i dudnień kwantowych.

WYBIELANIE STANU PODSTAWOWEGO RETINOIDÓW W ROZTWORZE (N-HEKSAN, KĄT MAGICZNY)



WYBIELANIE STANU PODSTAWOWEGO RETINOIDÓW W ROZTWORZE (CHLOROFORM)



 Retinoic acid
 25.3 ± 3.4 ps
 219.8 ± 29.3 ps

 retinol
 60.5 ± 10.5 ps
 325 ± 161.4 ps

ABSORPCJA W STANIE WZBUDZONYM RETINOIDÓW W ROZTWORZE (N-HEKSAN, KĄT MAGICZNY



ABSORPCJA W STANIE WZBUDZONYM RETINOIDÓW W ROZTWORZE (CHLOROFORM)







 $\frac{S_0}{(1A_g^{-1})}$

Car

doskonale czasowi powrotu do stanu S0 w granicach 9,4 ps.

BETA-KAROTEN
ALL-TRANS RETINAL



ubsorption.



Fig. Poziomy elektronowe dla all-trans retinalu . Składają się z trzech wzbudzonych stanów singletowych w obszarze widmowym bliskiego UV i widzialnym (ryc. 2). Stany wzbudzone S₂ $A_g(\pi\pi^*)$ i S₃ $B_u(\pi\pi^*)$ reprezentują polienową strukturę elektronową, $S_1(n\pi^*)$ reprezentuje grupę aldehydową all-trans retinalu

ALL-TRANS RETINOL



325 nm



METODY OBRAZOWANIA MIKROSPEKTROSKOPII MOLEKULARNEJ I LASEROWEJ





Obrazowanie Ramana Obrazowanie IR



Obrazowanie SNOM



Obrazowanie AFM

Chociaż w niektórych przypadkach dynamika jest dobrym wskaźnikiem zmian metabolicznych w komórkach, równie ważna może być znajomość zawartości komórkowej i rozmieszczenia retinoidów wewnątrz komórki.

Nie musimy rozrywać komórek, aby przeanalizować struktury komórkowe

WIDMA RAMANA RETINOIDÓW



KONWENCJONALNA BIOLOGIA MOLEKULARNA



IZOLACJA DNA z komórek i tkanek

- DNA można ekstrahować z wielu typów komórek. Pierwszym krokiem jest liza lub rozerwanie komórki. Można to zrobić także poprzez homogenizacje tkanki. Po rozerwaniu komórek dodaje się roztwór soli, taki jak NaCl i roztwór detergentu zawierający związek SDS (sododecylosiarczan).
- Izolacja mitochondriów z komórek i tkanek
- Protokoły izolacji mitochondrialnej obejmują dwa procesy rozbicie komórek w celu ich otwarcia i uwolnienia struktur komórkowych oraz wirowanie różnicowe w celu odzyskania frakcji wzbogaconych w mitochondria.

W OBRAZOWANIU RAMANOWSKIM NIE MUSIMY ROZRYWAĆ KOMÓREK, ABY ANALIZOWAĆ STRUKTURY KOMÓRKOWE, ABY WNISOKOWAĆ O ICH SKŁADZIE BIOCHEMICZNYM



Abramczyk et al. LLSM, 2018

Biologia raka z protokołami genomiki i proteomiki zapewnia tylko częściowy patologii raka. obraz Protokoły izolacji DNA, białek, lipidów lub organelli komórek i tkanek Ζ obejmują rozerwanie komórek w celu otwarcia uwolnienia komórek i struktur komórkowych. W obrazowaniu ramanowskim i IR nie

musimy rozbijać komórek, aby dowiedzieć się o ich składzie biochemicznym kropelek lipidów, mitochondriów, cytoplazmy, jądra lub błony w żywych komórkach.

Jasne pole Bright field

Obrazowanie Ramana Raman imaging

Obrazowanie fluorescencyjne, barwienie czerwienią oleistą Fluorescence imaging of Oil Red O

Jasne pole, barwienie czerwienią oleistą Bright field after lipid staining with Oil Red O









System Ramana do diagnostyki w czasie rzeczywistwe podczas neurooperacji w trybie in-vivo



BIOPSJA OPTYCZNEA MÓZGU SZCURA IN-VIVO W LLSM







NAWIGOWANA RAMANOWSKO BIOPSJA OPTYCZNA MÓZGU SZCURA IN-VIVO



BIOPSJA OPTYCZNA MÓZGU SZCZURA IN-VIVO W LLSM





MÓZG EX VIVO

MÓZG IN VIVO

WIZUALIZACJA KROPLI LIPIDOWYCH

 Chociaż w niektórych przypadkach morfologia jest dobrym wskaźnikiem zmian metabolicznych w komórkach, równie ważna może być znajomość zawartości komórkowej. W przypadku LD zmiany nasycenia wiązań i długości łańcuchów można powiązać z chorobami. KROPLE LIPIDOWE W NORMALNYCH KOMÓRKACH GRUCZOŁU PIERSIOWEGO MCF10A W PORÓWNANIU Z KOMÓRKAMI NOWOTWOROWYMI ŁAGODNYMI MCF7 I AGRESYWNIE ZŁOŚLIWYMI MDA-MB-231



Celem naszych badań będzie ocena wpływu agresywności raka na ilość kropli lipidowych i ich skład chemiczny w niezłośliwych i złośliwych ludzkich liniach komórkowych.



MDA-MB-231 – wysoce agresywne



KROPLE LIPIDOWE W ASTROCYTACH VS GLEJAK WIELOPOSTACIOWY U87



- Komórki rakowe zawierają zwiększoną liczbę kropli lipidowych w porównaniu z normalnymi komórkami.
- Zwiększona ilość kropli lipidowych koreluje ze zwiększoną agresywnością raka.
- Zwiększona ilość cytoplazmatycznych kropli lipidowych w ludzkich komórkach nowotworowych może być ściśle związana ze zwiększonym tempem syntezy lipidów w tkankach nowotworowych.

2018

PRZESTRZENNE ROZMIESZCZENIE RETINOIDÓW W NORMALNYCH ASTROCYTACH I KOMÓRKACH GLEJAKA



NORMALNE ASTROCYTY





PRZESTRZENNE ROZMIESZCZENIE RETINOIDÓW W KOMÓRKACH GLEJAKA: RETINOIDY W MITOCHONDRIACH, KROPLACH LIPIDOWYCH, JADRZE



W obrazowaniu ramanowskim nie musimy niszczyć komórek, by analizować struktury komórkowe, aby dowiedzieć się o składzie biochemicznym kropli lipidowych, jądra, mitochondriów



5

PRZESTRZENNE ROZMIESZCZENIE RETINOIDÓW W NORMALNYCH ASTROCYTACH I GLEJAKU. REZONANSOWE WIDMA RAMANOWSKIE I WIDMA POLARYZACYJNE



MAPY RAMANOWSKIE, PRZESTRZENNE ROZMIESZCZENIE RETINOIDÓW W RDZENIAKU (TKANKA MÓZGU CZŁOWIEKA) STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI IV



OBRAZOWANIE RAMANA I NMR PRZESTRZENNEGO ROZMIESZCZENIA RETINOIDÓW W ASTROCYTOMIE (LUDZKA TKANKA MÓZGU) STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI II / III





WNISOKI

- Zidentyfikowano dwa rodzaje kropli lipidowych w normalnych astrocytach i komórkach nowotworowych glejaka o różnym składzie chemicznym, funkcjach biologicznych i właściwościach wibracyjnych.
- Dwa rodzaje kropli lipidowych mają różne funkcje magazynowanie energii i sygnalizację.
- Ich ekspresja i skład biochemiczny zależą od agresywności raka.

- Pierwsza grupa jest głównie wypełniona TAG-ami i zajmuje się magazynowaniem energii.
- Druga grupa jest głównie wypełniona estrami retinylu i białkami wiążącymi retinol i bierze udział w sygnalizacji, zwłaszcza sygnalizacji szlaku JAK2 / STAT6.



WNISOKI OGÓLNE

Obrazowanie ramanowskie wraz z ultraszybą spektroskopią czasowo-rozdzielczą ujawnia funkcjonalne aspekty retinoidów na nowym poziomie molekularnym. To multidyscyplinarne podejście do "wolnych" i związanych z białkami retinoidów w połączeniu z odpowiednimi hodowlami komórkowymi, tkankami ex vivo, modelami zwierzęcymi mogą być szczególnie pomocne w transferze wiedzy naukowej do procedur terapeutycznych stosowanych na zwierzętach i ostatecznie ludziach.

SPEKTROSKOPIA CZASOWO-ROZDZIELCZA I STYMULOWANA SPEKTROSKOPIA RAMANA

stimulated Raman spectroscopy [158–161]. These methods should be able to help resolve the ongoing problems of understanding the pattern of carotenoid excited singlet states and their involvement in light harvesting. They should be able to resolve the key issues of which absorption changes reflect discrete electronic states and which come from different vibrational ones. Sorting this out will hopefully remove many of the current controversies.