UNIWERSYTET RZESZOWSKI

Kolegium Nauk Medycznych

mgr inż. Kornelia Łach

Diagnostyka spektroskopowa guzów niskozróżnicowanych drobnookrągłokomórkowych u dzieci

Praca doktorska

Promotor: **dr hab. Józef Cebulski, prof. UR**

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

Rzeszów, 7.05.2023 r.

Serdeczne podziękowania dla
dr hab. Józefa Cebulskiego, prof. UR
oraz dr hab. n. med. Radosława Chaber, prof. UR
za wszechstronną pomoc, cenne wskazówki
oraz okazaną życzliwość.
Dziękuję również wszystkim osobom
które swym wsparciem i dobrym słowem
przyczyniły się do ukończenia przeze mnie tej pracy,
a w szczególności Mamie oraz Mężowi.

SPIS TREŚCI

Zestawienie skrótów użytych w rozprawie 5
Wprowadzenie……...…6
Cel pracy ……..……..……9
Rozdział 1. Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni (FTIR) i spektroskopia rozproszenia ramanowskiego w onkologii……..……10
1.1 Spektroskopia Ramana i FTIR – podstawy fizyczne ……...…….11
1.1.1 Technika FTIR.....11
1.1.2 Technika Ramana.....13
1.1.3 Spektroskopia Ramana i w podczerwieni jako metody komplementarne.....14
Rozdział 2. Drobnokomórkowe nowotwory niezróżnicowane…….....15
2.1 Medulloblastoma – rdzeniak zarodkowy.....16
2.1.1 Objawy. 17
2.1.2 Diagnostyka oraz leczenie 17
2.2 Mięsak Ewinga 18
2.2.1 Czynniki ryzyka. Objawy. Diagnostyka.....18
2.2.2 Leczenie ES.....19
Rozdział 3. Metodyka przeprowadzonych badań 21
3.1 Medulloblastoma……21
3.1.1 Charakterystyka badanej populacji. Dane medyczne.....21
3.1.2 Preparatyka próbek – próbki parafinowane ……27
3.2 Mięsak Ewinga……...……27
3.2.1 Charakterystyka badanej populacji. Dane medyczne.....27
3.2.2 Preparatyka próbek – odparafinowane próbek……...….28
3.3 Spektrometr Ramana – charakterystyka, parametry pomiaru 29
3.4 Spektrometr w podczerwieni – charakterystyka, parametry pomiaru 29
3.5 Analiza danych spektralnych 30
Rozdział 4. Wyniki - Medulloblastoma ……32
4.1 Analiza spektralna widm FTIR……..……32
4.1.1 Przypisanie charakterystycznych pasm w poszczególnych podtypach histologicznych.....33
4.1.2 Analiza pasm składowych regionu drgań grup funkcyjnych należących do amidu I-rzędowego. Określenie struktury drugorzędowej białka.....36
4.1.3 Statystyczne analizy wielowymiarowe dla poszczególnych podtypów histologicznych....40
4.1.4 Analiza dynamiki absorbancji……45
4.1.5 Machine Learning……49
4.1.6 Właściwości fizykochemiczne w kontekście klinicznego przebiegu rdzeniaka zarodkowego u dzieci. Przypisanie charakterystycznych pasm dla poszczególnych grup pacjentów……..52
4.2 Analiza spektralna widm ramanowskich……..59
4.2.1 Uzyskane widma, analiza pasm składowych……59
4.2.2 Przypisanie charakterystycznych pasm w poszczególnych podtypach histologicznych……61
4.2.3 Chemometryczne metody analizy danych……...…63
4.2.4 Analiza dynamiki widm Ramana……68
Rozdział 5. Wyniki - Mięsak Ewinga……71
5.1. Analiza spektralna widm FTIR……..……71
5.1.1. Przypisanie charakterystycznych pasm dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, tkanki nowotworowej przed leczeniem oraz tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej……71
5.1.2. Analiza pasm składowych regionu drgań grup funkcyjnych należących do amidu I-rzędowego. Określenie struktury drugorzędowej białka.....79
5.1.3. Statystyczne analizy wielowymiarowe.....83
Rozdział 6. Dyskusja 84

Rozdział 7. Wnioski ……..….99
Streszczenie 101
Abstract.....103
Spis tabel ……105
Spis wykresów……...……107
Bibliografia……112

Zestawienie skrótów użytych w rozprawie:

10-CV - (ang. *10-fold Cross Validation)* 10-krotna skrośna walidacja w ML

C5.0 - algorytm drzewa decyzji w stosowany w ML

DNA - (ang. *deoxyribonucleic acid*) kwas deoksyrybonukleinowy

ES - (ang. *Ewing Sarcoma*) mięsak Ewinga

ESFT - (ang. *Ewing's Sarcoma Family of Tumor*) nowotwory z rodziny mięsaka Ewinga

FFPE - (ang. *formalin-fixed paraffin embedded tissues*) bloczki parafinowe tkanek utrwalonych w formalinie

FIR - (ang. *Far InfraRed*) zakres dalekiej podczerwieni obejmujący przedział 50-400 cm^{-1}

FT - (ang. *Fourier transform*) tansformata Fouriera jest to operacja matematyczna która przekształca sygnał (czyli domenę czasu) w domenę częstości

FTIR - (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera

HCA - (ang. *Hierarchical Cluster Analysis*) - hierarchiczna analiza skupień

IR - (ang. *Infrared spectroscopy*) spektroskopia w zakresie podczerwieni

kNN - (ang. *k Nearest Neigbours*) algorytm k najbliższych sąsiadów stosowany w ML

ML - (ang. *Machine Learning*) uczenie maszynowe

MB - (ang. *Medulloblastoma*) rdzeniak zarodkowy

MIR - (ang. *Mid InfraRed*) zakres środkowej/podstawowej podczerwieni promieniowania elektromagnetycznego obejmujący przedział od 400 do 4000 cm^{-1}

NIR - (ang. *Near InfraRed*) zakres bliskiej podczerwieni promieniowania elektromagnetycznego, jest to zakres powyżej 4000 cm^{-1}

OS - (ang. *overall survival*) - przeżycie całkowite

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

PCA - (ang. *Principal Component Analysis*) analiza głównych składowych/ komponentów

PC1 - (ang. *first principal component*) pierwsza główna składowa

PC2 - (ang. *second principal component*) druga główna składowa

PFS - (ang. *progression-free survival*) - czas przeżycia wolny od progresji choroby

RF - (ang. *Random Forest*) - algorytm las losowy stosowany w ML

Wprowadzenie

Wszystkie organizmy żywe zbudowane są z żywych komórek, które stale poddają się podziałowi, aby osiągnąć ciągły rozwój organizmu lub w celu zastąpienia komórek, które uległy uszkodzeniu lub śmierci. Proces karcinogenezy (nowotworzenia) zachodzi na poziomie DNA komórki. Rozpoczyna się on w chwili, kiedy kontrola genowa jest zaburzona lub przestaje funkcjonować i w jednej lub więcej z komórek organizmu następuje pierwsza mutacja. Dotyczy ona najczęściej genów odpowiedzialnych za procesy proliferacji, różnicowania i dojrzewania komórek oraz naprawy DNA. Zmiana ta jest nieodwracalna i przy nieprawidłowej kontroli taka nowo powstała komórka nie ulega apoptozie, ale zaczyna się dzielić. Tworzy się wówczas klon nieprawidłowych komórek o nowych właściwościach biologicznych ze zdolnością do autonomicznego, zwykle szybkiego wzrostu i podziału, ale z zaburzonym procesem różnicowania i śmierci komórkowej. Takie komórki poprzez ekspansywny rozrost i zdolność do dawania odległych przerzutów stanowią zagrożenie dla funkcjonowania organizmu jako całości [1].

Choroba nowotworowa występuje przede wszystkim u ludzi w wieku dojrzałym i starszym jako efekt wieloletniego oddziaływania wielu szkodliwych czynników biologicznych, fizycznych i chemicznych na genom komórki, prowadząc do jej zaburzonej proliferacji oraz metabolizmu. Nowotwory u dzieci występują relatywnie rzadko (ok. 1% wszystkich zachorowań na nowotwory), a ich patogeneza i histopatologia jest odmienna w stosunku do nowotworów u ludzi starszych. W Europie stwierdza się każdego roku ok. 15 000 nowych przypadków nowotworów złośliwych wśród dzieci od 0 do 14. roku życia oraz 20 000 zachorowań wśród młodzieży i młodych osób w przedziale wiekowym 15-24 lata [2]. W Polsce obserwuje się około 1200-1300 zachorowań rocznie na chorobę nowotworową wśród dzieci [3].

Są to zwykle nowotwory cechujące się niskim stopniem zróżnicowania (są zbudowane z morfologicznie podobnych, małych komórek z okrągłymi, dużymi, silnie hiperchromatycznymi jądrami komórkowymi), podobieństwem do tkanek i komórek płodowych oraz agresywnym przebiegiem. Najczęściej wykazują pochodzenia neuroektodermalne lub mesenchymalne, w przeciwieństwie do nowotworów w starszym wieku, wśród których dominują guzy pochodzenia nabłonkowego, czyli raki. W ok. 90% występują one wskutek mutacji de novo w obrębie genów odpowiedzialnych za kontrolę procesów proliferacji, różnicowania i dojrzewania komórki, a w ok 10% na podłożu wrodzonych zespołów genetycznych, np. anemia Fanconiego, NF-1, zespół Bickwitha-

Widemanna [4]. W konsekwencji dochodzi do tzw. transformacji nowotworowej i powstania klonu komórek ze zmienionym, nieprawidłowym fenotypem. Czynniki środowiskowe u dzieci odgrywają niewielką rolę w inicjowaniu nowotworzenia.

Do najczęściej występujących nowotworów u dzieci należą nowotwory z układu krwiotwórczego tj. białaczki i chłoniaki, które diagnozuje się w ok. 40% przypadków. Drugą pod względem częstości zachorowań grupę stanowią nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) ok. 24%. Na kolejnych pozycjach znajdują się: zwojak zarodkowy/neuroblastoma (7-8%), guz Wilmsa (7-8%), mięsak prążkowano-komórkowy/rhabdomyosarcoma (4-8%) oraz guzy kości (5%) [5]. Podstawą rozpoznania choroby nowotoworowej pozostaje badanie histopatologiczne, a w przypadku białaczek badanie morfologiczne i immunofenotypowe szpiku kostnego. W przypadku guzów litych większość nowotworów jest to rozrost komórek niedojrzałych, niskozróżnicowanych, które pod mikroskopem świetlnym składają się z populacji podobnych, okrągłych komórek z dużym jądrem, które określa się zbiorczym terminem guzów drobnookrągłokomórkowych. Brak ewidentnego zróżnicowania guzów niejednokrotnie utrudnia ich diagnostykę różnicową oraz może prowadzić do pomyłek diagnostycznych. W celu postawienia ostatecznego rozpoznania najczęściej konieczne jest wykonanie badań dodatkowych takich jak badania immunohistochemiczne przy użyciu specyficznych przeciwciał oraz badania molekularne i genetyczne. Precyzyjna diagnoza i klasyfikacja histopatologiczna. determinuje dalsze leczenie oraz wstępne rokowanie [6].

Charakterystyczną cechą większości nowotworów u dzieci, w przeciwieństwie do dorosłych, jest ich szybki wzrost oraz krótki czas do momentu, w którym są zdolne do przerzutowania. Opóźnione rozpoznanie choroby nowotworowej może się wiązać z gorszym rokowaniem, a nawet z zagrożeniem życia. Dlatego tak istotne jest poszukiwanie nowych skutecznych, obiektywnych, tanich oraz szybkich metod diagnostycznych [6].

Spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) oraz spektroskopia Ramana są fizykochemicznymi, nieinwazyjnymi, czułymi i powtarzalnymi metodami, które dostarczają istotnych informacji na temat zmian w strukturze molekularnej. Uzyskane widma są sumą częstotliwości wielu obecnych biomolekuł, co pozwala ujawnić m.in. istotne zmiany biochemiczne, jakie zaszły w tkance nowotworowej oraz w płynach ustrojowych na skutek zmienionego metabolizmu komórek zdrowych i nowotworowych. Szczególne znaczenie w diagnostyce tkanek ma obszar widma w tzw. zakresie daktyloskopowym liczby falowej (tzw. „*fingerprint region*”), który dotyczy najczęściej zakresu 800-1800 cm^{-1}, co odpowiada m.in. sygnałowi z ważnych biomolekuł przypisanych do białek oraz kwasów nukleinowych.

Daje to potencjalną możliwość odróżnienia tkanek zdrowych od nowotworowych oraz wczesnego wykrycia nowotworu jeszcze przed ujawnieniem się zmian w mikroskopie świetlnym. Uzyskane widmo i jego zmiany mogą zostać także potencjalnie wykorzystane do monitorowania przebiegu choroby oraz jako marker prognostyczny do stratyfikacji leczenia onkologicznego.

W ostatnich latach, wraz z rozwojem technik przetwarzania danych oraz tzw. sztucznej inteligencji, nastąpił szybki rozwój metod spektroskopowych oraz ich wykorzystanie w diagnostyce medycznej, w tym w onkologii. Baza PubMed zawiera 4 336 publikacji dla słów kluczowych: „*cancer*" oraz „*spectroscopy*" opublikowanych tylko w 2021 roku, podczas gdy jeszcze w latach 2017-2018 było ich zaledwie 3700-3780. Świadczyć to może o ogromnym potencjale spektroskopii, zwłaszcza przy zastosowaniu współczesnych technologii przetwarzania danych, w badaniach and nowotworami.

Częściowo rezultaty zawarte w powyższej pracy zostały przedstawione w artykułach naukowych pt.:

1. Chaber R, **Łach K,** Szmuc K, Michalak E, Raciborska A, Mazur D, Machaczka M, Cebulski J. *Application of Infrared Spectroscopy In the Indentification of Ewing Sarcoma: A preliminary report*. Infrared Physics & Technology (2017) 83:200-205. (IF:1.851).

2. Chaber R, **Łach K**, Depciuch J, Szmuc K, Michalak E, Raciborska A, Koziorowska A, Cebulski J. *Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy of paraffin and deparafinnized bone tissue samples as a diagnostic tool for Ewing sarcoma of bones*. Infrared Physics & Technology (2017) 85:364-371. (IF: 1.851).

3. Chaber R, **Łach K,** Arthur CJ, Raciborska A, Michalak E, Ciebiera K, Bilska K, Drabko K, Cebulski J. *Prediction of Ewing Sarcoma treatment outcome using attenuated tissue reflection FTIR tissue spectroscopy*. Sci Rep. (2018) 8(1):12299. (IF: 4.011).

4. Chaber R, Arthur CJ, Depciuch J, **Łach K,** Raciborska A, Michalak E, Cebulski J. *Distinguishing Ewing sarcoma and osteomyelitis using FTIR spectroscopy*. Sci Rep. (2018) 8(1):15081 (IF: 4.011).

5. **Łach K**, Kowal A, Perek-Polnik M, Jakubczyk P, Arthur C, Bal W, Drogosiewicz M, Dembowska-Bagińska B, Grajkowska W, Cebulski J, Chaber R. *Infrared spectroscopy as a potential tool for medulloblastoma*. Molecules (2023) 28:2390. (IF: 4.927).

6. **Łach K**, Jakubczyk P, Paja W, Kowal A, Depciuch J, Perek -Polnik M, Arthur CJ, Bal W, Drogosiewicz M, Dembowska-Bagińska B, Grajkowska W, Cebulski J, Chaber R. *Physicochemical properties in the context of clinical course of medulloblastoma in children using FTIR and Raman spectroscopy.* (obecnie w recenzji)

Celem niniejszego badania była próba wykorzystania uzyskanych widm spektroskopowych jako potencjalnego narzędzia diagnostycznego oraz jako markera prognostycznego dla: mięsaka Ewinga (ES) oraz rdzeniaka zarodkowego- medulloblastoma (MB) u dzieci.

W pierwszych rozdziałach pracy dokonano przeglądu literatury naukowej dotyczącej dotychczasowego zastosowania spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii Ramanowskiej w onkologii oraz podano charakterystykę, badanych nowotworów drobnookrągłokomórkowych u dzieci. Następnie omówiono metodykę badań oraz charakterystykę badanej populacji wraz z danymi medycznymi. W kolejnych rozdziałach przedstawiono wyniki badań pomiarów spektralnych widm mięska Ewinga oraz rdzeniaka zarodkowego, wykonano analizę pasm składowych regionu drgań grup funkcyjnych należących do amidu I-rzędowego i określono strukturę drugorzędową białka. Dodatkowo dla uzyskanych widm MB oraz grupy kontrolnej wykonano analizę dynamiki absorbancji oraz uczenie maszynowe (ML). W kolejnej części pracy przedstawiono dyskusję oraz wnioski z uzyskanych badań.

Cel pracy:

1. Porównanie widm spektroskopowych w podczerwieni oraz widm Ramana uzyskanych z utrwalonych w formalinie skrawków histopatologicznych rdzeniaka zarodkowego (MB) w momencie rozpoznania z widmami uzyskanymi z prawidłowej tkanki mózgu.
2. Analiza zmian fizykochemicznych guza oraz składu biochemicznego w poszczególnych podtypach histologicznych rdzeniaka zarodkowego oraz ich powiązanie z obecnością przerzutów lub wystąpieniem nawrotu choroby u pacjentów.
3. Porównanie widm spektroskopowych w podczerwieni z pomiarów utrwalonych w formalinie skrawków histopatologicznych kostnej postaci mięsaka Ewinga w momencie rozpoznania oraz po zakończeniu chemioterapii neoadjuwantowej, a także prawidłowej tkanki kostnej z bezpośredniego sąsiedztwa nowotworu.
4. Ocena uzyskanych widm spektroskopowych jako potencjalnego narzędzia diagnostycznego oraz markera prognostycznego w medulloblastoma oraz w mięsaku Ewinga.

Rozdział 1. Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni (FTIR) i spektroskopia rozproszenia ramanowskiego w onkologii

Ocena stopnia złośliwości histologicznej nowotworu na podstawie jego obrazu mikroskopowego ma zasadnicze znaczenie dla doboru leczenia i jego wyników. Tradycyjna diagnostyka histopatologiczna nowotworów opiera się na wykorzystaniu specyficznego wybarwiania tkanki w połączeniu z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych oraz badań genetycznych, Interpretacja tak uzyskanych wyników w dużej mierze jest subiektywna i zależy od doświadczenia oceniającego histopatologa, Ponadto proces ten wymaga dużego nakładu pracy (wcześniejsze utrwalenie i przygotowanie tkanki, jej wybarwienie itp.) oraz jest czaso- i kosztochłonny [7,8].

W przeciwieństwie do klasycznych technik stosowanych w histopatologii, istotną zaletą technik spektroskopowych jest możliwość wykrycia patologicznych zmian w tkankach i komórkach bez konieczności wstępnego przygotowania tkanki (np. barwienie czy demineralizacja). Prowadzi to do, znaczącego skrócenia czasu badania [9]. Z kolei brak konieczności zastosowania markerów immunologicznych oraz innych, drogich odczynników obniża koszty analizy [10]. Co więcej, techniki te można wykorzystać do identyfikacji zmiany składu i struktury badanej tkanki nawet w przypadku bardzo małej ilości dostępnego materiału biologicznego, bez jego wcześniejszej degradacji i zmiany struktury fizykochemicznej związanej z utrwalaniem tkanki. Inną ich zaletą jest potencjalna możliwość zastosowania tych metod nawet w bardzo wczesnych etapach choroby, jeszcze przed ujawnieniem się zmian w mikroskopie świetlnym [11] oraz możliwość monitorowania przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie [12,13].

Te zalety sprawiają, że spektroskopia wibracyjna może potencjalnie zostać wykorzystana jako komplementarne narzędzie w diagnostyce histopatologicznej, które pozwoli na automatyzację i obiektywizację uzyskiwanych wyników oraz skrócenie czasu badania. Ponadto, w przypadku znalezienia istotnych zależności pomiędzy uzyskanym widmem a rokowaniem, mogłyby poprawić stratyfikację do grup terapeutycznych, a przez to przyczynić się do większej indywidualizacji leczenia.

1.1 Spektroskopia Ramana i FTIR – podstawy fizyczne

Spektroskopia optyczna opiera się na analizie odziaływania materii z promieniowaniem elektromagnetycznym, które może polegać, w zależności od cząsteczki/atomu, na: rozpraszaniu, emisji lub absorpcji kwantu światła. Podczas odziaływania fali elektromagnetycznej z materią dochodzi do zmian w wyniku których powstaje inna fala, niosąca informację o ośrodku który opuszcza. Na podstawie uzyskanych informacji można uzyskać dane chemiczne takie jak: struktura cząsteczek oraz skład analizowanej substancji, dane fizyczne opisujące ruchy grup funkcyjnych w cząsteczkach, ruch całych cząsteczek oraz charakterystykę na poziomie molekularnym [14].

Podział technik badawczych obejmuje dwie podstawowe grupy:

- Metody analizujące promień przechodzący przez próbkę, w którym kierunek jest taki sam jak kierunek promienia padającego. W badaniu poddaje się analizie natężenie lub polaryzację światła. Zaliczamy tutaj między innymi spektroskopię w podczerwieni lub spektroskopię UV/VIS.
- Metody analizujące promieniowanie rozproszone, w tym przypadku światło rozprasza się we wszystkich kierunkach. Podczas badania mierzy się; polaryzację, natężenie oraz długość fali promieniowania rozproszonego. Zaliczamy do tej grupy: rozproszenie Ramana oraz rozproszenie Rayleigha [15].

1.1.1 Technika FTIR

Spektroskopia w podczerwieni (FTIR) to spektroskopowa metoda polegająca na analizie w oparciu o naturalne widmo elektromagnetyczne w zakresie długości fali od 2500 do 25000 nm.

Absorpcja promieniowania z zakresu średniej podczerwieni powoduje zmiany energii oscylacyjnej cząsteczki. Dlatego też zarejestrowane widma nazywane są widmami oscylacyjnymi, a samą technikę określa się jako spektroskopię absorpcyjną [16]. Wykorzystuje się trzy zakresy podczerwieni określane jako:

- FIR - (ang. *Far InfraRed*) zakres dalekiej podczerwieni obejmujący przedział 50-400 cm^{-1}.

- MIR - (ang. *Mid InfraRed*) zakres środkowej podczerwieni promieniowania elektromagnetycznego obejmujący przedział od 400 do 4000 cm^{-1}. Jest uznawany za podstawowy zakres ze względu na to, iż jest wykorzystywany w większości badań. Zawiera się

w nim tzw. zakres odcisku palca (ang. *Fingerprint region*) charakterystyczny dla każdego indywiduum chemicznego.

- NIR - (ang. *Near InfraRed*) zakres bliskiej podczerwieni promieniowania elektromagnetycznego, jest to zakres powyżej 4000 cm^{-1} [17].

Skrót FT (ang. *Fourier transform*) w spektroskopii FTIR oznacza transformatę Fouriera, czyli operację matematyczną, która przekształca sygnał (czyli domenę czasu) w domenę częstości. Dzięki tej operacji uzyskuje się przekształcenie danych optycznych na dane liczbowe.

Podstawowy spektrometr FTIR składa się z:

- źródła światła, uwalnia ono światło podczerwone polichromatyczne które dopasowuje się energetycznie do przejść oscylacyjnych. Przeważnie używa się w tym celu globar (SiC) ora pręt Nernsta ($ZrO_2 + Y_2O_3$)
- interferometru, elementu który rozdziela wiązkę promieniowania elektromagnetycznego. W przypadku spektrometrów fourierowskich rejestruje się tzw. interferogram czyli zależność sygnału w funkcji czasu (różnicy dróg optycznych). Następuje rejestracja całego zakresu spektralnego światła dochodzącego do interferometru. Szereg powstałych widm jest uśredniany i przekształcany za pomocą wspomnianej wcześniej transformaty Fouriera.
- komory pomiarowej,
- detektora, który zmienia intensywność promieniowania na sygnał elektryczny generując widmo odpowiadające wynikowi pomiaru .

Technika całkowitego wewnętrznego odbicia - ATR (ang. Attenuated Total Reflection) polega na wprowadzeniu wiązki światła na wewnętrzną powierzchnię przezroczystego dla podczerwieni materiału, o dużym współczynniku załamania światła przeważnie diamentu. Do zewnętrznej strony tej powierzchni w miejscu odbicia przykładana jest badana próbka. Promieniowanie ulega zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia i nie wydostaje się z ośrodka, w którym się rozchodzi, ale jego energia może zostać zaabsorbowana przez próbkę znajdującą się po drugiej stronie. W wyniku tej selektywnej absorpcji pojawia się zjawisko osłabionego wewnętrznego odbicia. Geometria zastosowanego kryształu pozwala na wielokrotne powtórzenie tego zjawiska (wielokrotne wewnętrzne odbicie), prowadząc do zwiększenia czułości metody. Niepochłonięta część promieniowania trafia do detektora [18,19].

Ze względu na fakt, iż każde pasmo jest sumą drgań wielu molekuł, na jego wygląd wpływa wiele nakładających się pasm pochodzących od drgań deformacyjnych i rozciągających w obrębie chociażby pojedynczej cząsteczki. W przypadku gdy poszczególne

rodzaje wiązań mają zbliżoną różnicę energii pomiędzy poziomami oscylacyjnymi, absorbują promieniowanie o rozpoznawalnej częstotliwości dając pasmo w tym samym zakresie liczby falowej niezależnie od niejednorodnych szczegółów struktury cząsteczki. Dlatego te same grupy funkcyjne (np. O-H, N-H, C=O) dla różnych związków dają pasma absorpcyjne w tym samym zakresie liczby falowej, co powoduje, że jednoznaczne przypisanie pochodzenia danego piku wyłącznie z wykorzystaniem spektroskopii wibracyjnej w wielu przypadkach jest niemożliwe.

1.1.2 Technika Ramana

Spektroskopia rozproszenia ramanowskiego jest także metodą opartą na analizie ruchów oscylacyjnych układu molekularnego, jednak w niej wykorzystuje się zjawisko rozpraszania światła, a dokładnie pomiar promieniowania rozproszenia Ramana, tj. nieelastycznego rozpraszania fotonów. Rozpraszanie światła, a dokładnie fal elektromagnetycznych opiera się na oddziaływaniu światła z materią, a poprzez to występuje zmiana kierunku rozchodzenia się światła (wyjątkiem są tutaj zjawiska odbicie oraz załamania światła). W przypadku spektroskopii Ramana wykorzystuje się zakres fal elektromagnetycznych odpowiadający światłu widzialnemu [20].

W spektrometrze fourierowskim czyli układzie służącym do rejestracji widm Ramana, promieniowanie lasera (w tym przypadku o zakresie promieniowania wzbudzającego 780 nm) najpierw trafia na filtr interferencyjny - element rozdzielający światło, którego zadaniem jest wyeliminowanie z toru detekcyjnego promieniowania rozproszonego elastycznie (linii wzbudzającej), czyli pasma Reyleigha. Rozproszone nieelastycznie promieniowanie skupione jest poprzez soczewki i trafia na siatkę dyfrakcyjną, która należy do monochromatora, mającego na celu rozszczepienie światła poprzez wydzielenie z całego widma promieniowania padającego tylko wybranego zakresu [21].

Teoria kwantowa promieniowania głosi, że wiązka światła mająca częstość ν_0 składa się ze strumienia pojedynczych cząstek (fotonów) o energii $h\nu_0$,. Gdy następuje zderzenie fotonów z atomami lub cząsteczkami, ulegają one rozproszeniu na różne strony, generując dwa typy rozpraszania promieniowania:

- rozpraszanie Rayleigha (ν rozproszone = $\nu_0$zderzenia), które powstaje na skutek zderzeń elastycznych, sprężystych". - W tym przypadku pęd jest zachowany, ale nie ma wymiany

energii z cząsteczkami, a podczas rozpraszania nie następuje zmiana energii (częstotliwości) światła.

- „rozpraszanie Ramana” (ν rozproszone $= \nu_0 \pm \Delta E/h$) powstaje wskutek zderzeń „nieelastycznych, niesprężystych” Występuje ono w przypadku, kiedy podczas rozpraszania zmienia się energia (częstotliwość) światła, a cząsteczka zyskuje energię lub ją traci. Dzieli się ono na:

a.) rozpraszanie stokesowskie - cząsteczka zyskuje energię od światła,

b.) rozpraszanie antystokesowskie - cząsteczka traci/oddaje energię.

Pasma Rayleigha - powstają w wyniku oddziaływania fotonów padającego promieniowania o częstotliwości ν_0, nie pasujących do poziomów energetycznych cząsteczki. Dana cząsteczka po oddziaływaniu z promieniowaniem powraca na ten sam poziom energetyczny (wtedy częstość ωo promieniowania padającego jak i rozproszonego są jednakowe).

Pasma stokesowskie - występują gdy cząsteczka po oddziaływaniu z promieniowaniem przechodzi na wyższy poziom oscylacyjny, w wyniku czego rozproszony foton ma energię pomniejszoną o różnicę energii poziomów oscylacyjnych *hv*.

Pasma antystokesowskie - odnotowujemy je w przypadku gdy początkowo jeszcze przed oddziaływaniem z promieniowaniem dana cząsteczka znajduje się na wzbudzonym poziomie oscylacyjnym, to poprzez oddziaływanie następuje przeniesienie jej na podstawowy (zerowy) poziom oscylacyjny (po rozproszeniu fotonu powraca ona do podstawowego poziomu wibracyjnego). Energia rozproszonego fotonu jest większa o różnicę energii poziomów oscylacyjnych *hv*.

Pasmo antystokesowskie pojawia się w widmie Ramana po przeciwnej stronie co pasmo stokesowskie w stosunku do pasma Rayleigha. Pasmo to ma przeważnie niższą intensywność w stosunku do pasma stokesowskiego [22].

1.1.3 Spektroskopia Ramana i w podczerwieni jako metody komplementarne

Technika spektroskopii w podczerwieni FTIR oraz metoda ramanowska są dla siebie komplementarne. Opisuje to zasada wzajemnego wykluczenia, która mówi, że dla cząsteczek mających środek symetrii występują drgania aktywne w widmie IR, ale nieaktywne w widmie

ramanowskim. I odwrotnie- drgania aktywne w widmie ramanowskim nie są widoczne na widmie podczerwonym. Przykładem mogą być drgania symetryczne N_2 lub CO_2 które są niewidoczne w spektroskopii IR, natomiast w widmie ramanowskim obserwuje się znaczące pasma przypisane tym związkom. Dane uzyskane ze spektroskopii Ramana uzupełniają tym samym luki diagnostyczne spektroskopii w podczerwieni. Z drugiej strony istnieją molekuły, np. NaCl, które nie są obrazowane w widmie Ramana, a dają silny sygnał w widmie IR [23-25].

Rozdział 2.

Drobnokomórkowe nowotwory niezróżnicowane

Nowotwory drobnookrągłokomórkowe (ang. small round cell tumors) są dominującą grupą guzów litych u dzieci. Wspólną cechą tych nowotworów jest niskie zróżnicowanie tworzących je komórek. Guzy te są zbudowane są z morfologicznie podobnych, małych komórek z okrągłymi, dużymi, silnie hiperchromatycznymi jądrami komórkowymi. Powyższe podobieństwo morfologiczne tkanek guza powoduje duże trudności w ich diagnostyce histopatologicznej opartej jedynie na analizie obrazu mikroskopowego. Z tego powodu do określenia pochodzenia tkanki nowotworowej konieczne są zazwyczaj badania dodatkowe oparte na barwieniu immunohistochemicznym przy użyciu specyficznych przeciwciał oraz techniki biologii molekularnej i badania genetyczne [2].

Do nowotoworów drobnookragłokomórkowych występujących u dzieci zaliczają się między innymi:

- mięsaka Ewinga (Ewing sarcoma)
- rdzeniaka zarodkowego (medulloblastoma)
- nerwiaka płodowego (neuroblastoma)
- guza Wilmsa (nephroblastoma)
- siatkówczaka (retinoblastoma)
- szyszyniaka zarodkowego (pinealoblastoma)
- mięsaka prążkowano-komórkowego (rhabdomyosarcoma)
- nerwiaka węchowego zarodkowego (esthesioneuroblastoma, ENB)
- chłoniaka nieziarniczego (non-Hodgkin lymphoma)

- obwodowego niedojrzałego guza neuroektodermalnego (peipheral primitive neuroectodermal tumor, PNET)

- desmoplastycznego guza drobnookrągłokomórkowego jamy brzusznej (IDSRCT, intraabdominal desmoplastic small round cell tumor).

Wczesne objawy choroby nowotworowej u dzieci zwykle są niespecyficzne, a ich przyczyną są najczęściej inne schorzenia, które występują znacznie częściej niż nowotwory w populacji pediatrycznej. Mogą to być na przykład nawracające infekcje z tendencją do uogólniania, wymioty, bóle głowy, bóle brzucha, podwyższona temperatura ciała bez uchwytnej przyczyny, osłabienie, drażliwość czy zmiana usposobienia dziecka. W niektórych chorobach nowotworowych może wystąpić utrata masy ciała. W przypadku utrzymywania się niespecyficznych objawów przez dłuższy czas i/lub narastania ich w czasie, niezwykle istotne jest przeprowadzenie szybkiej i dokładniej diagnostyki różnicowej, ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych [26,27].

2.1 Medulloblastoma – rdzeniak zarodkowy

Rdzeniak zarodkowy (ang. Medulloblastoma, MB) jest to pierwotny nowotwór złośliwy ośrodkowego układu nerwowego, najczęściej rozwijający się w móżdżku. Jest on najczęstszym nowotworem złośliwym mózgu u dzieci. Szczyt zachorowalności występuje ok. 7. roku życia, z przewagą płci męskiej. Częstość zachorowań na MB nie jest wysoka - wynosi ok. 1 przypadek na 200 tys. dzieci do 15. roku życia [28].

Obecnie, w większości przypadków nadal nie jest poznana przyczyna powstawania guzów mózgu, w tym MB. Zwiększone ryzyko rozwoju tych nowotworów zaobserwowano w przypadku niedoborów immunologicznych oraz w niektórych chorobach genetycznych, takich jak: stwardnienie guzowate, nerwiakowłókniakowatość typu I i II, zespół Li-Fraumeni czy chorobie von Hippel-Lindau. Dodatkowo stwierdzono wpływ na powstawanie guzów OUN takich czynników środowiskowych jak: promieniowanie, pestycydy i nitrozaminy [29].

Wyróżnia się następujące podtypy histologiczne MB:

- klasyczny
- desmoplastyczny/guzkowy;
- z rozległym wzrostem guzkowym;
- anaplastyczny;
- wielkomórkowy.

2.1.1. Objawy.

Początkowo objawy MB często są niecharakterystyczne, co przyczynia się do opóźnienia zdiagnozowania choroby. Zaliczamy do nich: bóle głowy, nudności, wymioty, zmęczenie, senność, zawroty głowy, podwójne widzenie, słabą koordynację, chwiejny chód i inne problemy. Objawy te mogą być spowodowane uciskaniem guza na okoliczne struktury lub mogą być związane ze wzrostem ciśnienia wewnątrzczaszkowego. U niemowląt najczęściej stwierdza się zmiany zachowania, takie jak niepokój, nadpobudliwość, płaczliwość i przeczulica oraz często powiększanie obwodu głowy i uwypuklenie ciemiączka. MB najczęściej przerzutuje w obrębie OUN, dopiero w postaciach bardzo zaawansowanych może obejmować narządy poza OUN [30].

2.1.2 Diagnostyka oraz leczenie

Standardowa diagnostyka MB obejmuje badania obrazowe głowy: rezonans magnetyczny (obecnie badanie rutynowe), ewentualnie tomografię komputerową. Ostateczne rozpoznanie stawia się na podstawie badania histopatologicznego wycinka guza pobranego w czasie biopsji lub resekcji guza. Badania molekularne guzów umożliwiły wyodrębnienie czterech głównych podgrup MB: WNT, SHH, grupa 3 i grupa 4. Każda z tych podgrup posiada charakterystyczny profil ekspresji genów, który koreluje z przebiegiem klinicznym, wiekiem w momencie zachorowania i rokowaniem [31].

Aktualne protokoły leczenia (MB) stratyfikują pacjentów, w zależności od ich wieku, rozsiania choroby i resztkowej objętości guza po resekcji, do grupy wysokiego i standardowego ryzyka. Leczenie obejmuje połączenie zabiegu chirurgicznego, wielolekowej chemioterapii oraz radioterapii osi mózgowo-rdzeniowej, z tym, że w grupie pacjentów poniżej 3 roku życia nie stosuje się napromieniania [32]. 5-letnie przeżycie osiąga około 75% pacjentów z grupy ryzyka standardowego w porównaniu z 35% pacjentów z grupy wysokiego ryzyka. Przeżywalność jest gorsza u niemowląt i dzieci w wieku poniżej 3. roku życia, z wyjątkiem pacjentów z desmoplastycznym podtypem histologicznym MB [33]. Dodatkowo, u większości wyleczonych pacjentów występują późne powikłania zastosowanej terapii, które istotnie upośledzają jakość życia [34].

2.2 Mięsak Ewinga

Mięsak Ewinga (Ewing Sarcoma, ES) jest zaliczany do grupy niezróżnicowanych drobnookrągłokomórkowych mięsaków kości i/lub tkanek miękkich. Może zajmować praktycznie wszystkie kości, choć najczęściej jest spotykany w kościach długich kończyn dolnych i szkielecie osiowym (miednica, kręgosłup, żebra) [35]. Wywodzi się z pierwotnych macierzystych komórek mezenchymalnych. Po mięsaku kościopochodnym (osteosarcoma), stanowi drugi pod względem częstości złośliwy nowotwór kości [36]. Jest rzadkim, agresywnym nowotworem występującym najczęściej u młodzieży i młodych dorosłych. James Ewing po raz pierwszy sklasyfikował go już w roku 1921 [37]. Częstość zachorowań na ES nie jest wysoka - od 1,6 do 2,9/1mln/rok wśród populacji do 20 roku życia z przewagą płci męskiej. Mediana wieku zachorowania to 15-17 lat [38]. Według danych Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Guzów Litych w Polsce notuje się około 20-25 nowych zachorowań na ES rocznie [39].

2.2.1 Czynniki ryzyka. Objawy. Diagnostyka.

Ewing sarcoma jest nowotworem wykazującym szybki wzrost i agresywny przebieg. Jego pierwsze objawy kliniczne są zwykle niecharakterystyczne i mało specyficzne. Do objawów miejscowych zaliczamy obrzęk, ból, problemy z poruszaniem kończyną. Dodatkowo mogą występować objawy sugerujące proces zapalny (tzw. „maska zapalna"), które występują w przypadku ok. 20% chorych, takie jak: utrata masy ciała gorączka, leukocytoza oraz podwyższony OB. W przypadku lokalizacji w kręgosłupie może wystąpić ucisku na rdzeń kręgowy. Może to prowadzić do pomyłek diagnostycznych, np. rozpoznanie zapalenia kości i szpiku kostnego. Powoduje to opóźnienie włączenia właściwego leczenia ES. Przejście z postaci zlokalizowanej w postać rozsianą istotnie pogarsza rokowanie dziecka. ES najczęściej przerzutuje do płuc, innych kości i szpiku kostnego [40]. W każdym przypadku podejrzenia stanu zapalnego kości i szpiku kostnego i braku poprawy po leczeniu p/zapalnym lub antybiotykoterapii, lub w razie progresji klinicznej objawów zalecana jest pogłębiona diagnostyka radiologiczna i histopatologiczna [41].

Do wstępnego rozpoznania ES służą zdjęcia rentgenowskie oraz badania obrazowe takie jak: tomografia rezonansu magnetycznego oraz tomografia komputerowa. Stosuje się również badania scyntygraficzne z użyciem różnych substancji znakowanych izotopem takie jak

klasyczna scyntygrafia kości lub tzw. PET z opcją tomografii komputerowej, mogą one ujawnić obecność guza w kości, jednak nie przesądzają o rozpoznaniu. Na podstawie obrazu mikroskopowego również zwykle trudno jest ustalić jednoznaczne rozpoznanie. Markerem potwierdzającym ES jest wykazanie obecności antygenu CD99 w tkance guza. Ponadto w guzach z rodziny mięsaków Ewinga (ESFT) stwierdza się zmiany genetyczne w postaci nielosowych translokacji chromosomowych skutkujące powstawaniem genów fuzyjnych, które powodują kodowanie nieprawidłowych czynników transkrypcyjnych. U około 85% pacjentów z ES są to translokacje chromosomalne obejmujące chromosomy 11 i 22 (EWS-FLI-1) lub chromosomy 21 i 22 (15% przypadków) oraz rzadziej spotykane translokacje dla : t(7;11), t(17;22) oraz t(2;22). W około 20% przypadkach mięsaka Ewinga obserwuje się inaktywację genu p16 [42,43]. W związku z niskim stopniem zróżnicowania komórek ES jego diagnostyka różnicowa z innymi nowotworami drobnookragłokomórkowymi np. chłoniakami nieziarniczym, mięsakiem prążkowanokomórkowym oraz niektórymi typami mięsaka kościopochodnego bywa trudna i wymaga zastosowania dodatkowych metod biologii molekularnej oraz badań cytogenetycznych.

2.2.2 Leczenie ES

W przypadku ES do najważniejszych czynników rokowniczych zalicza się m.in. występowanie przerzutów odległych w momencie rozpoznania oraz odpowiedź na chemioterapię (polega na uzależnieniu stopnia jego agresywności wyrażoną odsetkiem żywych komórek w wyciętym guzie po jej zakończeniu).

Standardem leczenia ES jest skojarzenie chemioterapii neoadiuwantowej (przedoperacyjnej), chirurgicznej resekcji guza, z chemioterapią adiuwantową (pooperacyjną), a niekiedy dodatkową radioterapią, megachemioterapią z autologicznym przeszczepieniem komórek macierzystych szpiku kostnego i leczeniem podtrzymującym. W fazie badań klinicznych pozostają różne formy leczenia biologicznego. Przez cały okres leczenia pacjenci objęci są opieką psychologiczną i rehabilitacyjną [44]. Lekami standardowo wykorzystywanymi w przedoperacyjnym leczeniu ES są: winkrystyna, etopozyd, ifosfamid, daktynomycyna, cyklofosfamid i doksorubicyna [45].

Indywidualizacja leczenia onkologicznego, polega na uzależnieniu stopnia jego intensywności od obecności określonych czynników prognostycznych. U chorych z wysokim ryzykiem niepowodzenia terapii stosuje się bardziej intensywne schematy leczenia kosztem większego ryzyka wystąpienia potencjalnych powikłań [46].

Rokowanie w ES zwykle jest poważne i zależy m.in. od lokalizacji guza, możliwości resekcji chirurgicznej ognisk choroby, obecności makroskopowych przerzutów odległych w momencie rozpoznania oraz odpowiedzi na zastosowaną chemioterapię wstępną wyrażoną odsetkiem komórek guza, które uległy martwicy. Przyjmuje się że obecność poniżej 10% żywych komórek w utkaniu guza po zakończonej chemioterapii neoadjuwantowej świadczy o dobrej odpowiedzi na leczenie i wiąże się z lepszym rokowaniem [47].

Wyniki leczenia ES, pomimo postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w technikach operacyjnych, chemioterapii i radioterapii, są niezadowalające, zwłaszcza w postaci rozsianej. U ponad 50% pacjentów w momencie rozpoznania stwierdza się przerzuty odległe. Przeżycie 5-letnie osiąga w zależności od wyjściowego stopnia zaawansowania od 36 do 78% pacjentów. Wczesne rozpoznanie ES i wdrożenie leczenia jeszcze w fazie zlokalizowanej guza znacząco zwiększa szansę chorego na całkowite wyleczenie [48].

Odkrycie nowych czynników prognostycznych w ES mogłoby przyczynić się do dalszej poprawy wyników leczenia tego nowotworu oraz do zmniejszenia częstości występowania jego powikłań.

Rozdział 3.

Metodyka przeprowadzonych badań

Badania zawarte w powyższej pracy zostały zaopiniowane pozytywnie przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Rzeszowskiego poprzez:

- uchwałę nr 16/02/2016 z dnia 2 lutego 2016 r. dotyczącą projektu badawczego: „Techniki spektroskopii Ramana, spektroskopii w podczerwieni oraz spektrometrii mas TOF-SIMS jako narzędzia dla analizy ludzkich tkanek zmienionych nowotworowo".
- uchwałę nr 6/06/2021/W z dnia 10 czerwca 2021 r. dotyczącą eksperymentu badawczego: „Wykorzystanie spektroskopii Ramana, spektroskopii w podczerwieni (FTIR) oraz spektrometrii mas TOF-SIMS do analizy ludzkich tkanek nowotworowych."

3.1 Medulloblastoma

3.1.1 Charakterystyka badanej populacji. Dane medyczne

Badania przeprowadzono na próbkach pobranych od 40 pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym leczonych w latach 2010-2019. Grupę kontrolną stanowiła tkanka mózgowia pobrana od 4 pacjentów, u których operowanych z przyczyn innych niż choroba nowotworowa. Niewielka liczba pacjentów w grupie kontrolnej wynika z faktu, że dostępność tkanki mózgowej od żywych, zdrowych osób jest bardzo ograniczona, wręcz unikalna. Biopsję lub leczenie chirurgiczne przeprowadzono w Klinice Neurochirurgii Instytutu „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka" w Warszawie. W każdym przypadku rozpoznanie histopatologiczne MB zostało postawione przez histopatologa z doświadczeniem w diagnostyce chorób OUN u dzieci. Sposób kompleksowego leczenia nowotworów OUN uzależniony jest od lokalizacji, stopnia zawansowania, budowy patomorfologicznej i wieku dziecka. Charakterystykę kliniczną pacjentów z MB przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów. Czas obserwacji liczono od daty operacji do ostatniego badania kontrolnego.

Numer pacjenta /próbki	Płeć 1 – chłopiec 2 - dziewczynka	Wiek [w latach w chwili biopsji]	Podtyp histologiczny 1- klasyczny 2- desmoplastyczny/ guzkowy 3- anaplastyczny/duże komórki	Podtyp molekularny	Zakres resekcji 1 – całkowita 2 – prawie całkowita 3 – częściowa 4 - biopsja	Przerzuty w momencie rozpoznania 0 – nie 1 – tak	Grupy ryzyka 1 – standrdowe 2 - wysokie	Leczenie 1 – protokół 1 2 – protokół 2 [49]	Radioterapia 0 – nie 1 – tak	Remisja CR 0 – nie 1 – tak	Wznowa 0 – nie 1 – tak	Czas obserwacji [w miesiącach]	Zgon 0 – nie 1 – tak
1.	1	9	4	non WNT, non SHH, C-Myc(-), N-Myc (-)	3	1	2	1	1	1	0	14	0
2.	1	18	1	nonSHH non WNT C-myc -	3	1	2	1	1	0	0	9	0
3.	1	22	2	SHH/tp53 wildtype	1	0	1	3	1	1	0	18	0
4.	1	10	4	non SHH non WNT C-Myc (-) N-Myc (+)	1	0	2	1	1	1	0	5	0
5.	1	4	1	nonSHH non WNT C-Myc (-) N-Myc (-)	1	1	2	1	1	1	0	37	0
6.	2	5	6	nonSHH nonWNT C-Myc (-) N-Myc (+)	1	0	2	1	1	1	0	28	0

7.	1	15	1	WNT	1	0	1	1	1	1	0	33	0
8.	1	4	2	SHH	2	0	1	1	1	1	0	4	0
9.	1	10	4	nonSHH non WNT C-Myc (-) N-Myc (-)	2	1	2	3	1	1	0	29	0
10.	1	5	1	nonSHH non WNT C-Myc (-) N-Myc (-)	2	1	2	1	1	1	0	29	0
11.	1	14	1	non SHH non WNT C-Myc (-) N-Myc (-)	3	1	2	1	1	0	1	-	1
12.	1	5	1	nonSHH nonWNT C-Myc (-) N-Myc (-)	1	0	1	1	1	1	0	15	0
13.	1	4	4	nonSHHnonWNT C-Myc(-) N-Myc(-)	2	0	2	1	1	1	1	-	1
14.	2	5	4	nonSHHnonWNT C-Myc (-), N-Myc (-)	1	0	2	1	1	1	0	51	0
15.	1	6	2	SHH	1	0	1	1	1	1	0	14	0
16.	1	5	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	1	0	1	1	1	1	1	-	1

17.	2	4	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	2	0	1	1	1	1	0	13	0
18.	1	7	4	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	1	0	2	1	1	1	0	52	0
19.	1	11	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	2	1	2	1	1	1	0	46	0
20.	2	1	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	2	0		2	0	1	0	-	1
21.	1	6	1	non SHH, non WNT, C-Myc (-), N-Myc (-)	1	0	1	1	1	1	0	47	0
22.	1	6	4	nonSHHnonWNT C-Myc(-) N-Myc(+)	2	0	1	2	1	0	1	-	1
23.	2	5	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-) N-Myc(-)	2	0	1	1	1	1	0	55	0
24.	1	6	4	nonSHHnonWNT C-Myc(-) N-Myc(-)	1	0	2	1	1	1	0	60	0
25.	2	12	2	nonSHHnonWNT C-Myc(-) N-Myc(-)	4	1	2	1	1	1	0	-	1

26.	1	10	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-)	2	0	1	1	1	1	1	-	1
27.	1	8	4	nonSHHnonWNT C-Myc(-)	3	1	2	1	1	0	0	112	0
28.	2	9	1	WNT	3	0	2	1	1	1	0	75	0
29.	1	9	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-)	1	0	1	1	1	1	0	51	0
30.	2	9	4	nonSHHnonWNT C-Myc(-) N-Myc(-)	2	0	2	1	1	1	0	48	0
31.	1	9	4	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	1	0	2	1	1	1	0	49	0
32.	1	6	2	SHH z mutacją P53	1	0	2	1	1	1	1	-	1
33.	1	6	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	2	1	2	1	1	1	0	78	0
34.	1	5	1	non SHH, non WNT,C-Myc (-), N-Myc (-)	2	0	1	1	1	1	0	72	0
35.	1	5	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	1	1	2	1	1	1	0	54	0

36.	1	12	1	WNT	1	0	1	1	1	1	1	76	0
37.	1	8	4	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	2	1	2	1	1	1	0	67	0
38.	1	4	4	nonSHHnonWNTC-Myc(-) N-Myc(-)	3	1	2	1	1	0	0	75	0
39.	1	6	1	nonSHHnonWNT C-Myc(-), N-Myc(-)	1	0	1	1	1	1	0	87	0
40.	2	8	1	nonSHHnonWNT C-Myc N-Myc ujemne	2	1	2	1	1	1	0	121	0

W dalszej części pracy analizie poddano następujące grupy pacjentów:

- MB vs kontrola
- ze względu na podtyp histologiczny: 1 (klasyczny) vs 2 (desmoplastyczny/guzkowy) vs 3 (anaplastyczny/duże komórki)
- postać zlokalizowana vs przerzutowa
- wznowa choroby vs brak wznowy

3.1.2. Preparatyka próbek – próbki parafinowe

Do analizy za pomocą spektroskopii wibracyjnej użyto tkanek MB oraz kontrolnych tkanek mózgowia utrwalonych w formalinie (formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues), które następnie zostały zatopione w bloku parafinowym. Bloczki histopatologiczne zatopionych w parafinie tkanek mózgu zostały pocięte na skrawki o grubości 10 mikrometrów (µm) oraz nałożone na szkiełka z fluorku wapnia (CaF_2). Wybrano je ze względu na wysoką transmitancją dla promieniowania elektromagnetycznego z zakresu IR oraz niską dyspersję współczynnika załamania światła. Każda próbka była nakładana na szkiełka w trzech powtórzeniach.

3.2 Mięsak Ewinga

3.2.1 Charakterystyka badanej populacji. Dane medyczne

Badania przeprowadzono na próbkach pobranych od 27 pacjentów z rozpoznaniem kostnej postaci ES leczonych w latach 2011-2017. Leczenie chirurgiczne przeprowadzono w Klinice Chirurgii Onkologicznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. Każde rozpoznanie histopatologiczne było weryfikowane przez histopatologa posiadającego doświadczenie w diagnostyce guzów kości i tkanek miękkich. Przed usunięciem guza pacjentów poddano chemioterapii przedoperacyjnej składającej się z 6 cykli VIDE: winkrystyna, ifosfamid, etopozyd, doksorubicyna. Wstępną diagnostykę oraz ocenę odpowiedzi na chemioterapię przeprowadzono zgodnie ze standardami protokołu Euro-EWING 2008 [50]. Charakterystykę kliniczną pacjentów przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka pacjentów. Czas obserwacji liczono od daty operacji do ostatniego badania kontrolnego.

Numer pacjenta /próbki	Płeć 1 - chłopiec 2 - dziewczynka	Wiek [w latach w chwili biopsji]	Przerzuty w momencie rozpoznania 0 – nie 1 – tak	Radioterapia 0 – nie 1 – tak	Remisja CR 0 – nie 1 – tak	Odsetek martwicy [%]	Wznowa 0 – nie 1 – tak	Czas obserwacji [w miesiącach]	Zgon 0 – nie 1 – tak
1	2	9,5	1	1	1	100	0	69	0
2	2	13	0	0	1	100	1	39	0
3	2	14,5	0	1	1	95,6	0	31	0
4	2	7	1	1	1	100	0	29	0
5	2	5	1	0	1	95,5	0	24	0
6	2	8	1	0	0	100	0	17	0
7	2	9,5	0	1	1	99	0	20	0
8	2	15	1	1	1	95	0	63	0
9	2	11,5	1	0	1	100	0	32	0
10	1	12	0	0	1	78	0	53	0
11	1	16	0	0	1	100	0	15	0
12	2	7	1	0	1	100	0	15	0
13	2	14	1	1	0	95	1	34	1
14	1	14,5	1	1	1	100	1	61	0
15	2	18	1	1	1	99	1	70	0
16	2	12	0	1	1	80	1	36	1
17	1	14,5	1	1	1	94,4	1	24	1
18	1	16,5	0	1	1	30	1	28	0
19	1	17,5	0	1	1	61,8	1	12	0
20	1	9	0	1	0	66	1	14	1
21	1	20	0	1	0	60,6	1	21	1
22	1	16	1	1	1	0	1	18	1
23	2	16	0	0	1	100	1	17	0
24	1	8	1	0	1	100	1	22	1
25	2	7	1	0	1	100	1	47	0
26	1	18	1	1	1	99,8	1	27	1
27	1	17	1	1	0	92	1	17	1
Razem:	- 12 chłopców - 15 dziewczynek	Zakres: 5-20 Mediana: 12,8	Tak: 16 Nie: 11	Tak: 17 Nie: 10	Tak: 22 Nie: 5	Zakres: 0-100	Tak: 16 Nie: 11	Zakres: 12-70 Mediana: 31,7	Tak: 9 Nie:18

3.2.2 Preparatyka próbek – odparafinowane próbek

Do analizy za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) użyliśmy bloków parafinowych trzech rodzajów tkanek utrwalonych w formalinie (formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues). Pierwszy z bloków parafinowych to tkanka nowotworowa pobrana w wyniku biopsji diagnostycznej, która została wykonana przed podjęciem leczenia. Drugi blok zawiera materiał guza po chemioterapii przedoperacyjnej.

Trzeci blok to prawidłowa tkanka kostna pobrana od danego pacjenta w strefie poza obszarem naciekania nowotworu.

Bloczki histopatologiczne zatopionych w parafinie tkanek kości zostały precyzyjnie pocięte na odcinki o grubości 10 mikrometrów (µm) przy użyciu mikrotomu rotacyjnego. Skrawki tkanek FFPE były w kolejnym etapie nakładane na szkiełka z fluorku wapnia (CaF_2). Każda próbka była nakładana na szkiełka w trzech powtórzeniach.

Następnie dokonano odparafinowania tkanek poprzez płukanie próbek w dwóch zmianach ksylenu, natomiast nawodnienie odbyło się poprzez płukanie w szeregu alkoholowym, począwszy od alkoholu absolutnego czyli 99,8% poprzez 96% alkohol, 80% alkohol, aż do 70% alkoholu. Badane próbki płukano w wodzie destylowanej i wysuszono. Inkubacja każdego z roztworów trwała po 5 minut.

3.3 Spektrometr Ramana – charakterystyka, parametry pomiaru

Do pomiaru widm oscylacyjnych użyto spektrometru ramanowskiego SmartRaman DXR firmy Thermo Scientific. Jako źródła promieniowania wykorzystano laser o długości emitowanej fali elektromagnetycznej 780 nm. Pomiary wykonano w zakresie przesunięcia Ramana od 100 do 3700 cm^{-1}, natomiast analizie poddano zakres „*fingerprint region*" dla próbek ramanowskich 500-1800 cm^{-1}. Zastosowano rozdzielczość widmową 4 cm^{-1}. W przypadku próbek nasyconych parafiną jak i odparafinowanych jako tło zastosowano pomiar powietrza. Otrzymane widma oscylacyjne poddano następnie procedurze korekcji linii bazowej (Rubberband, liczba punktów bazowych wynosiła 64) oraz normalizacji wektorowej. Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach. Obliczono średnie wartości liczb falowych dla poszczególnych grup funkcjonalnych w celu porównania ich intensywności dla każdego rodzaju badanej tkanki oraz każdej badanej podgrupy. Pomiary przeprowadzono w Instytucie Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk.

3.4 Spektrometr w podczerwieni – charakterystyka, parametry pomiaru

Do pomiaru użyto spektroskopu w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), Vertex 70v firmy Bruker. Skrawki tkanek badano w technice osłabionego całkowitego odbicia w średnim zakresie podczerwieni (400-4000 cm^{-1}), przy wykorzystaniu jednoodbiciowej przystawki ATR (Attenual Total Reflectance) z kryształem diamentowym. Liczba skanów 32 przy rozdzielczości widmowej 2 cm^{-1}. Dokonano analizy widmowej w zakresie 800-3500 cm^{-1} liczby falowej.

W widmach FTIR można wyróżnić trzy zasadnicze grupy odpowiadające podstawowym składnikom budulcowym komórek tj.: pasma kwasów nukleinowych (1000 - 1250 cm^{-1}), białek (1500 - 1560 cm^{-1},1600 - 1700 cm^{-1}) oraz lipidów (2800 - 3000 cm^{-1}) [51].

W przypadku próbek nasyconych parafiną, jak i odparafinowanych jako tło zastosowano pomiar powietrza. Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach. Uzyskane widma oscylacyjne poddano normalizacji wektorowej (w celu uniknięcia różnicowania względem grubości próbki) oraz korekcji linii bazowej (concave rubberband correction) liczba punktów bazowych wynosiła 64. Obliczono średnie wartości liczb falowych dla poszczególnych grup funkcjonalnych w celu porównania ich intensywności dla każdego rodzaju badanej tkanki oraz każdej badanej podgrupy. Widma IR drugiej pochodnej uzyskano przy zastosowaniu 13 punktów wygładzania zgodnie z protokołem Savitzky-Golay. Pomiary zostały wykonane w Pracowni Spektroskopii w Dalekiej Podczerwieni Centrum Innowacji i Transferu Wiedzy Techniczno-Przyrodniczej Uniwersytetu Rzeszowskiego.

3.5 Analiza danych spektralnych

W celu uzyskania informacji o podobieństwie między próbami i wykluczeniu wartości odstających, przeprowadzono hierarchiczną analizę skupień (HCA). Służy ona do dzielenia obserwacji na grupy (klastry) na podstawie podobieństw między nimi. Odległości spektralne obliczono jako odległość euklidesową, a poszczególne klastry wyodrębniono zgodnie z algorytmem grupy parowanej (UPGMA). Ponadto w celu uzyskania informacji o zmienności widm w zależności od rodzaju próbek przeprowadzono analizę składowych głównych (PCA). Principal Component Analysis jest techniką matematyczną opartą na transformacji liniowej, często stosowaną w badaniach spektroskopowych. Głównym celem analizy PCA jest uproszczenie (redukcja liczby zmiennych), identyfikacja różnych wzorców w złożonych danych oraz wykrycie korelacji między zmiennymi [52]. Analiza głównych komponentów generuje nowy zestaw zmiennych, zwanych składowymi głównymi. Każdy główny składnik jest liniową kombinacją oryginalnych zmiennych. Ostatecznie zmniejsza się wymiarowość dużych zbiorów danych, w celu wizualizacji ogólnej zmienności, którą można osiągnąć za pomocą wykresów wyników i obciążeń. W przypadku analizy PCA przeprowadzanej na widmach FTIR oraz Ramana zmiany wynikają ze spektralnej wielowymiarowości, na którą może wpływać: zmiana konformacji cząsteczki, wzrost lub spadek poszczególnych stężeń różnych składników biochemicznych, w tym lipidów, białek i kwasów nukleinowych.

Obie procedury przeprowadzono na drugiej pochodnej danych w obszarach „*fingerprint region*”:

a) Dla danych z spektroskopii w podczerwieni FTIR między 800 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} (z wyłączeniem sekcji parafiny 1350-1500 cm^{-1}).
b) Dla danych ramanowskich między 500 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} z wyłączeniem sekcji parafin dla pików znajdujących się na poziomie: 1065 cm^{-1}, 1131 cm^{-1}, 1296 cm^{-1} oraz 1449 cm^{-1} tj. zakresów 1025-1160 cm^{-1}, 1250-1330 cm^{-1}, 1400-1500 cm^{-1}.

Uśrednione widma FTIR drugiej pochodnej wykorzystano do obliczenia składu procentowego struktury drugorzędowej białka (α-helisa, β-kartka i β-zwrot) w obszarze spektralnym zastosowanego pasma amidu I (1600cm^{-1} do 1700cm^{-1}).

Analizę danych przeprowadzono za pomocą programów: OPUS 7.0, WiRE 5.3, Past software 4.04 oraz KnowItAll Academic Edition. Dodatkowo obliczono analizę dynamiki widm w środowisku Matlab Simulink (MathWorks, Natick, MA).

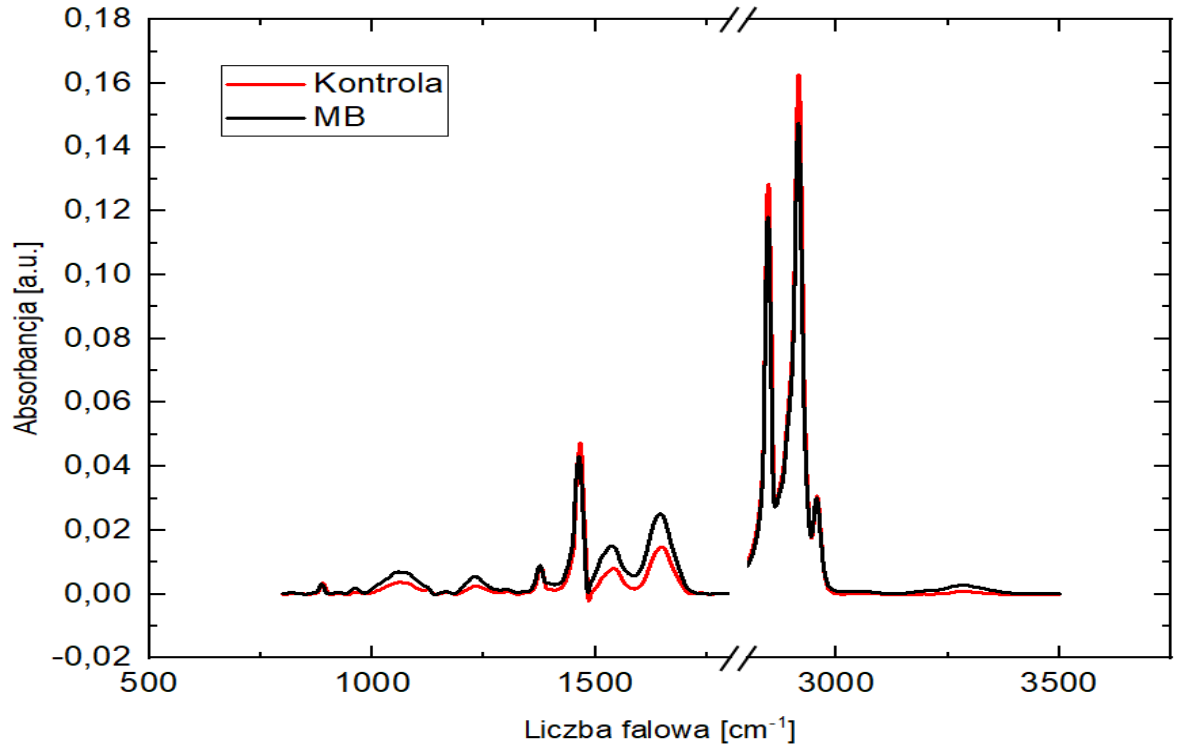
Uczenie maszynowe ML - (ang. *Machine Learning*) wykonano poprzez wykorzystanie 3 różnych algorytmów: drzewa decyzji (C5.0), lasu losowego (RF, ang. *Random Forest*) oraz k najbliższych sąsiadów (kNN, ang. *k Nearest Neigbours*). Eksperymenty wykonano metodą 10-krotnej skrośnej walidacji (ang. *10-fold Cross Validation*), która dla takich danych jest standardem w dziedzinie ML.

Rozdział 4.

Wyniki – Medulloblastoma

4.1 Analiza spektralna widm FTIR

Uzyskane dane spektralne średniej FTIR ze wszystkich złośliwych tkanek nowotworowych mózgu MB (czarny) i średniej grupy kontrolnej (czerwony) przedstawiono na Wykresie 1. Zakres pomiarowy 800-3500 cm^{-1} z wykluczonym obszarem wolnym od podczerwieni 1800-2800 cm^{-1}. Ze względu na parafinowy charakter próbek w pracy wykluczono z zaawansowanych analiz zakres, w którym występują piki pochodzenia lipidowego (2800-3500 cm^{-1}). Na Wykresie nr 1 oraz w Tabeli nr. 3 odnotowano jednak ich położenia charakterystyczne.



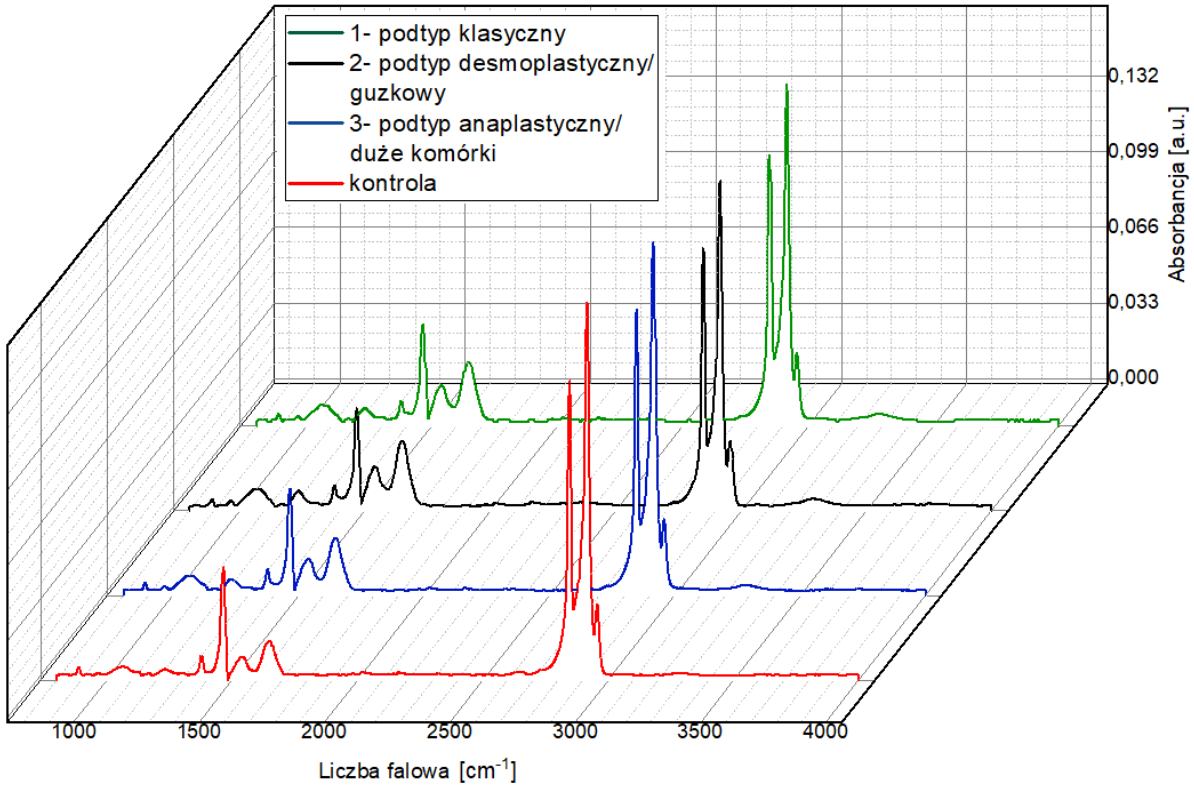
Wykres 1. Widma FTIR średniej złośliwej tkanki nowotworowej mózgu - rdzeniaka (czarny) i średniej grupy kontrolnej (czerwony). Zakres pomiarowy 800-3500 cm^{-1}.

Tabela 3. Widma FTIR średniej grupy kontrolnej oraz średniej złośliwej tkanki nowotworowej mózgu - rdzeniaka. Zakres pomiarowy 800-3500 cm^{-1}.

Kontrola	Absorbancja [a.u.]	MB	Absorbancja [a.u.]
889	0,003	889	0,003
brak	brak	964	0,002
1063	0,004	1061	0,007
1125	0,002	brak	brak
1168	0,001	1168	0,001
1232	0,003	1232	0,006
1302	0,001	1301	0,001
1377	0,009	1377	0,009
1466	0,047	1465	0,043
1541	0,008	1538	0,015
1650	0,015	1647	0,025
2847	0,128	2847	0,118
2915	0,163	2915	0,148
2956	0,031	2956	0,03
3283	0,001	3283	0,003

4.1.1 Przypisanie charakterystycznych pasm w poszczególnych podtypach histologicznych.

Ze względu na rozpoznanie histopatologiczne badane tkanki rdzeniaka zarodkowego podzielono na trzy grupy. Pierwsza zawierała podtyp klasyczny - 21 pacjentów (kolor zielony). Druga grupa to podtyp desmoplastyczny/guzkowy - 5 pacjentów (kolor czarny). Trzecia grupa bloczków FFPE pochodziła z tkanek zawierających podtyp anaplastyczny/duże komórki - 4 przypadki (zaznaczono na niebiesko).



Wykres 2. Średnie widma spektroskopii FTIR dla MB podtypu: 1- klasycznego (kolor zielony), 2 - desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), 3 - anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Zakres pomiarowy 800-3500 cm^{-1}.

Porównanie najważniejszych pików odpowiadającym poszczególnym grupom funkcyjnym dla kontroli oraz dla każdego podtypu histologicznego wraz z opisem pasm charakterystycznych przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Częstotliwości drgań pików i ich przypisania w różnych podtypach histologicznych w widmach FTIR [53-57].

Kontrola	Podtyp klasyczny	Podtyp desmoplastyczny/ guzkowy	Podtyp anaplastyczny/ duże komórki	Przypisanie biochemiczne głównych pasm
889	889	888	889	C-C, C-O deoksyryboza (węglowodany, kwasy nukleinowe)
920	921	920	920	C—C α-helisa, region fosfodiestrowy (kwasy nukleinowe)
brak	964	964	964	C—C, C—O dezoksyryboza (kwasy nukleinowe)
1063	1060	1062	1062	drgania C—O dezoksyryboza/ryboza (kwasy nukleinowe, lipidy)
brak	1087	1085	1090	symetryczne zginania PO2 (kwasy nukleinowe)
1125	brak	brak	brak	C—O, C—C, PO4 (węglowodany, kwasy nukleinowe, RNA)
1168	1168	1168	1168	C—C, C—OH, C—O drgania rozciągające (białka)
1233	1232	1233	1233	C—C rozciągające, C—H zginające, C–O rozciągające, dezoksyryboza/ryboza, DNA, RNA (kwasy nukleinowe)
1303	1302	1301	1301	deformacja N—H cytozyny (kwasy nukleinowe, lipidy)
brak	brak	brak	1341	CH3 drgania symetryczne (białka)
1377	1377	1377	1377	piki parafinowe, deformacja CH3, amid III (lipidy, białko)
1466	1466	1465	1465	piki parafinowe, drgania zginające białek CH2 i CH3 metylu, drgania nożycowe CH2 (lipidy)
1541	1538	1539	1538	Amid II: drgania zginające N—H oraz drgania rozciągające C—N (białka)
1650	1647	1646	1648	Amid I: drgania rozciągające C-O (białka)
1737	brak	1737	1734	drgania C-O (głównie lipidy, białka)
2847	2847	2847	2847	piki pochodzące z parafiny, nakładające się na symetryczne drgania rozciągające CH2 (głównie lipidy, białka)
2915	2915	2915	2915	piki pochodzące z parafiny, nakładające się na asymetryczne drgania rozciągające CH2 (głównie lipidy, białka)
2956	2956	2956	2956	piki pochodzące z parafiny, nakładające się na asymetryczne drgania rozciągające CH3 (głównie lipidy, białka)
3283	3283	3283	3282	drgania rozciągające grup NH w łańcuchach peptydowych oraz drgań rozciągających grup funkcyjnych wody (białka, woda)

Analiza widma na Wykresie 2 oraz danych zawartych w Tabeli 4 ukazuje widoczne przesunięcia niektórych pików w średnim widmie z próbek kontrolnych a w stosunku do odpowiadającym im pikom w średnim widmie MB. W próbkach kontrolnych nie zarejestrowano piku przy 964 cm^{-1} liczby falowej związanego z ugrupowaniami C-C, C-O dezoksyrybozy w kwasach nukleinowych, w przeciwieństwie do próbek nowotworowych, w których pik ten znajduje się w każdym podtypie histologicznym na tym samym poziomie.

W próbkach MB uwidoczniono duże przesunięcia przypisane do symetrycznego drgania rozciągającego dla ugrupowania PO_2: 1087 cm^{-1} dla podtypu klasycznego, 1085 cm^{-1} dla podtypu desmoplastycznego i 1090 cm^{-1} dla podtypu anaplastycznego. Dodatkowo w zdrowej kontroli tego piku nie zaobserwowano.

Zmiany zawartości RNA monitorowano przy piku 1125 cm^{-1} liczby falowej. Obecność tego prążka odnotowano tylko w próbkach kontrolnych. Ciekawym przypadkiem jest pik 1341 cm^{-1}, który występuje tylko w podtypie anaplastycznym MB, przypisuje się go drganiom symetrycznym CH_3 w białkach. Dodatkowo u pacjentów z tkankami nowotworowymi zaobserwowano, że piki przypisane białkom: 1541 cm^{-1} (amid II) i 1650 cm^{-1} (amid I) wykazują przesunięcie do niższych liczb falowych w porównaniu z próbką kontrolną. Zaobserwowano również brak występowania piku 1737 cm^{-1} w klasycznym podtypie MB, a w pozostałych analizowanych tkankach potwierdzono jego obecność.

4.1.2 Analiza pasm składowych regionu drgań grup funkcyjnych należących do amidu I-rzędowego. Określenie struktury drugorzędowej białka w poszczególnych podtypach histologicznych.

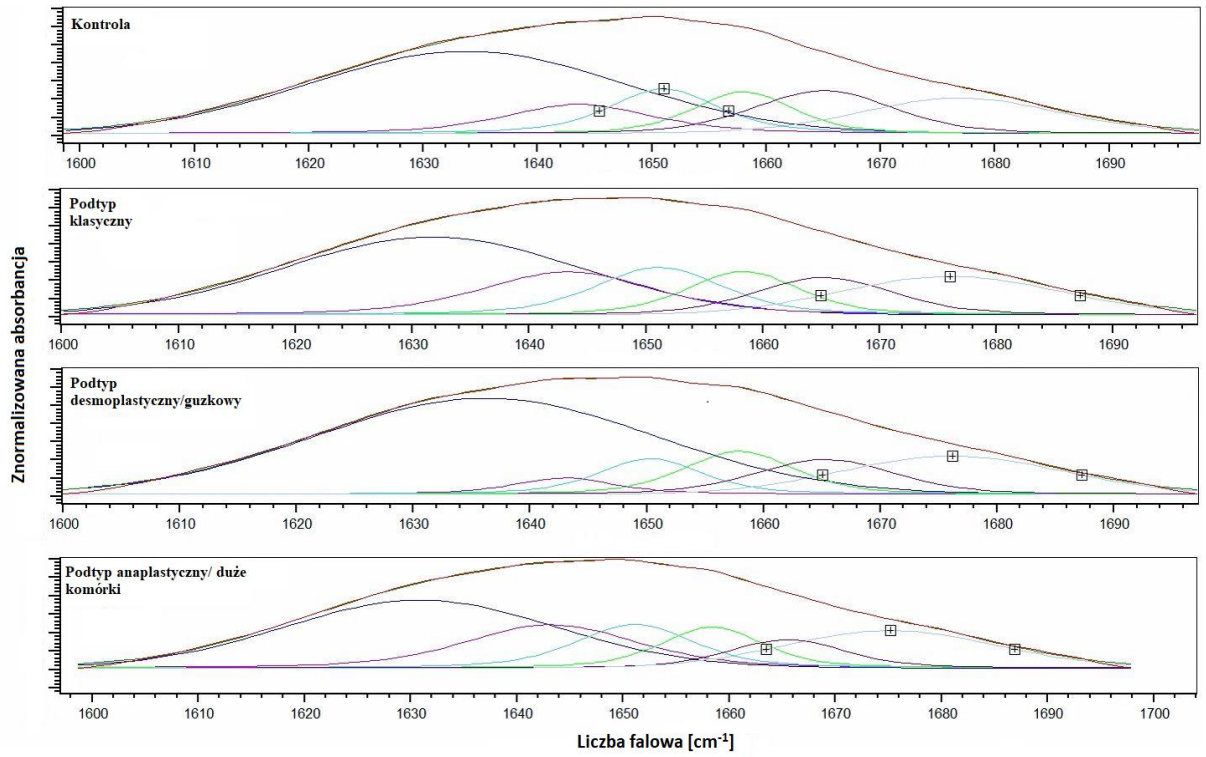
Analiza widm FTIR wykazała znaczące przesunięcia pików absorbancji amidu I pomiędzy poszczególnymi typami histologicznymi rdzeniaka zarodkowego. W celu dalszego zbadania tych różnic wykonano rozplot (ang. „*Peak fitting"*) tj. rozkład na poszczególne pasma składowe.

Różnorodność wiązań chemicznych i grup, które składają się na widmo oscylacyjne białka amidowego I, utrudnia jego interpretację. W tym celu region od 1600 cm^{-1} do 1700 cm^{-1} białka amidu I został przekształcony w drugą pochodną, co pozwoliło na łatwą identyfikację położenia prążków składowych [58,59]. Minima drugiej pochodnej ukazały pozycje poszczególnych linii widmowych dla każdej z nich przypisano określoną konformację białka (z wykorzystaniem danych literaturowych) [60,61].

Tabela 5. Przypisanie pozycji pasma amidu I do struktury drugorzędowej białka [cm^{-1}].

Struktura drugorzędowa białka	**Kontrola**	**Podtyp klasyczny**	**Podtyp desmoplastyczny/ guzkowy**	**Podtyp anaplastyczny/ duże komórki**
β-kartka	1631	1630	1631	1630
β-kartka	1641	1641	1641	1641
α-helisa	1652	1649	1648	1649
α-helisa	1658	1659	1659	1659
β-zwrot	1680	1679	1680	1680
β- kartka	1691	1691	1691	1691

Następnie przeprowadzono Gaussowską dekompozycję (rozplot) białka, czyli podział na poszczególne pasma składowe dla średnich próbek kontrolnych i próbek MB w trzech podtypach (Wykres 3). Stosując tylko pozycje pików z widma drugiej pochodnej dla analizowanej próbki znaleziono 6 różnych pików w regionie amidu I. Otrzymane pozycje pików z przyporządkowanymi im odpowiednimi strukturami drugorzędowymi zebrano w Tabeli 5. Pozycje linii obserwowanych po dekompozycji amidu I dla próbek MB są bardzo podobne (przesunięcie na poziomie 1 cm^{-1}). Wyjątkiem jest tutaj linia związana z α-helisą i zlokalizowana w próbce kontrolnej na poziomie 1649 cm^{-1} liczby falowej, dla wszystkich tkanek z rdzeniakiem zarodkowym możemy zaobserwować spadek do niższych liczb falowych. Linie znajdujące się w zakresie spektralnym 1648-1659 cm^{-1} odpowiadają strukturze białka α-helisy. Pasma przy 1631, 1641 i 1691 cm^{-1} są przypisane do β-kartki (β-harmonijki) [62]. Ostatnia znaleziona struktura w naszych próbkach to zwrot β, co jest związane z liniami zarejestrowanymi z obszaru około 1680 cm^{-1} [63-65].

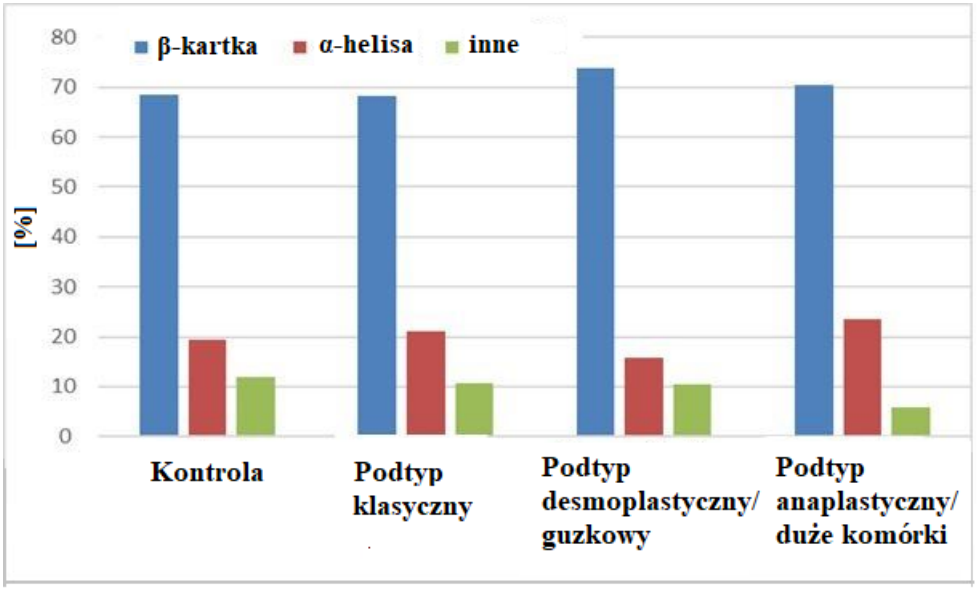


Wykres 3. Dopasowanie krzywej pasma amidu I dla kontroli i rdzeniaka zarodkowego w trzech podtypach histologicznych: klasycznym, desmoplastycznym/guzkowym i anaplastycznym/duże komórki.

Skład procentowej struktury drugorzędowej białka w strukturze całkowitego białka dla każdego podtypu histologicznego (według względnej powierzchni prążków składowych) przedstawiono w Tabeli 6 i na Wykresie 4. Występujące różnice w konformacji białka mogą być wynikiem zmian jakie zaszły w komórce po transformacji nowotworowej. Stwierdzono, że struktura i organizacja struktur białkowych różni się w różnych typach histologicznych. Istotne zmiany dotyczą powierzchni zarejestrowanych linii struktur białkowych. Największe różnice odnotowano w widmach FT-IR pasma amidu I dla struktury β-kartki w podtypie desmoplastycznym/guzowym, gdzie nastąpił wzrost wartości (73,7%) w porównaniu z kontrolą (68,5%). W przypadku udziału struktury α-helisy w podtypie desmoplastycznym/guzowym wartości wynosiły 15,8%, podczas gdy w kontroli zaobserwowano wzrost do wartości wyższych (19,5%).

Tabela 6. Skład procentowej struktury drugorzędowej białka w każdym podtypie histologicznym, według względnej powierzchni pasm składowych.

	β-kartka [%]	**α-helisa [%]**	**inne [%]**
Kontrola	68,5	19,5	12,0
Podtyp klasyczny	68,2	21,2	10,6
Podtyp desmoplastyczny/ guzkowy	73,7	15,8	10,5
Podtyp anaplastyczny/ duże komórki	70,5	23,6	5,9

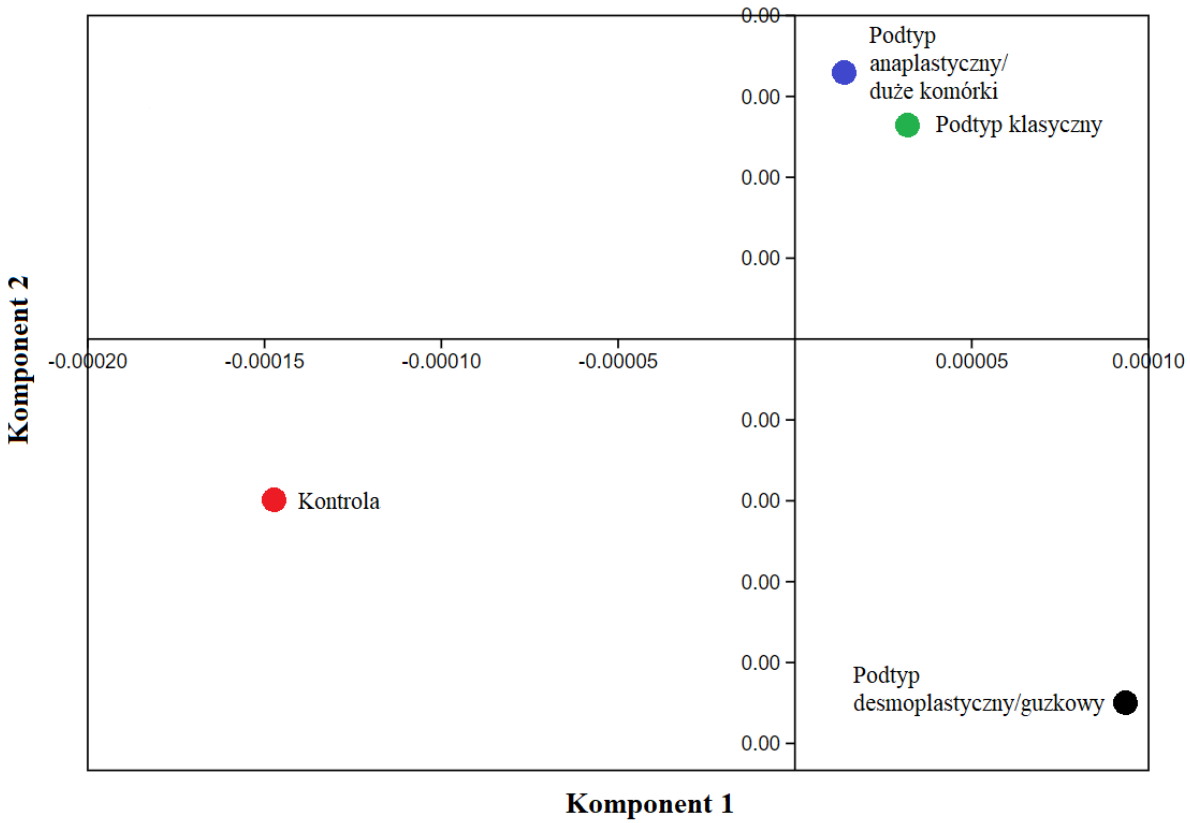


Wykres 4. Procentowy skład struktury drugorzędowej białka dla kontroli i rdzeniaka zarodkowego w różnych podtypach histologicznych: klasycznym, desmoplastycznym/guzkowym i anaplastycznym/ duże komórki.

Biorąc pod uwagę różnice w składzie procentowym α-helisy pomiędzy poszczególnymi podtypami histologicznymi (Wykres 4) oraz jej przesunięcie szczytu liczby falowej dla próbek rdzeniaka zarodkowego względem kontroli (zawarte w Tabeli 5) zauważono największe różnice dla podtypu desmoplastycznego/guzkowego dlatego też w dalszej części pracy wykonano dodatkowe analizy PCA (Wykresy 7 oraz 8) i HCA (Wykres 9).

4.1.3 Statystyczne analizy wielowymiarowe dla poszczególnych podtypów histologicznych.

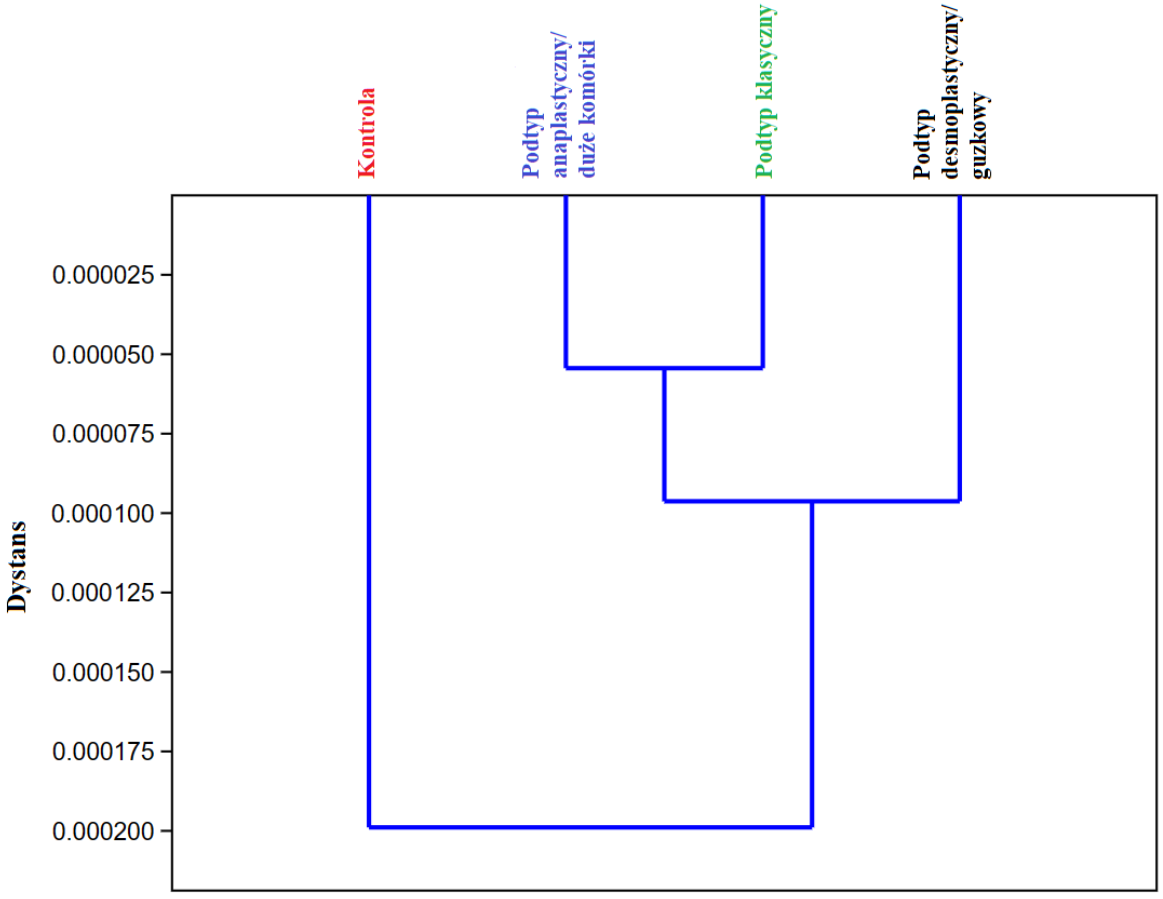
Otrzymane średnie widma dla każdego podtypu histologicznego MB oraz zdrowych pacjentów poddano analizie głównych składowych (PCA) i hierarchicznej analizie skupień (HCA) (Wykresy 5 i 6). Drugą pochodną widm analizowano w zakresie „*fingerprint region*", z wyłączeniem regionów odpowiadających parafinie w celu uniknięcia zafałszowania danych.



Wykres 5. Analiza PCA widm ATR-FTIR dla MB podtypu: klasycznego (kolor zielony), desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Wykres dla średnich próbek z ujętymi różnicami w składzie biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*". Analizę przeprowadzono na drugiej pochodnej widma.

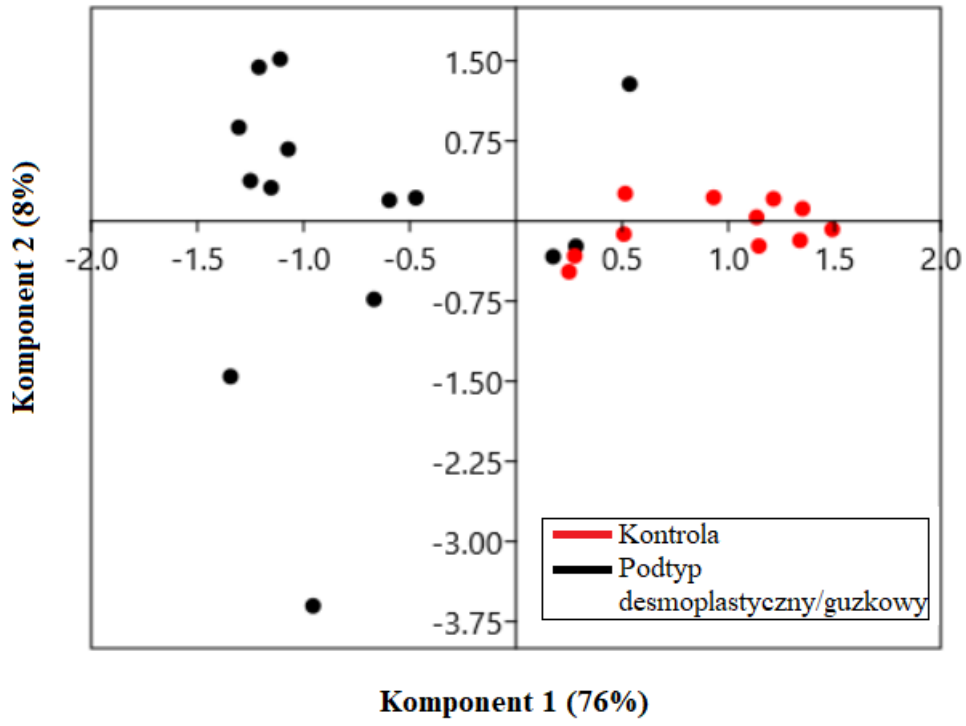
Analiza głównych składowych (PCA) została przedstawiona na Wykresie nr 5. Wykres punktowy ukazuje wyraźny podział na dwa klastry, pod względem komponentu 1. Pierwszy z nich jest przesunięty w kierunku dodatnich wartości dla PC1 i zawiera wszystkie podtypy

histologiczne MB badanych próbek, co oznacza, że są one do siebie podobne pod względem składu chemicznego. Można zaobserwować szczególnie silne podobieństwo między klasycznym podtypem (kolor zielony) a próbkami podtypu anaplastycznego (niebieski), co sugeruje bardzo bliskie ułożenie próbek względem siebie. Natomiast próbka kontrolna jest przesunięta w przestrzeni wykresu w kierunku ujemnych wartości dla PC1, co wskazuje na istnienie w niej innych ugrupowań biochemicznych pod względem jakościowym i/lub ilościowym.



Wykres 6. Analiza HCA widm ATR-FTIR dla grupy kontrolnej (kolor czerwony) oraz MB podtypu: anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski), klasycznego (kolor zielony), desmoplastycznego/ guzkowego (kolor czarny). Wykres dla średnich próbek z ujętymi różnicami w składzie biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*". Analizę przeprowadzono na drugiej pochodnej widma.

Analiza HCA (hierarchiczna analiza skupień) potwierdza wyniku uzyskane w PCA (Wykres 5). Dendrogram hierarchicznej analizy skupień (HCA) utworzył dwa początkowe klastry. Próbki kontrolne zostały sklasyfikowane jako klaster pierwszy. Natomiast drugi klaster, zawiera próbki MB. Podobnie jak w analizie PCA tutaj również widać silne podobieństwa między próbkami podtypu klasycznego (zielony) i anaplastycznego (niebieski). Opisane analizy PCA i HCA potwierdzają, że komórki nowotworowe MB posiadają zmienioną strukturę w analizowanym zakresie przypisanym do białek i kwasów nukleinowych. Użyte metody klasyfikacji pokazują, że w analizowanym zbiorze próbek możliwe jest odróżnienie zdrowej tkanki mózgu od tkanki z MB za pomocą spektroskopii FTIR.



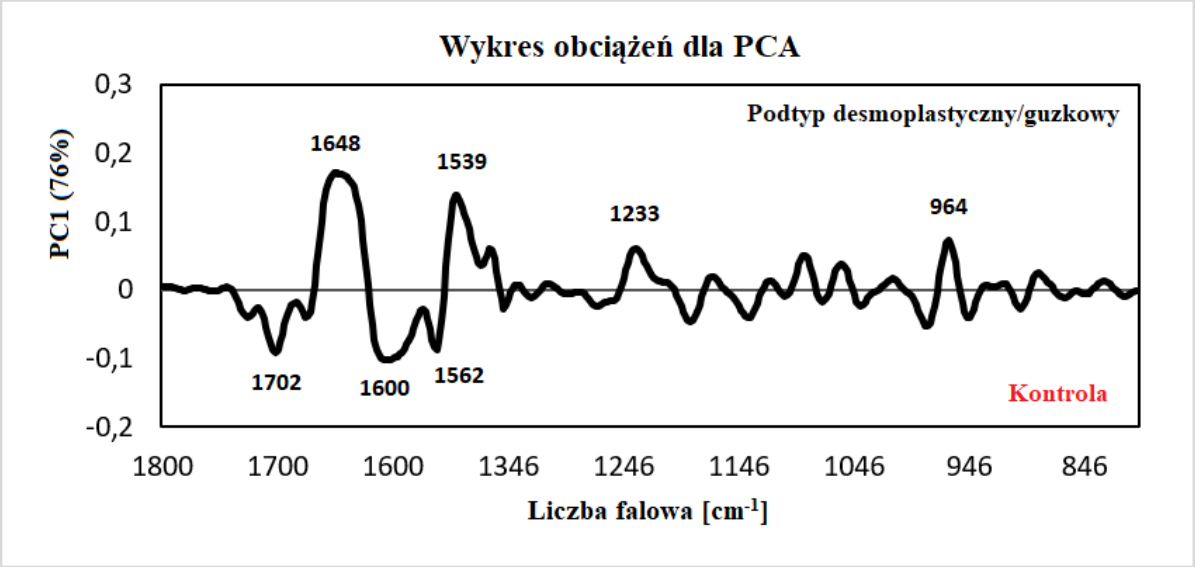
Wykres 7. Analiza PCA poszczególnych widm spektroskopii ATR-FTIR grupy kontrolnej (kolor czerwony) oraz podtypu desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny). Dwuwymiarowy (2D) wykres wyników dla próbek z różnicami w składnikach biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*". Analizie poddano każdy indywidualny pomiar.

Graficzne przedstawienie zmiennych w wyniku analizy PCA na Wykresie 5 ukazało, że średnia z kontroli oraz średnia dla typu desmoplastycznego znajdują się po przeciwnych stronach co oznacza ich silnie ujemnie skorelowane. Dlatego też na Wykresie 7 przedstawiono dodatkową analizę komponentów podstawowych tych próbek biorąc pod uwagę każdy

indywidualny pomiar próbek. Na jej postawie można stwierdzić, że istnieją wyraźne różnice w widmie FTIR między tkankami prawidłowymi a podtypem desmoplastycznym MB. Wykres punktowy ukazuje wyraźny podział na dwa klastry, oznaczone kolorami: czerwonym dla grupy kontrolnej oraz czarnym dla podtypu desmoplastycznego/guzkowego. Grupa kontrolna znajduje się w centralnej części wykresu, w przeciwieństwie do bardziej rozproszonej grupy z MB (co może być spowodowane faktem większej ilości pomiarów grupy MB). Komponent 1 (PC1) wyjaśnia 76% zmienności danych. Klastry są nieznacznie ze sobą zmieszane w centralnej części grafu, jednakże wzór ten jest charakterystyczny dla próbek biologicznych. Wyjątkiem zachodzącym/łączącym się z próbkami kontrolnymi są pomiary uzyskane od pacjenta nr 25. Był to jedyny z badanej grupy pacjent z rozpoznanym podtypem desmoplastycznym/ guzkowym MB, u którego wystąpiły przerzuty.

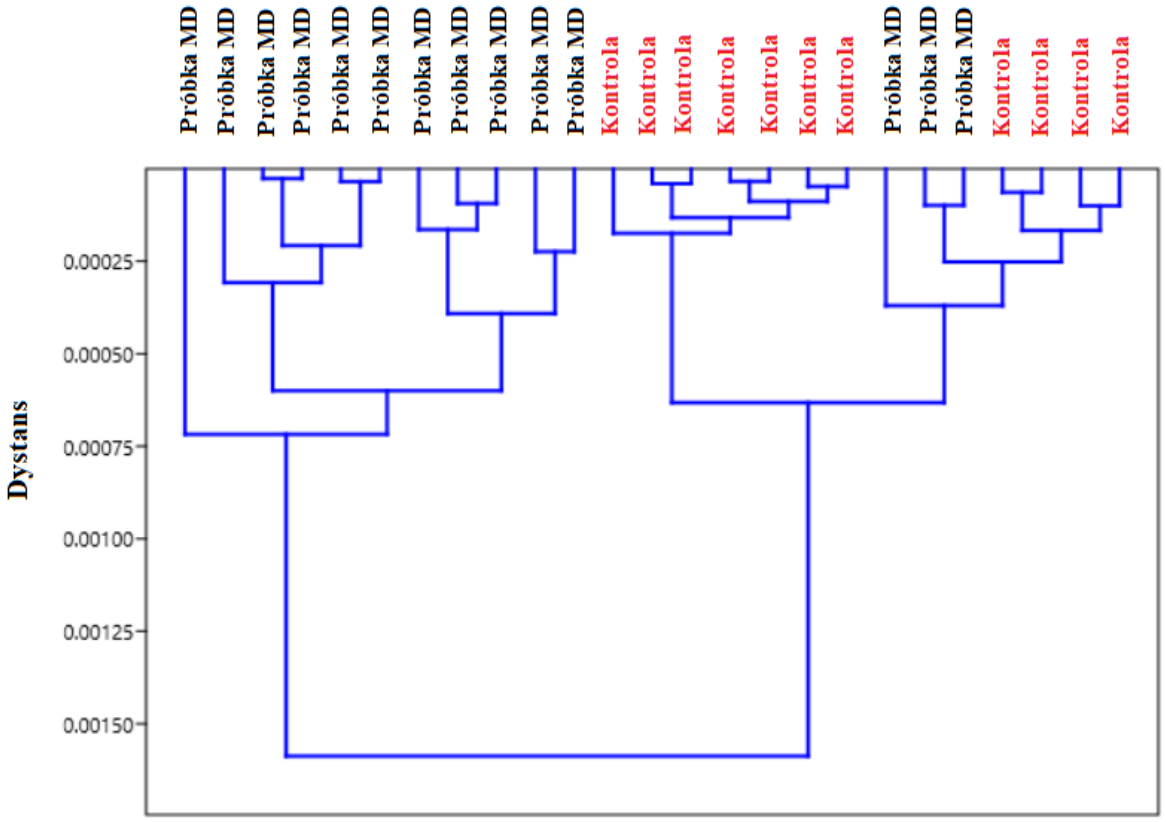
Wykres 8 zawiera obciążenia dla PC1 (komponent 1) z analizy PCA, która wyrażała prawie 76% informacji pierwotnego zbioru danych. Klaster czerwony (próbki kontrolne) jest przesunięty w przestrzeni wykresu w kierunku dodatnich wartości dla PC1, co odpowiada ujemnym wartościom na wykresie obciążeń. Natomiast klaster czarny (MB) jest przesunięty w kierunku ujemnych wartości dla tego samego komponentu, co odpowiada dodatnim wartościom na wykresie obciążeń.

Dodatnie ładunki na PC1 należą do szczytu liczby falowej 1648 cm^{-1}, jak wspomniano wcześniej, jest ona związana ze strukturą α-helisy w amidzie I, ten wynik potwierdza poprzednie analizy nad dekonwulacją (rozdział 4.1.2) oraz silny wpływ drugorzędowych struktur białek w procesie nowotworzenia. Dodatkowe różnicujące piki znajdują się na poziomie 1539 cm^{-1}, 1233 cm^{-1} i 964 cm^{-1} (odpowiednie przypisy znajdują się w Tabeli 4). Jak pokazano na wykresie obciążenia, najbardziej widocznym negatywnym czynnikiem, który odróżnia podtyp desmoplastyczny od kontrolnego, jest obciążenie przy 1702 cm^{-1}. Kolejne ujemne ładunki wskazano na 1600 cm^{-1} i 1562 cm^{-1}. Wszystkie te piki wynikają z pasm amidu I (rozciąganie CO i CN, zginanie NH) i amidu II (zginanie NH, rozciąganie CN) w zakresie 1500-1700 cm^{-1} [66].



Wykres 8. Wykres obciążeń PC1 dla PCA z Wykresu 7. Analizy przeprowadzono na widmach ATR FTIR drugiej pochodnej w obszarze „*fingerprint region*".

Analiza HCA (Wykres 9) potwierdza, że widma FTIR w zakresie „*fingerprint region*" są w stanie sklasyfikować dane w dwóch klastrach, które odpowiadają podtypowi . desmoplastycznym/guzkowym MB (kolor czarny), oraz tkance kontrolnej (czerwony). Jedynym wyjątkiem, podobnie jak w PCA, jest pacjent nr 25.

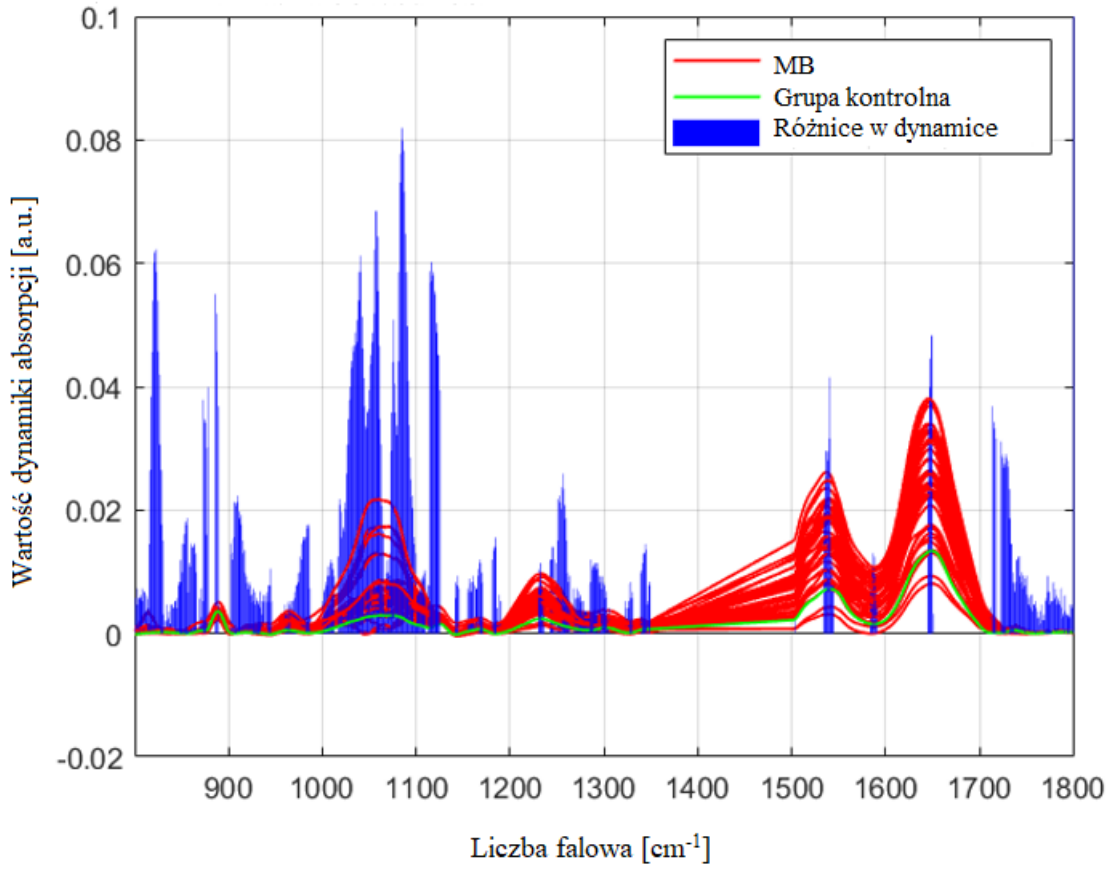


Wykres 9. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) ze spektroskopii ATR-FTIR drugiej pochodnej widma kontrolnego (kolor czerwony) i podtypu desmoplastycznego/guzkowatego MB (kolor czarny). Przeanalizowano każdy indywidualny pomiar.

4.1.5. Analiza dynamiki absorbancji

W celu poszukiwania markerów diagnostycznych, wykonano analizę dynamiki absorbancji widm FTIR [67,68] uzyskanego z tkanki MB oraz z tkanki kontrolnej. Technika ta jest oparta na analizie różnic pomiędzy średnim widmem uznanym za widmo wzorcowe (np. prawidłowa tkanka niezmieniona patologicznie) a średnim widmem badanym. W tym przypadku za widmo referencyjne uznano średnie widmo pacjentów bez wznowy i do niego została odniesiona dynamika absorbancji średniego widma pacjentów ze wznową.

Uzyskane rozbieżności mogą być wykorzystane jako wskaźniki różnicujące próbki MB od kontroli dzięki zmienionemu składowi biochemicznymi tych próbek. Na Wykresie 10 przedstawiono widma pacjentów z MB wraz ze średnimi widmami grupy kontrolnej i wyraźnymi różnicami w dynamice.



Wykres 10. Graficzne przedstawienie różnic w dynamice absorpcji pomiędzy pacjentami z rdzeniakiem zarodkowym a grupą kontrolną w obszarze 800-1800 cm^{-1} liczby falowej (uwzględniono resekcję lipidów w zakresie 1350-1500 cm^{-1}). Czerwone linie przedstawiają widma pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym, zielona to średnia dla grupy kontrolnej, a niebieskie pionowe słupki przedstawiają zsumowaną, znormalizowaną różnicę w dynamice absorbancji między pacjentami z rdzeniakiem zarodkowym a grupą kontrolną.

W Tabeli 7 zestawiono tzw. prawdopodobieństwo dyskryminacji dla poszczególnych zakresów liczb falowych, które określa, w jakim odsetku poszczególnych próbek MB dynamika absorbancji różniła się od wartości dla widma średniego uzyskanego z kontroli, w zależności od podtypu MB. Regiony te można wykorzystać jako potencjalne markery do rozróżniania pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym tylko na podstawie ich widma IR.

Tabela 7. Regiony liczb falowych, które mogą być wykorzystane jako potencjalne markery do rozróżniania pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym na podstawie widma FTIR. Kolumny od 2 do 5 pokazują odpowiednie prawdopodobieństwa dyskryminacji.

Zakres liczb falowych [cm^{-1}]	Prawdopodobieństwo dyskryminacji [%] dla pacjentów z MB	Prawdopodobieństwo dyskryminacji [%] dla podtypu klasycznego	Prawdopodobieństwo dyskryminacji [%] dla podtypu desmoplastycznego / guzkowatego	Prawdopodobieństwo dyskryminacji [%] dla podtypu wielkokomórkowego/ anaplastycznego
829 – 830	69 – 95	76 – 95	60 – 100	61 – 92
873 – 875	77 – 90	76 – 90	80	69 – 92
920 – 932	59 – 77	48 – 81	20 – 100	38 – 84
944 – 945	69 – 87	71 – 95	60 – 100	69
1063 – 1065	72 – 79	81 – 86	60 – 80	61 – 69
1115 – 1125	74 – 95	81 – 100	80 – 100	61 – 84
1285 – 1287	77 – 87	71 – 81	100	76 – 92
1343 – 1345	82 – 90	81 – 90	100	76 – 92
1540 – 1541	69 – 90	81 – 86	40 – 80	62 – 100
1649 – 1650	85 – 97	85 – 100	100	76 – 92
1714 – 1716	**100**	**100**	**100**	**100**
1723 – 1736	64 - 97	71 – 100	40 – 100	46 – 92

Największe, aż 100% prawdopodobieństwo dyskryminacji zaobserwowano w zakresie liczb falowych jest 1714-1716 cm^{-1}, które odpowiadają za obecność grup karbonylowych w tyminie oraz guaninie [69].

Wartość dynamiki absorpcji [a.u.] dla próbek MB w zakresach, dla których prawdopodobieństwo dyskryminacji > 80% zestawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Wartość dynamiki absorpcji [a.u.] dla próbek MB oraz poszczególnych podtypów histologicznych w zakresach, dla których prawdopodobieństwo dyskryminacji > 80%.

Zakres lb. falowej	Pacjenci MB	MB podtyp klasyczny	MB podtyp desmoplastyczny/ guzkowy	MB podtyp anaplastyczny/ duże komórki
1063-1065 cm^{-1}	Średnia [a.u.]: 0,43081 SD: 0,506502 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 2,56688	Średnia [a.u.]: 0,49757 SD: 0,560528 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 2,56688	Średnia [a.u.]: 0,31632 SD: 0,328684 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 0,80377	Średnia [a.u.]: 0,366982 SD: 0,484822 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 1,63347
1115-1125 cm^{-1}	Średnia [a.u.]: 11,54062 SD: 6,451643 Zakres [a.u.]: 0,000000 -28,65045	Średnia [a.u.]: 12,33062 SD: 5,596899 Zakres [a.u.]: 1,011194 - 25,33167	Średnia [a.u.]: 14,35893 SD: 5,513054 Zakres [a.u.]: 8,634025 - 21,39061	Średnia [a.u.]: 9,180511 SD: 7,683251 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 28,65045
1285-1287 cm^{-1}	Średnia [a.u.]: 0,52521 SD: 0,400781 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 1,52976	Średnia [a.u.]: 0,52227 SD: 0,411945 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 1,32233	Średnia [a.u.]: 0,76229 SD: 0,473001 Zakres [a.u.]: 0,388921 - 1,52976	Średnia [a.u.]: 0,438783 SD: 0,345998 Zakres [a.u.]: 0,077785 - 1,21862

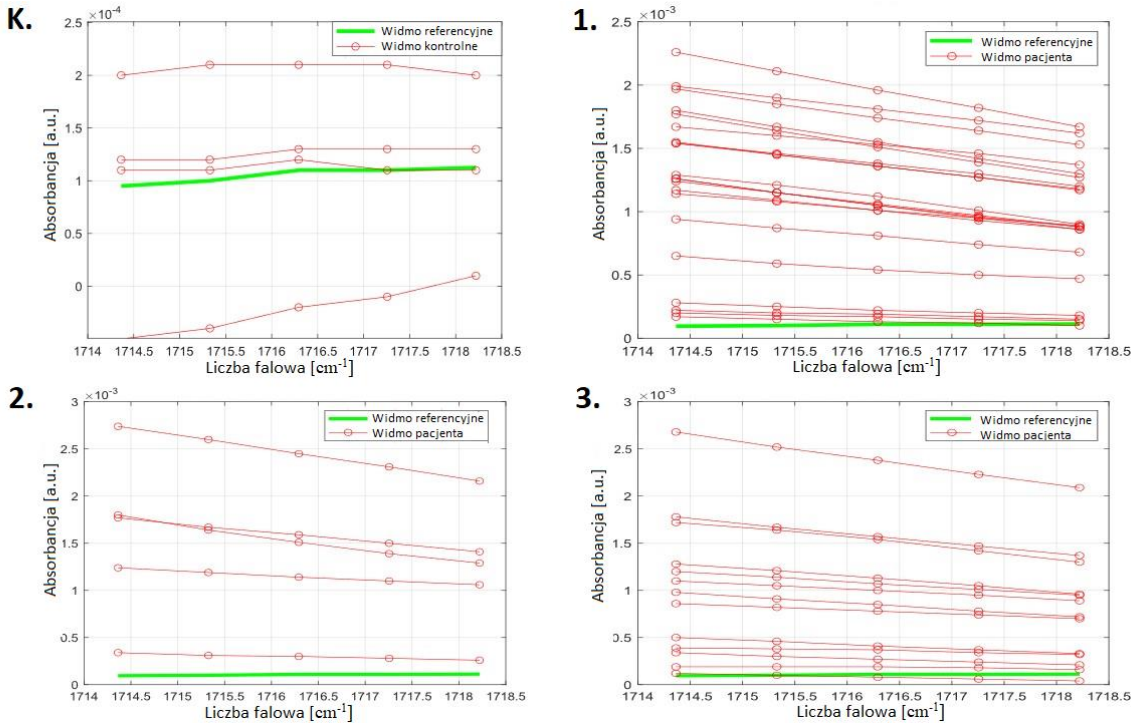
1343-1345 cm^{-1}	Średnia [a.u.]: 0,59967 SD: 0,427167 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 2,04831	Średnia [a.u.]: 0,54943 SD: 0,461024 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 2,04831	Średnia [a.u.]: 0,72080 SD: 0,247609 Zakres [a.u.]: 0,388919 - 1,01119	Średnia [a.u.]: 0,634238 SD: 0,437409 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 1,32233
1540-1541 cm^{-1}	Średnia [a.u.]: 0,58770 SD: 0,436352 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 2,07424	Średnia [a.u.]: 0,63215 SD: 0,492937 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 2,07424	Średnia [a.u.]: 0,47707 SD: 0,489757 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 1,24454	Średnia [a.u.]: 0,558448 SD: 0,329434 Zakres [a.u.]: 0,103712 - 1,14083
1649-1650 cm^{-1}	Średnia [a.u.]: 1,41939 SD: 1,068536 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 4,82260	Średnia [a.u.]: 1,45567 SD: 1,021880 Zakres [a.u]: 0,025928 - 3,47435	Średnia [a.u.]: 2,06387 SD: 1,585808 Zakres [a.u.]: 0,881551 - 4,82260	Średnia [a.u.]: 1,112908 SD: 0,871675 Zakres [a.u.]: 0,000000 - 2,95579
1714-1716 cm^{-1}	Średnia [a.u.]: 2,57618 SD: 1,331722 Zakres [a.u.]: 0,337065 - 5,10782	Średnia [a.u.]: 2,76195 SD: 1,187256 Zakres [a.u.]: 0,648201 - 5,00411	Średnia [a.u.]: 3,11655 SD: 1,820732 Zakres [a.u.]: 0,855625 - 5,00411	Średnia [a.u.]: 2,068261 SD: 1,303906 Zakres [a.u.]: 0,337065 - 5,10782

W celach diagnostyki chorób na podstawie badań spektroskopowych opracowano procedurę chemometryczną polegającą na porównywaniu widm spektroskopowych osób chorych z widmem referencyjnym (otrzymywanym jako średnia z widm kontrolnych). Porównywanie widm zostało oparte na analizie różnicy tempa zmian absorpcji porównywanych widm w dziedzinie liczb falowych. Matematycznie odpowiada to badaniu pochodnej cząstkowej widma *W* względem liczby falowej *k*. W wyniku porównania zostały wyznaczone regiony liczb falowych, w których występują, istotne z punktu widzenia biochemii choroby, różnice pomiędzy widmami osób chorych a widmem referencyjnym.

W wyznaczonych regionach można zauważyć charakterystyczne zachowanie się pierwszej pochodnej i tak dla tkanek chorych zachodzi: $\frac{\partial W}{\partial k}\Big|_{k=\{region\}} < 0$, natomiast dla tkanek kontrolnych: $\frac{\partial W}{\partial k}\Big|_{k=\{region\}} \geq 0$.

Graficznie powyższe warunki oznaczaja, że w analizowanym regionie widmo tkanek od osób chorych maleje, a dla osób z grupy kontrolnej rośnie lub jest stałe. Postawiona hipoteza powinna zostać zweryfikowana na większej ilości pacjentów.

W celu weryfikacji powyższej metody poddano analizie region z zakresu 1714-1718 cm^{-1}. Jest to najciekawszy region ze względu na fakt, aż 100% prawdopodobieństwo dyskryminacji pomiędzy próbkami kontrolnymi a próbkami z MB (Tabela 7). Przykładowe graficzne prezentacje zachowania widm w regionie k={1714:1718} dla kontroli i trzech podtypów histopatologicznych przedstawiono na Wykresie 11.



Wykres 11. Analiza różnicy tempa zmian absorpcji pomiędzy widem referencyjnym oraz pacjentami z: K- grupy kontrolnej, 1- podtypu klasycznego, 2- podtypu desmoplastycznego/guzkowego, 3- podtypu anaplastycznego/duże komórki. Zakres analizy 1714-1718 cm^{-1}.

4.1.5. Machine Learning

W celu wykonania uczenia maszynowego (ang. *Machine Learning*, *ML*) przekształcono wyniki pomiarów FTIR i utworzono tzw. tablicę decyzji. W przypadku wyników spektrometrii w podczerwieni tablica decyzji zawiera w kolumnach wartości absorbcji dla poszczególnych długości fal (800 -3500), a w wierszach konkretne próbki pomiarowe. Ostatnia kolumna takiej tablicy to kolumna z klasą decyzji (Class) w naszych badaniach P (tkanka MB) lub N (kontrola), gdzie przykładów z kategorii P jest 189 (każde pojedyncze widmo), a z kategorii N również 189. Ponieważ pierwotnie danych kontroli (N) było jedynie 11, zostały one powielone tak aby zrównoważyć liczebność kategorii P i N. Łącznie zatem w tablicy znajdowało się 398 przypadków, wierszy. Schemat tablicy decyzji umieszczono w Tabeli 9.

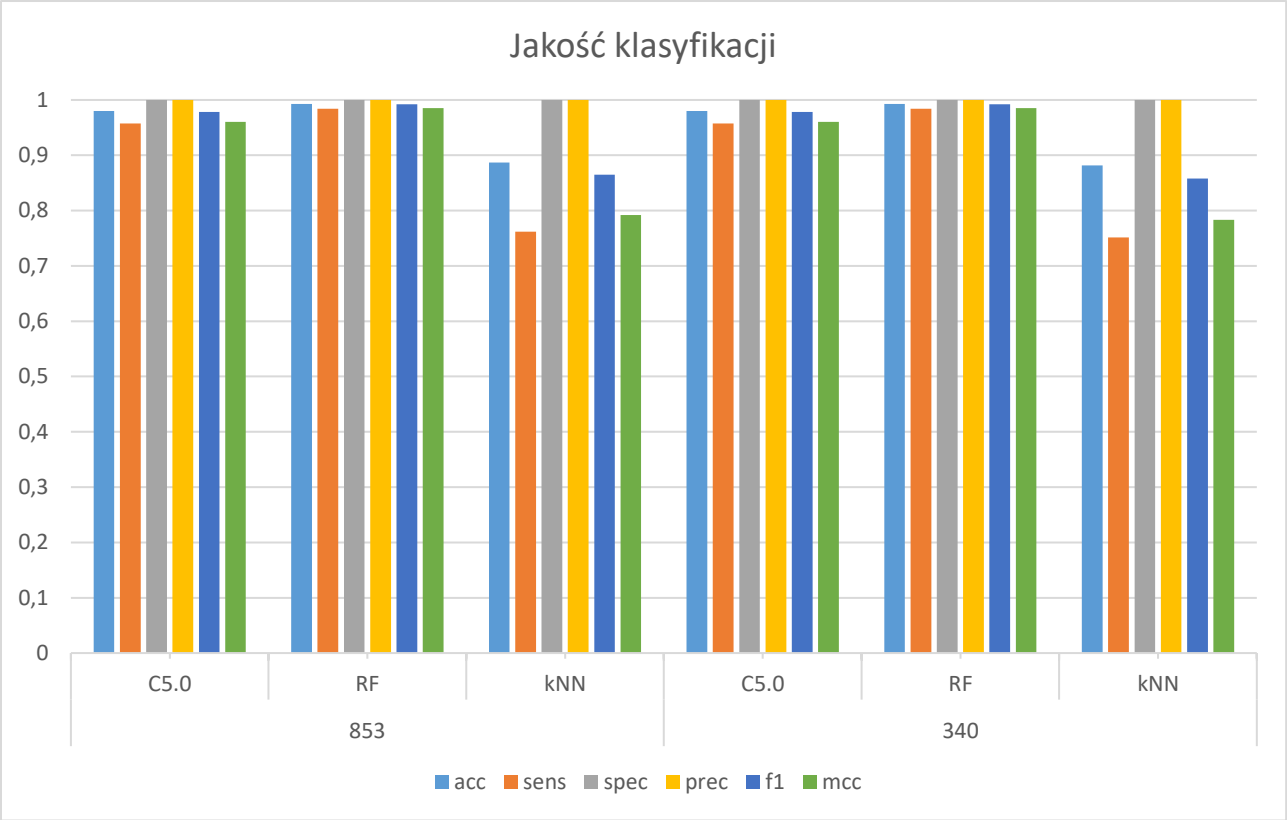
Tabela 9. Schemat tablicy decyzji dla ML zawierający dane ze spektrometrii FTIR.

3500	3498	3496	…	804	802	800	Klasa
-0,0000640180	-0,0000697564	-0,0000750250	…	-0,0000484051	-0,0000604306	-0,0000736280	P
-0,0000683000	-0,0000683653	-0,0000713640	…	-0,0000395728	-0,0000495864	-0,0000610758	P
-0,0000886074	-0,0000903762	-0,0000972205	…	-0,0000221495	-0,0000283105	-0,0000389930	P
…	…	…	…	…	…	…	…
-0,0000786093	-0,0000822518	-0,0000786093	…	-0,0001561357	-0,0001967782	-0,0002335274	N
-0,0000659838	-0,0000696208	-0,0000659838	…	-0,0001169648	-0,0001464277	-0,0001739501	N
-0,0001068707	-0,0001041125	-0,0001068707	…	-0,0001111947	-0,0001403262	-0,0001684132	N

Uczenie maszynowe ML (ang. *Machine Learning*) wykonano poprzez wykorzystanie 3 różnych algorytmów: drzewa decyzji (C5.0), lasu losowgo (RF, ang. *Random Forest*) oraz k najbliższych sąsiadów (kNN, ang. *k Nearest Neigbours*). Eksperymenty wykonano metodą 10-krotnej skrośnej walidacji (ang. *10-fold Cross Validation, 10 -CV*), która dla takich danych jest standardem w dziedzinie ML. Zastosowano parametry oceny jakości modeli: accuracy, sensitivity, specificity, precision, f1 i mcc. Ponadto wykonano selekcję wszystkich cech istotnych (istotnych długości fal) i spośród 853 algorytm selekcji cech wybrał 340 istotnych. Tabela 10 oraz Wykres 12 zawiera wyniki klasyfikacji metodą 10-CV dla obu zbiorów.

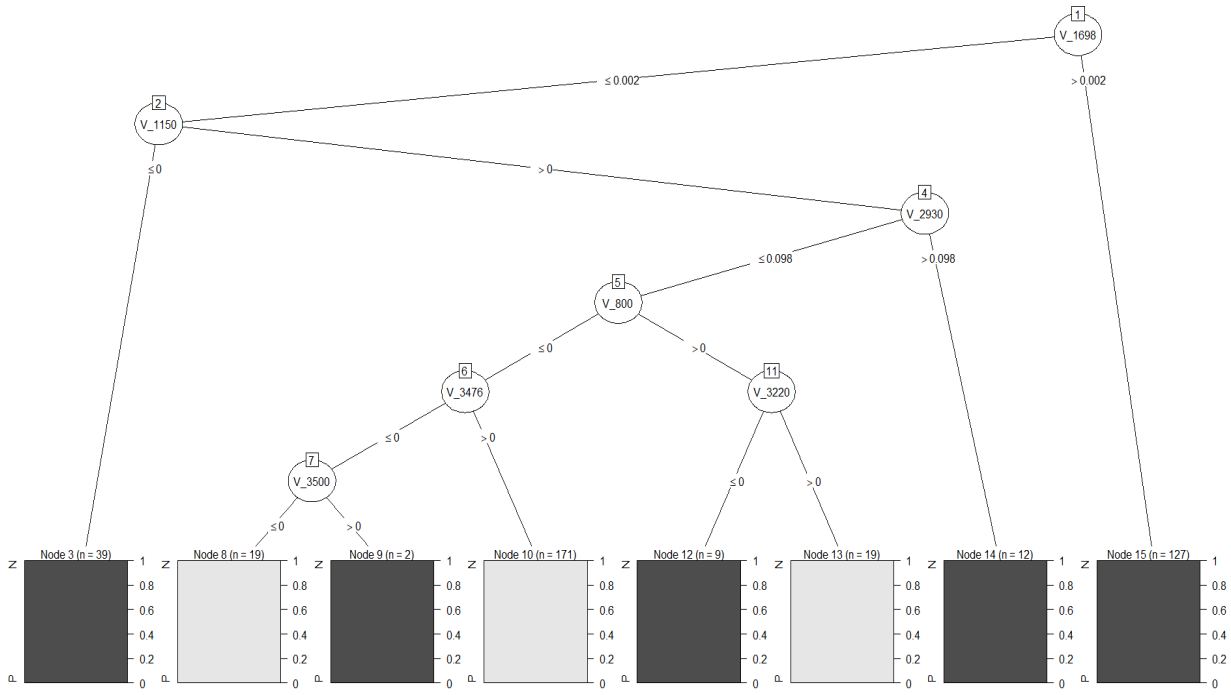
Tabela 10. Przedstawienie uzyskanych wyników klasyfikacji metodą 10-CV dla obu uzyskanych zbiorów. Zastosowane algorytmy: drzewa decyzji (C5.0), las losowy (RF) oraz k najbliższych sąsiadów (kNN). Parametry oceny jakości modeli: accuracy, sensitivity, specificity, precision, f1 i mcc.

Zbiór danych	Ilość cech	Algorytm	Accuracy	Sensitivity	Specificity	Precision	f1	mcc
1	853	C5.0	0.9799	0.9577	1	1	0.9784	0.9604
		RF	0.9925	0.9841	1	1	0.992	0.985
		kNN	0.8869	0.7619	1	1	0.8649	0.7918
2	340	C5.0	0.9799	0.9577	1	1	0.9784	0.9604
		RF	0.9925	0.9841	1	1	0.992	0.985
		kNN	0.8819	0.7513	1	1	0.858	0.7832



Wykres 12. Przedstawienie graficzne uzyskanych wyników klasyfikacji metodą 10-CV dla obu uzyskanych zbiorów. Zastosowane algorytmy: drzewa decyzji (C5.0), lasu losowego (RF) oraz k najbliższych sąsiadów (kNN). Parametry oceny jakości modeli: accuracy, sensitivity, specificity, precision, f1 i mcc.

Wykorzystując uczenie maszynowe ML, a dokładnie algorytm drzewa decyzji C5.0 uzyskano drzewo decyzji (Wykres 13) zbudowane na podstawie całej bazy, które ukazuje perfekcyjną klasyfikację różnicującą pomiędzy tkankami z MB oraz tkankami kontrolnymi (z dokładnością na poziomie 97,99%) przy zastosowaniu absorbancji dla wybranych 7 liczb falowych tj.: 800 cm^{-1}, 1150 cm^{-1}, 1698 cm^{-1}, 2930 cm^{-1}, 3220 cm^{-1}, 3476 cm^{-1}, 3500 cm^{-1}. Tym samym długości te można dla tej grupy badanej określić jako markery spektralne.



Wykres 13. Drzewo decyzji uzyskane dla algorytmu C5.0 zbudowane na podstawie całej bazy, gdzie zobrazowano perfekcyjną klasyfikację pomiędzy P (tkanka MB) i N (tkanka kontrolna) dla absorbancji 7 liczb falowych.

4.1.6. Właściwości fizykochemiczne w kontekście klinicznego przebiegu rdzeniaka zarodkowego u dzieci. Przypisanie charakterystycznych pasm dla poszczególnych grup pacjentów.

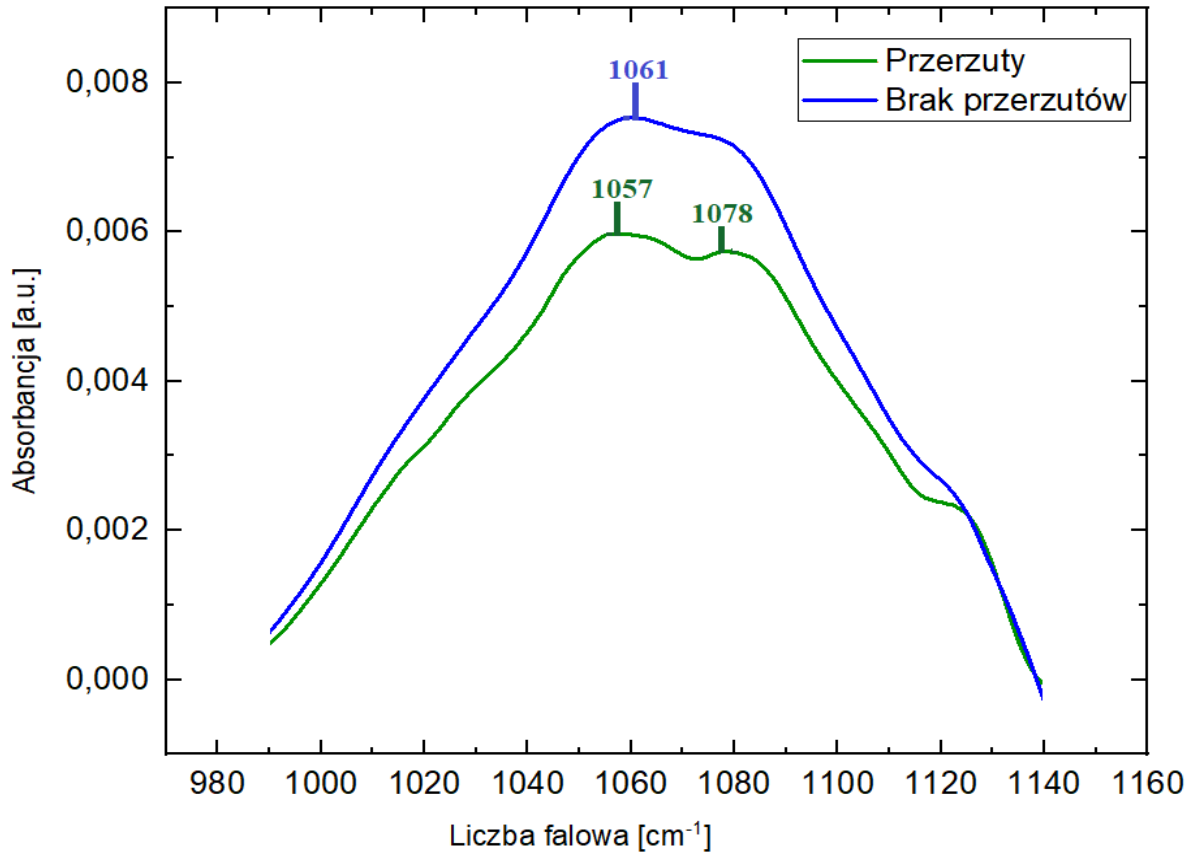
Porównanie pików dla średnich widm FTIR dla próbek od pacjentów u których odnotowano wystąpienie przerzutów - 14 przypadków (kolor zielony) oraz tkanek pacjentów u których nie wystąpiły przerzuty - 26 przypadków (kolor niebieski) zostało przedstawione w Tabeli 11.

Tabela 11. Piki uzyskane z średnich widm FT-IR w zakresie pomiaru 800-1800 cm^{-1} dla próbek od pacjentów u których odnotowano wystąpienie przerzutów oraz tkanek pacjentów u których nie wystąpiły przerzuty.

Przerzuty	Absorbancja [a.u.]	Brak przerzutów	Absorbancja [a.u.]
889	0,003	889	0,003
964	0,002	964	0,002
1057	0,006	1061	0,008
1078	0,006	brak	brak
1168	0,001	1168	0,001
1232	0,005	1233	0,006
1301	0,001	1301	0,002
1377	0,009	1377	0,009
1465	0,044	1466	0,042
1539	0,013	1538	0,016
1647	0,023	1646	0,027

Analiza Tabeli 11 ukazuje widoczne różnice w pikach oraz wartościach absorbancji pomiędzy próbkami od pacjentów u których odnotowano przerzuty, a widmami tkanki mózgowej z rdzeniakiem zarodkowym, u których przerzuty nie wystąpiły.

Szczególne znaczenie ma tutaj zakres 990-1140 cm^{-1} dlatego też został on dodatkowo przedstawiony na Wykresie 14. W widmie FTIR próbek mózgu pacjentów z MB ukazano duże przesunięcia przypisane do drgań C–O w dezoksyrybozie/rybozie odpowiednio wyniosły one 1057 cm^{-1} dla braku przerzutów oraz 1061 cm^{-1} dla pacjentów z przerzutami. Znaczącą różnicą w widmie uzyskanym od pacjentów u których nie odnotowano przerzutów jest fakt iż nie zarejestrowano dodatkowego piku na poziomie 1078 cm^{-1} liczby falowej który pojawił się w grupie pacjentów z przerzutami.

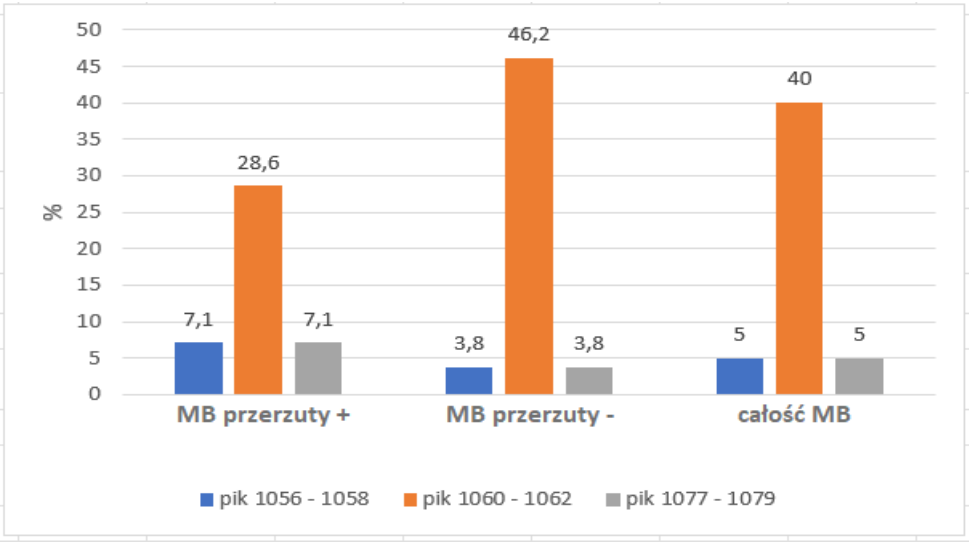


Wykres 14. Średnie widma FT-IR w zakresie pomiaru 990 -1140 cm^{-1} dla próbek od pacjentów u których odnotowano wystąpienie przerzutów (kolor zielony) oraz tkanek pacjentów, u których nie wystąpiły przerzuty (kolor niebieski).

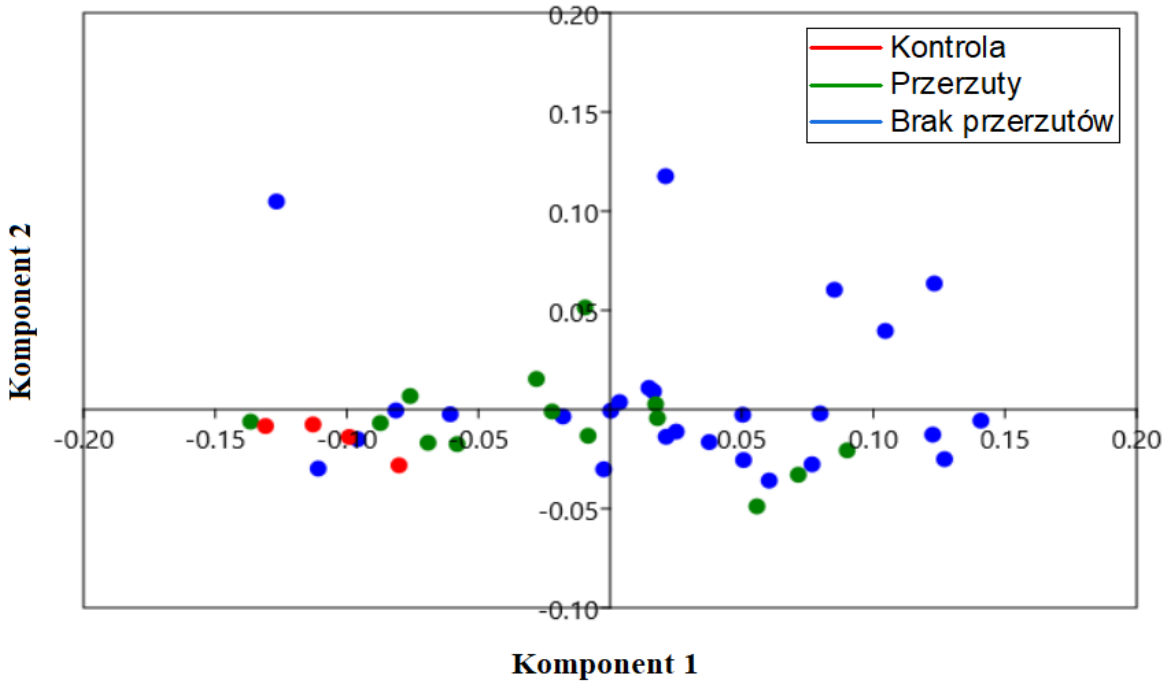
W Tabeli 12 oraz na Wykresie 15 przedstawiono ilościową oraz procentową obecność piku w zakresie 1056-1079 cm^{-1}. Obecność piku w zakresie 1060-1062 cm^{-1} w przypadku pacjentów z przerzutami odnotowano w 28,6% przypadków, natomiast przy braku przerzutów obecność tego piku plasuje się na poziomie 46,2%.

Tabela 12. Obecność piku w zakresie widmowym od 1056-1079 cm^{-1} widm FTIR dla: tkanek pacjentów z MB u których wystąpiły przerzuty, tkanek pacjentów z MB u których nie wystąpiły przerzuty oraz dla całości MB.

	MB przerzuty + n=14	**MB przerzuty - n=26**	**całość MB n=40**	**przerzuty + vs przerzuty –**
pik 1056-1058 cm^{-1}	n= 1 (7,1%)	n= 1 (3,8%)	n= 2 (5%)	1 (1,9%)
pik 1060-1062 cm^{-1}	n= 4 (28,6%)	n= 12 (46,2%)	n= 16 (40%)	0,3 (0,6%)
pik 1077-1079 cm^{-1}	n= 1 (7,1%)	n= 1 (3,8%)	n= 2 (5%)	1 (1,9%)



Wykres 15. Procentowe zestawienie obecność piku w zakresie widmowym od 1056-1079 cm^{-1} widm FTIR dla: tkanek pacjentów MB u których wystąpiły przerzuty, tkanek pacjentów MB u których nie wystąpiły przerzuty oraz dla całości MB.



Wykres 16. Analiza PCA widm ATR-FTIR dla grupy kontrolnej (kolor czerwony), pacjentów MB z odnotowaną obecnością z przerzutów (kolor zielony) oraz pacjentów MB u których nie wystąpiły przerzuty (kolor niebieski). Wykres przedstawia uśrednione pomiary dla każdego poszczególnego pacjenta w zakresie „*fingerprint region*". Analizę przeprowadzono na drugiej pochodnej widma.

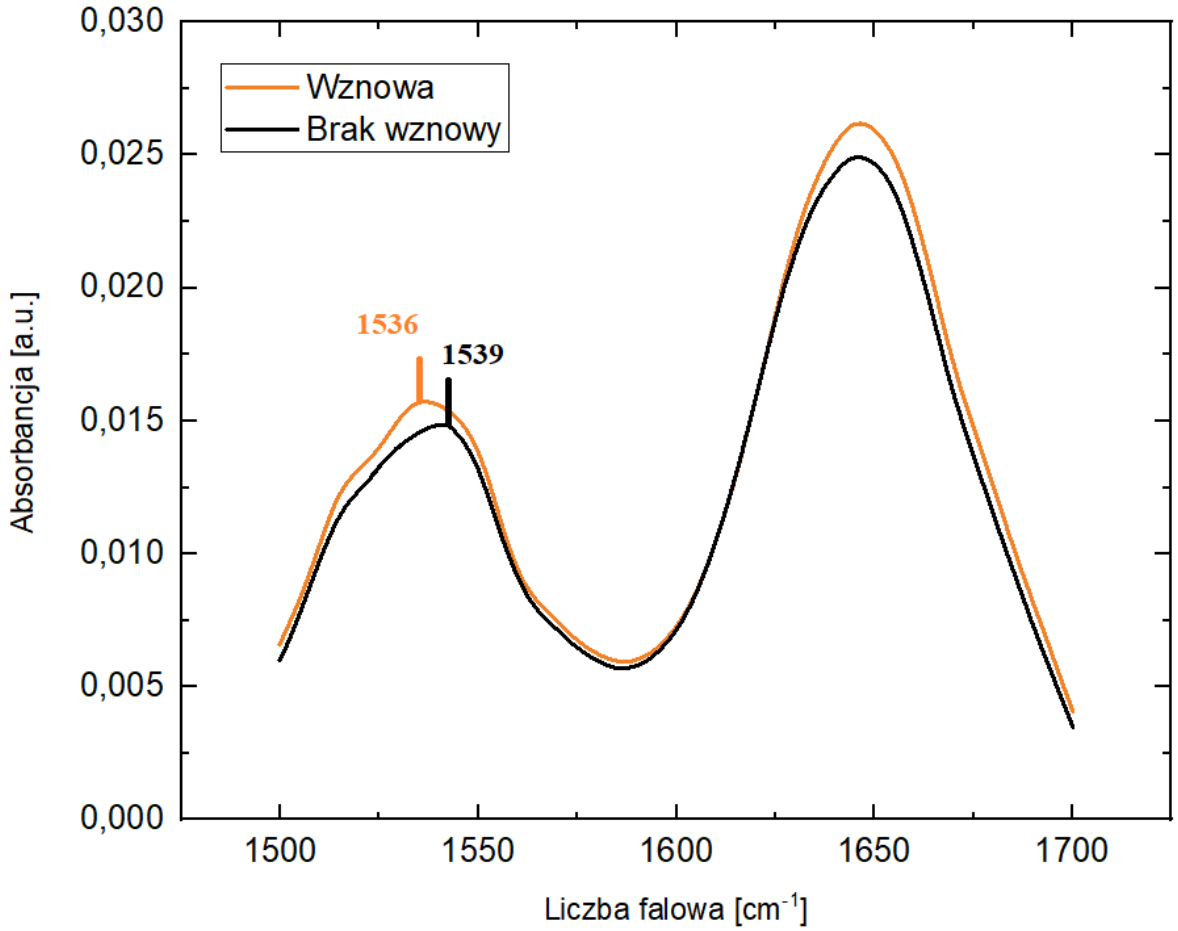
Analiza PCA dla: grupy kontrolnej (kolor czerwony), pacjentów MB z odnotowaną obecnością przerzutów (kolor zielony) oraz pacjentów MB u których nie wystąpiły przerzuty (kolor niebieski) została przedstawiona na Wykresie 16 Wyniki dla pacjentów z przerzutami jak i dla tych u których one nie wystąpiły są rozproszone, nie zaobserwowano wyraźnego kastrowania się poszczególnych grup. Jedynie kontrole pozostają zgrupowane względem siebie, jednak ze względu na fakt ich małej liczebności oraz obecności wokół nich pacjentów z MB nie jesteśmy w stanie potwierdzić skuteczności analizy PCA w tym przypadku. Wykonana analiza HCA pokrywała się z PCA dlatego też nie zamieszczono jej w powyższej pracy.

Zestawienie pików dla widm FTIR próbek rdzeniaka zarodkowego od pacjentów u których wystąpiła wznowa - 7 przypadków (kolor czerwony) oraz tkanek pacjentów u których nie odnotowano wznowy - 33 przypadki (kolor czarny) zostały zebrane w Tabeli 13.

Tabela 13. Piki uzyskane z średnich widm FT-IR w zakresie pomiaru 800-1800 cm^{-1} dla pacjentów z MB u których nie odnotowano wznowy oraz tkanek pacjentów u których wystąpiła wznowa. Zakres pomiaru 1500-1700 cm^{-1}.

Brak wznowy	**Absorbancja [a.u.]**	**Wznowa**	**Absorbancja [a.u.]**
889	0,003	1646	0,026
964	0,002	1536	0,016
1061	0,007	1464	0,041
1168	0,001	1378	0,009
1233	0,005	1301	0,001
1301	0,002	1232	0,006
1377	0,009	1169	0,001
1466	0,043	1061	0,008
1539	0,015	964	0,002
1647	0,025	889	0,003

W wyniku analizy średnich widm mózgowia zwrócono uwagę na pik pochodzący od amidu II. Na Wykresie 17 przedstawiono średnie widma FT-IR piku pochodzącego od amidu II dla próbek od pacjentów u których wystąpiła wznowa (kolor pomarańczowy) oraz tkanek pacjentów u których nie odnotowano wznowy (kolor czarny). Zakres pomiaru 1500-1700 cm^{-1}. Tkanki mózgowia pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym bez wznowy w stosunku do tkanek nowotworowych ze wznową wykazują istotne przesunięcie piku białkowego do niższych liczb falowych 3cm^{-1} (z 1539 cm^{-1} do 1536 cm^{-1}).

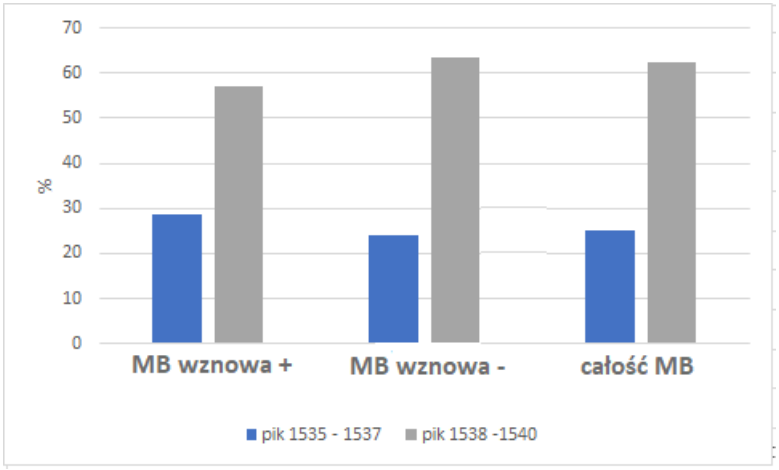


Wykres 17. Średnie widma FT-IR piku pochodzącego od amidu II dla próbek od pacjentów u których wystąpiła wznowa (kolor pomarańczowy) oraz tkanek pacjentów u których nie odnotowano wznowy (kolor czarny). Zakres pomiaru 1500-1700 cm^{-1}.

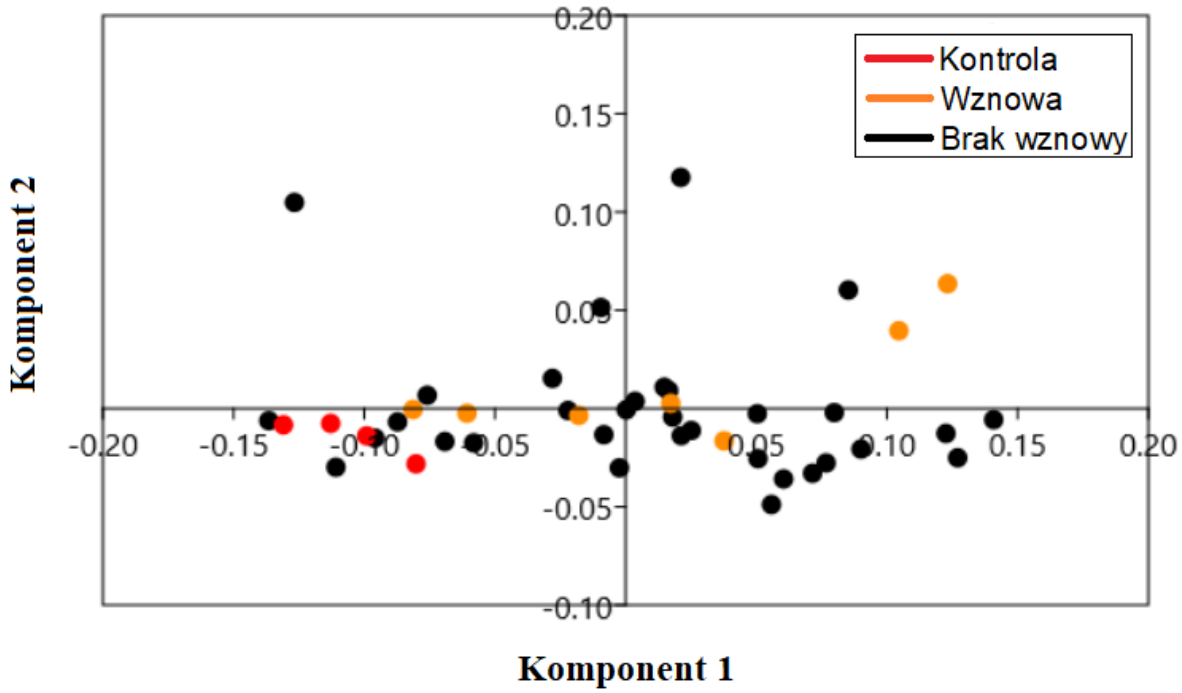
W Tabeli 14 oraz na Wykresie 18 przedstawiono ilościową oraz procentową obecność piku w zakresie 1535-1540 cm^{-1} dla pacjentów z MB u których odnotowano wznowę oraz dla tych bez wznowy. Nie wykazano istotnych różnic.

Tabela 14. Obecność piku w zakresie widmowym od 1535-1540 cm^{-1} widm FTIR dla: tkanek pacjentów MB u których wystąpiła wznowa, tkanek pacjentów MB u których nie odnotowano wznowy oraz dla całości analizowanej grupy.

	MB wznowa + **n=7**	**MB wznowa –** **n=33**	**całość MB** **n=40**	**wznowa + vs wznowa -**
pik 1535-1537	n= 2 (28,6%)	n= 8 (24,2%)	n= 10 (25%)	0,25 (1,2%)
pik 1538-1540	n= 4 (57,1%)	n= 21 (63,6%)	n= 25 (62,5%)	0,2 (0,9%)



Wykres 18. Procentowe zestawienie obecność piku w zakresie widmowym od 1535-1540 cm^{-1} widm FTIR dla: tkanek pacjentów MB u których wystąpiła wznowa, tkanek pacjentów MB u których nie odnotowano wznowy oraz dla całości analizowanej grupy.



Wykres 19. Analiza PCA widm ATR-FTIR dla grupy kontrolnej (kolor czerwony), pacjentów MB z odnotowaną wznową (kolor pomarańczowy) oraz pacjentów MB u których nie wystąpiła wznowa (kolor czarny). Wykres przedstawia uśrednione pomiary dla każdego poszczególnego pacjenta w zakresie „*fingerprint region*". Analizę przeprowadzono na drugiej pochodnej widma.

Analiza PCA dla: grupy kontrolnej (kolor czerwony), pacjentów MB z odnotowaną wznową (kolor pomarańczowy) oraz pacjentów MB u których nie wystąpiła wznowa (kolor czarny) została przedstawiona na Wykresie 19. Wyniki dla pacjentów z odnotowaną wznową jak i dla tych u których ona nie wystąpiła są rozproszone, nie zaobserwowano wyraźnego kastrowania się poszczególnych grup. Próbki kontrole formują się blisko względem siebie, jednak ze względu na fakt ich małej liczebności oraz obecności wokół nich pacjentów z MB nie jesteśmy w stanie potwierdzić skuteczności analizy PCA w tym przypadku. Wykonana analiza HCA pokrywała się z PCA dlatego też nie zamieszczono jej w powyższej pracy.

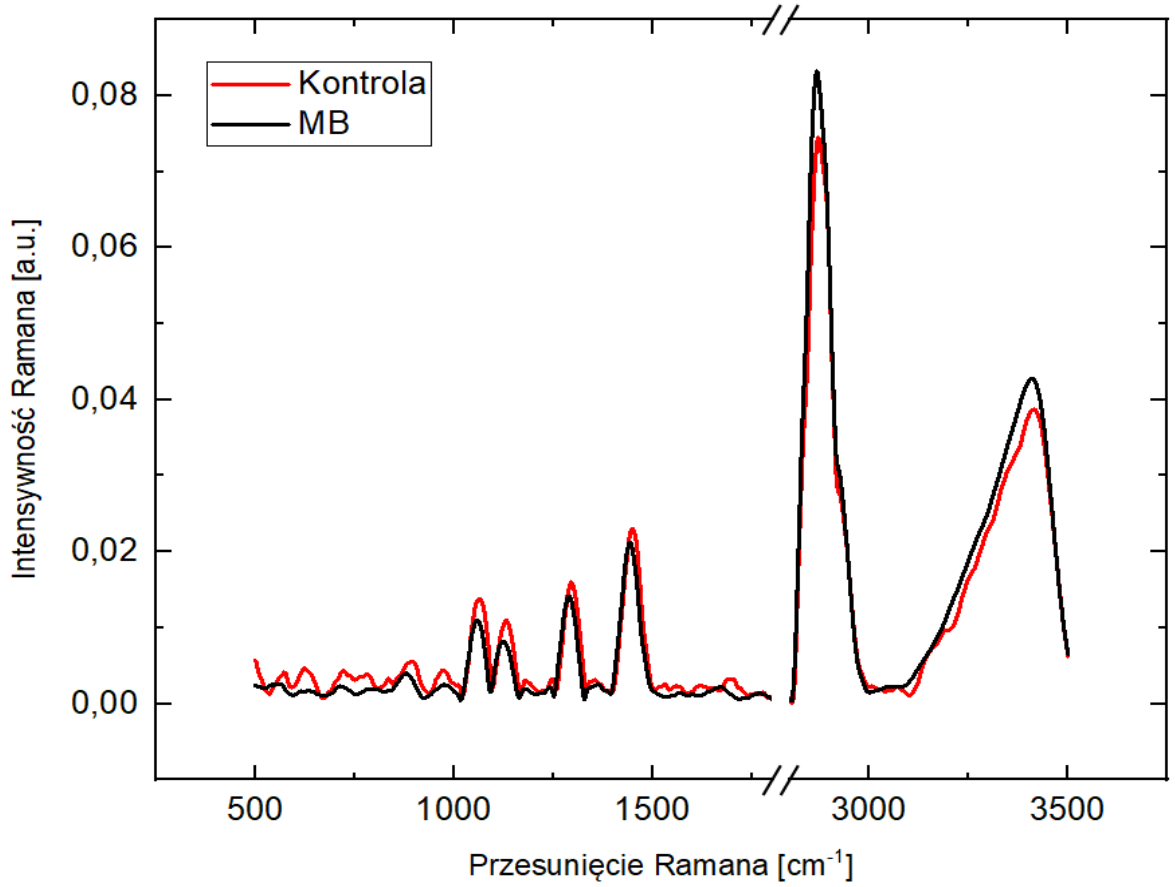
4.2 Analiza spektralna widm ramanowskich

4.2.1 Uzyskane widma, analiza pasm składowych.

Poniższą analizę wykonano na 35 próbkach tkanek rdzeniarka zarodkowego. Grupa badana techniką Ramana jest o 5 pacjentów mniejsza niż w przypadku próbek poddanych analizie FTIR, co wynika z ograniczonej ilości materiału biologicznego do uzyskania poprawnych widm. Jako grupę kontrolną użyto 4 próbek prawidłowej tkanki mózgowej które zostały pobrane z innych wskazań od pacjentów po wykluczeniu choroby nowotworowej. Od każdego pacjenta zmierzono średnio trzy indywidualne widma z których uzyskano jedno uśrednione widmo, na którym w poniższej pracy przeprowadzono analizy.

Uzyskane dane spektralne średniej Ramana ze wszystkich złośliwych tkanek nowotworowych mózgu (czarny) i średniej grupy kontrolnej (czerwony) przedstawiono na Wykresie 20. Zastosowano zakres pomiarowy 500-3500 cm^{-1} z wykluczonym obszarem wolnym od podczerwieni 1800-2800 cm^{-1}. Należy podkreślić, iż ze względu na parafinowy charakter próbek w pracy nie zagłębiano się w analizę zakresu, w którym w większości występują piki pochodzenia lipidowego (2800-3000 cm^{-1}), a jedynie zaznaczono ich obecność. Pomimo osobniczych/tkankowych różnic widocznych w widmach Ramana uzyskanych z próbek biologicznych można wyróżnić pewne charakterystyczne pasma, które przypisuje się odpowiednim drganiom molekularnym [51].

Na wykresie nr 20 oraz w Tabeli nr 15 odnotowano ich położenia charakterystyczne.



Wykres 20. Widma Ramana średniej złośliwej tkanki nowotworowej mózgu - rdzeniaka zarodkowego (czarny) i średniej grupy kontrolnej (czerwony). Zakres pomiarowy 500-3500 cm^{-1}.

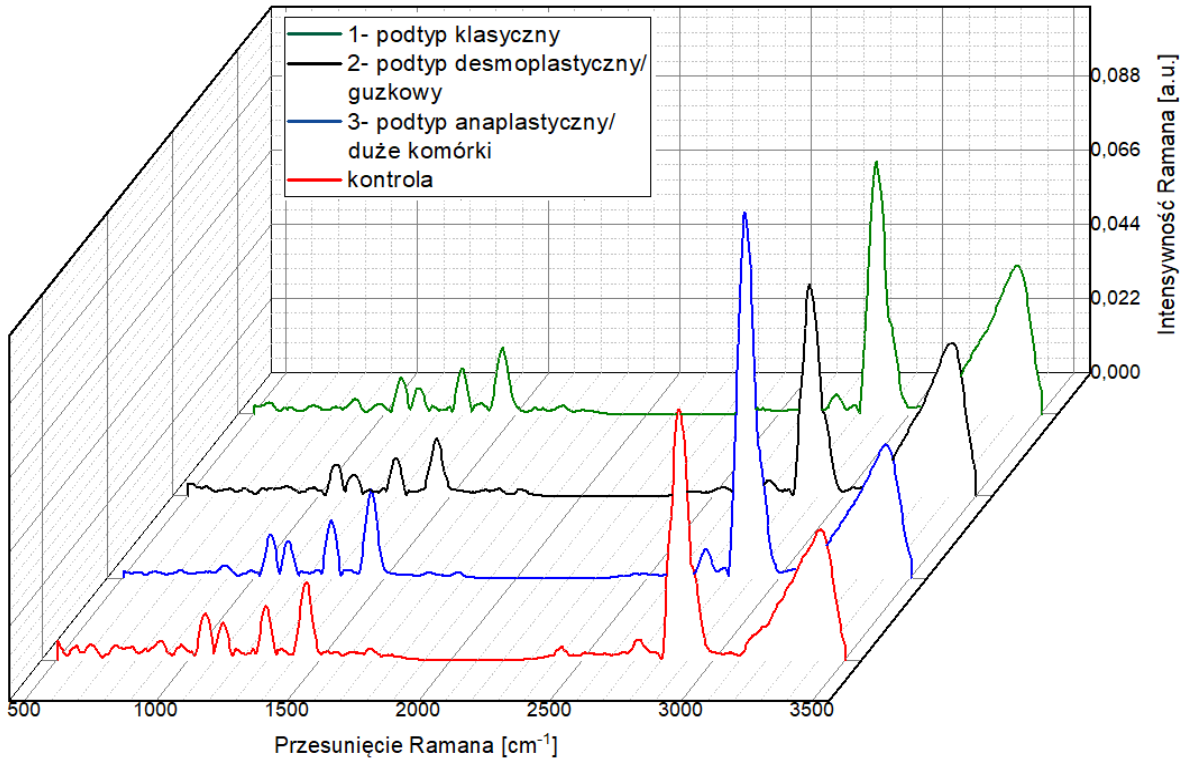
Tabela 15. Widma Ramana średniej grupy kontrolnej oraz średniej złośliwej tkanki nowotworowej mózgu - rdzeniaka. Zakres pomiarowy 800-3500 cm^{-1}.

Kontrola	Intensywność Ramana [a.u]	MB	Intensywność Ramana [a.u.]
624	0,005	621	0,002
721	0,004	723	0,002
782	0,004	790	0,002
835	0,003	brak	brak
896	0,006	886	0,004
973	0,004	982	0,003
1065	0,014	1064	0,011
1131	0,011	1129	0,008
1296	0,016	1294	0,014
1449	0,023	1447	0,021
1690	0,003	1678	0,002
2872	0,075	2870	0,083
3414	0,039	3411	0,043

Widma Ramana umożliwiają określenie poszczególnych składowych biochemicznych próbek biologicznych takich jak: kwasy nukleinowe, białka, lipidy, karotenoidy, węglowodany oraz kryształy nieorganiczne [70].

4.2.2 Przypisanie charakterystycznych pasm w poszczególnych podtypach histologicznych.

Tkanki rdzeniaka zarodkowego poddano analizie ze względu na podtyp histopatologiczny. Pierwsza grupa to podtyp klasyczny (20 pacjentów - kolor zielony), druga grupa to podtyp desmoplastycznych/guzkowy (4 pacjentów - kolor czarny), a trzecia grupa podtyp anaplastyczny/duże komórki (11 pacjentów - kolor niebieski).



Wykres 21. Średnie widma spektroskopii Ramana dla MB podtypu: 1- klasycznego (kolor zielony), 2 - desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), 3 - anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Zakres pomiarowy 500-3500 cm^{-1}.

Zestawienie pików dla kontroli oraz dla każdego podtypu histologicznego wraz z opisem pasm charakterystycznych przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Częstotliwości drgań pików i ich przypisania w różnych podtypach histologicznych w widmach ramanowskich [54,71-73].

Kontrola	Podtyp klasyczny	Podtyp desmoplastyczny/ guzkowy	Podtyp anaplastyczny/ duże komórki	Przypisanie biochemiczne głównych pasm
624	621	brak	620	białka, drgania C-C zginające poza płaszczyznę
brak	brak	661	brak	białka, kolagen typu I
721	734	715	brak	kwasy nukleinowe, drgania "oddychające" pieścienia A,
782	brak	787	792	DNA/RNA, kwasy nukleinowe, drgania "oddychające" pieścienia A, "oddychające" pieścienia U,T,C, drgania szkieletowe O-P-O
835	brak	brak	839	DNA
brak	813	brak		białka, kwasy nukleinowe, Pro, Hyp, Tyr, drgania rozciągające PO2-
brak	brak	874	brak	hydroksyprolina, drgania C-N rozciągające od choliny
896	886	brak	889	Tryptofan, drgania C-C rozciągające
973	976	980	992	drgania PO2− symetryczne rozciągające
1065	1063	1070	1064	lipidy, białka, drgania rozciągające dla C-C, C-N
1131	1127	1131	1131	lipidy, białka, glukoza
1296	1294	1292	1295	lipidy, kwasy tłuszczowe, amid III, drgania deformacyjne CH3/CH2
1449	1447	1448	1447	lipidy, białka, drgania zginające w płaszczyźnie CH2/CH3
brak	brak	brak	1667	białka, drgania rozciągające C=C, amid I (α-helisa)
1690	1680	1687	brak	lipidy, kwasy tłuszczowe, białka, drgania rozciągające C=C pierścienia steroidowego i trans, amidowe I (antyrównoległe β-kartka)
2872	2870	2870	2870	lipidy, kwasy tłuszczowe, drgania symetryczne rozciągające CH2

Uzyskane widma Ramana dla poszczególnych podtypów histologicznych oraz dla tkanki zdrowej jako kontroli przedstawiono na Wykresie 21. W Tabeli 16 ukazano widoczne przesunięcia pików/ szczytów licz falowych między próbkami kontrolnymi a widmami tkanki mózgowej z rdzeniakiem zarodkowym dla poszczególnych analizowanych w tym przypadku grup. Ze względu na fakt, iż badaniu zostały poddane próbki parafinowe, pośród pików z największą intensywnością znajduje się wiele pików przypisanych lipidom, należą do nich szczyty liczb falowych na poziomie: 1065 cm^{-1}, 1131 cm^{-1}, 1296 cm^{-1}, 1449 cm^{-1}, 1690 cm^{-1}, 2872 cm^{-1} [72, 74-76].

W próbkach kontrolnych nie zarejestrowano kilku pików pojawiających się w różnych podtypach histopatologicznych takich jak:

- 661 cm^{-1} odpowiadający za białka, kolagen typu I,
- 813 cm^{-1} przypisany do białek, kwasów nukleinowych, Pro, Hyp, Tyr, rozciągające PO_2-,

- 874 cm^{-1} przypisany do hydroksyproliny, C-N rozciągające drgania od choliny,
- 1667 cm^{-1} odpowiadający za białka, rozciągające drgania C=C, amid I (α -helisa).

Analizując znaczące przesunięcia powyżej 4 cm^{-1} (co wynika z zastosowanej podczas pomiaru rozdzielczości widmowej) dla wszystkich uzyskanych widm charakterystycznych zwrócono uwagę na pik na poziomie 896 cm^{-1} przypisany do tryptofanu który w przypadku kontroli przyjmuje wyższe wartości liczb falowych niż w przypadku poszczególnych podtypów histopatologicznych. Natomiast dla próbek podtypu desmoplastycznego pik ten nie występuje.

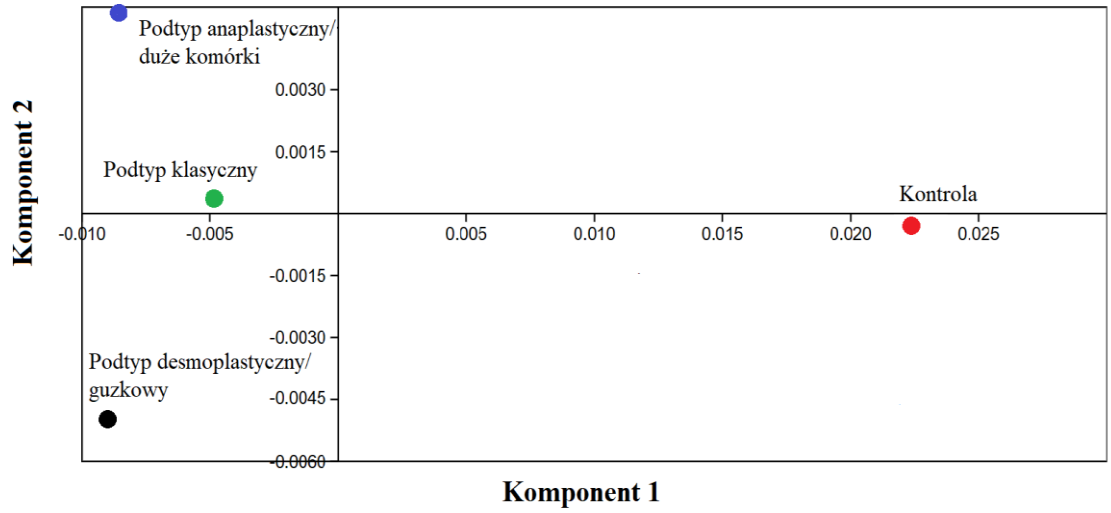
4.2.3 Chemometryczne metody analizy danych

Ze względu na fakt, iż badaniu poddano próbki rdzeniaka zarodkowego w postaci skrawków histopatologicznych zatopionych w parafinie, z późniejszej analizy wykluczono pasma odpowiadające drganiom grup funkcyjnych obecnych w lipidach. Najbardziej charakterystyczne dla nich pasma w widmie ramanowskim wynikają z obecności długich łańcuchów kwasów tłuszczowych w strukturze związków i obserwowane są w następujących zakresach: 1025-1160 cm^{-1}, 1250-1330 cm^{-1}, 1400-1500 cm^{-1}.

Natomiast w zakresie wyższych liczb falowych tj. 2800-3000 cm^{-1} zawarte są informacje dotyczące białek oraz lipidów. Jest to trudny zakres do poprawnej interpretacji - nawet w przypadku poddania widm normalizacji oraz korekcji linii bazowej tkanki zatopione w parafinie nie powinny być poddawane analizie ilościowej. Dzieje się tak ze względu na fakt, iż poszczególne próbki mogły pochłonąć więcej lub mniej parafiny, a wyciągnięte wnioski mogą być błędne.

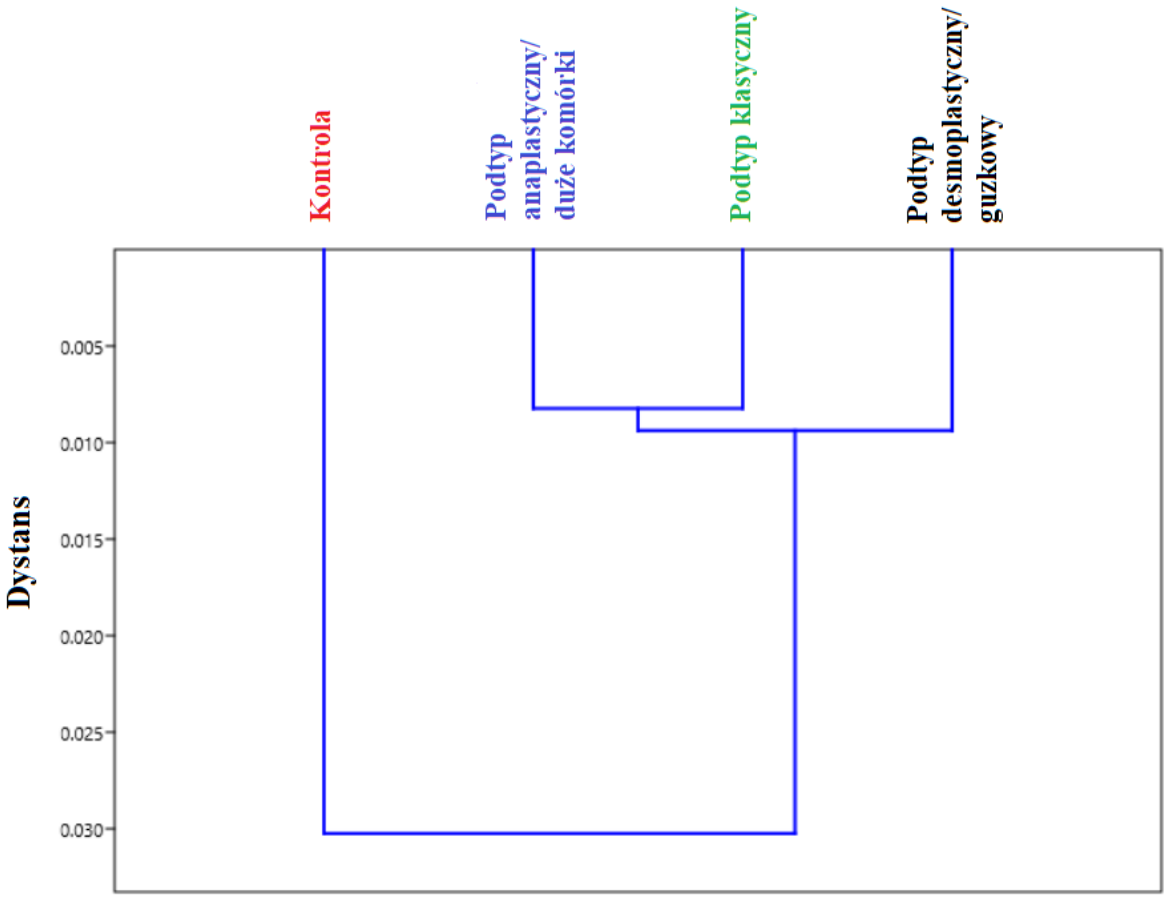
Uwzględniając powyższe fakty, w analizie PCA oraz HCA uzyskanych widm ramanowskich w zakresie 500-1800 cm^{-1} (tzw. daktyloskopowy/"*fingerprint region*") wycięto pasma odpowiadające lipidom/ sekcji parafin tj: 1065 cm^{-1}, 1131 cm^{-1}, 1296 cm^{-1} oraz 1449 cm^{-1} (wartości podane dla tkanek kontrolnych).

Otrzymane średnie widma ramanowskie dla każdego podtypu histologicznego MB oraz zdrowych pacjentów kontrolnych zbadano za pomocą analizy głównych składowych (PCA) i hierarchicznej analizy skupień (HCA) (Wykres 22 i 23). Drugą pochodną widm analizowano w zakresie „*fingerprint region*", z wyłączeniem regionów zawierających parafinę (w celu uniknięcia zafałszowania danych).



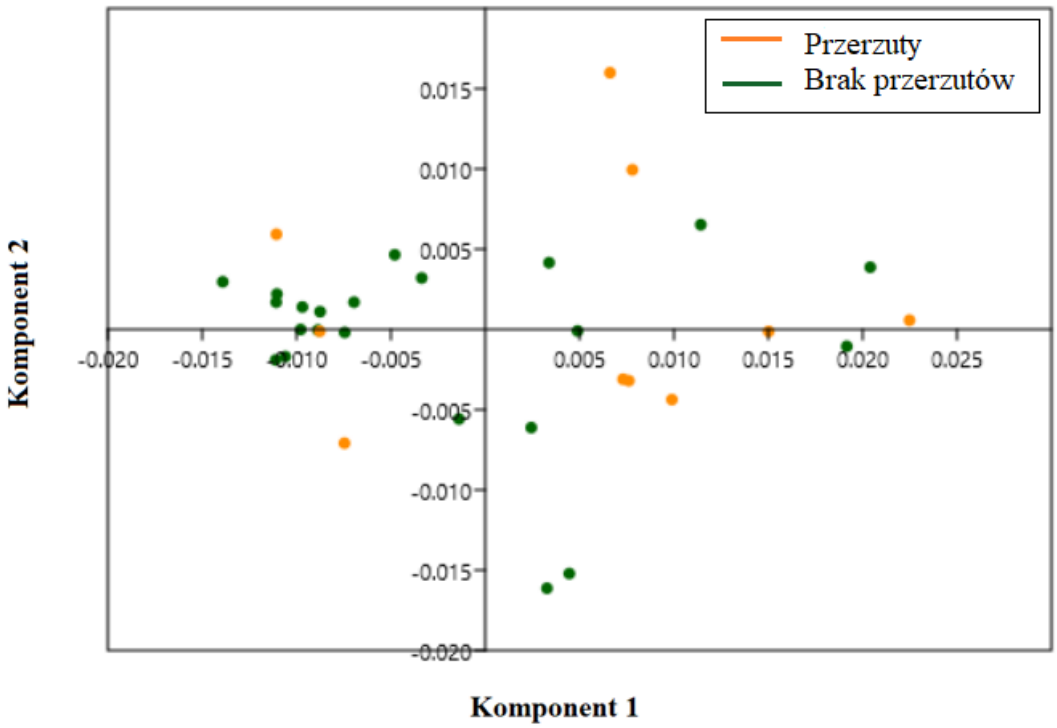
Wykres 22. Analiza PCA widm ramanowskich dla MB podtypu: klasycznego (kolor zielony), desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Wykres dla średnich próbek z ujętymi różnicami w składzie biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*" 500-1800 cm^{-1} z wyciętymi regionami charakterystycznymi dla lipidów.

Analizę głównych składowych (PCA) przedstawiono na Wykres nr 22. Komponent 1 dzieli analizowane tkanki na dwa klastry. Pierwszy z nich jest przesunięty w kierunku ujemnych wartości dla PC1 i zawiera wszystkie podtypy histologiczne MB badanych próbek, co wskazuje na ich podobieństwo do siebie pod względem składu chemicznego. Natomiast próbka kontrolna jest przesunięta w przestrzeni wykresu w kierunku dodatnich wartości dla PC1, co wskazuje na istnienie w niej innych pod względem jakościowym i/lub ilościowym ugrupowań biochemicznych, które różnicują ją od tkanek nowotworowych. Dodatkowa analiza względem komponentu 2 ukazuje szczególnie silne podobieństwo pomiędzy podtypem klasycznym (kolor zielony) a próbkami podtypu anaplastycznego (niebieski), co sugeruje ułożenie próbek względem siebie.



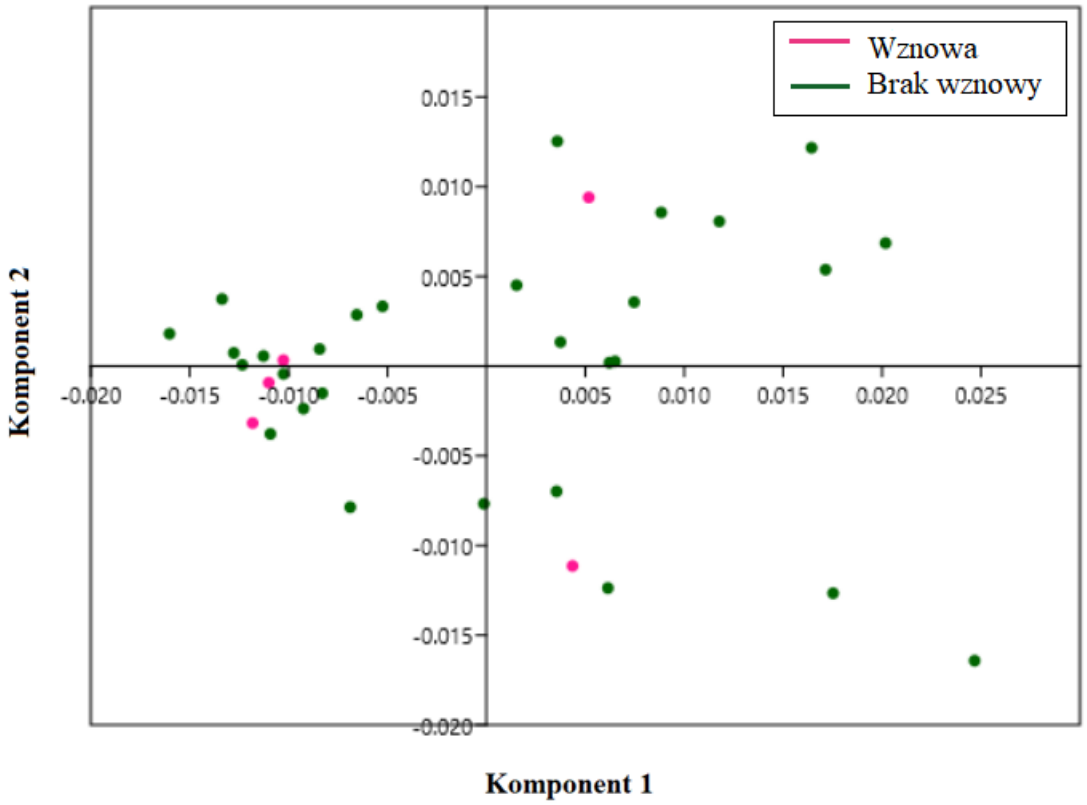
Wykres 23. Analiza HCA widm ramanowskich dla MB podtypu: klasycznego (kolor zielony), desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Wykres dla średnich próbek z ujętymi różnicami w składzie biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*" 500-1800 cm^{-1} z wyciętymi regionami charakterystycznymi dla lipidów.

Wnioski uzyskane w wyniku analizy PCA potwierdza hierarchiczna analiza skupień (Wykres 23). Dendrogram hierarchicznej analizy skupień (HCA) utworzył dwa początkowe klastry. Próbki kontrolne zostały sklasyfikowane jako klaster pierwszy, natomiast drugi klaster zawiera próbki MB. Podobnie jak w analizie PCA tutaj również widać silne podobieństwa między próbkami podtypu klasycznego (zielony) i anaplastycznego (niebieski). Uzyskane wyniki analizy PCA i HCA pokazują, że w analizowanych próbkach możliwe jest odróżnienie zdrowej tkanki mózgu od tkanki rdzeniaka zarodkowego za pomocą spektroskopii ramanowskiej.



Wykres 24. Analiza PCA widm spektroskopii ramanowskiej grupy pacjentów bez przerzutów (kolor zielony) oraz pacjentów z przerzutami (kolor pomarańczowy). Dwuwymiarowy (2D) wykres wyników dla próbek z różnicami w składnikach biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*" z wyciętym rejonem lipidowym. Analizie poddano próbki od każdego indywidualnego pacjenta.

W celu zbadania możliwości rozróżnienia widm pacjentów, u których zdiagnozowano przerzuty (10 próbek) oraz pacjentów bez obecności przerzutów (21 próbek), przeprowadzono analizę PCA. Do analizy wykorzystano zakres widma 500-1800 cm^{-1} (*„fingerprint region"*). Wyniki analizy przedstawiono na Wykresie 24. Dla badanych próbek dwie pierwsze główne składowe opisują 46% całkowitej wariancji zestawu pierwotnych danych, przy czym PC1 uwzględnia 34% całkowitej wariancji a PC2 12%. Niestety żadna z głównych składowych PC nie różnicuje danych na dwa wyraźne klastry. Na podstawie analizy PCA dla analizowanego zakresu spektralnego nie było możliwe rozróżnienie próbek pobranych od pacjentów z przerzutami od próbek pacjentów bez przerzutów.

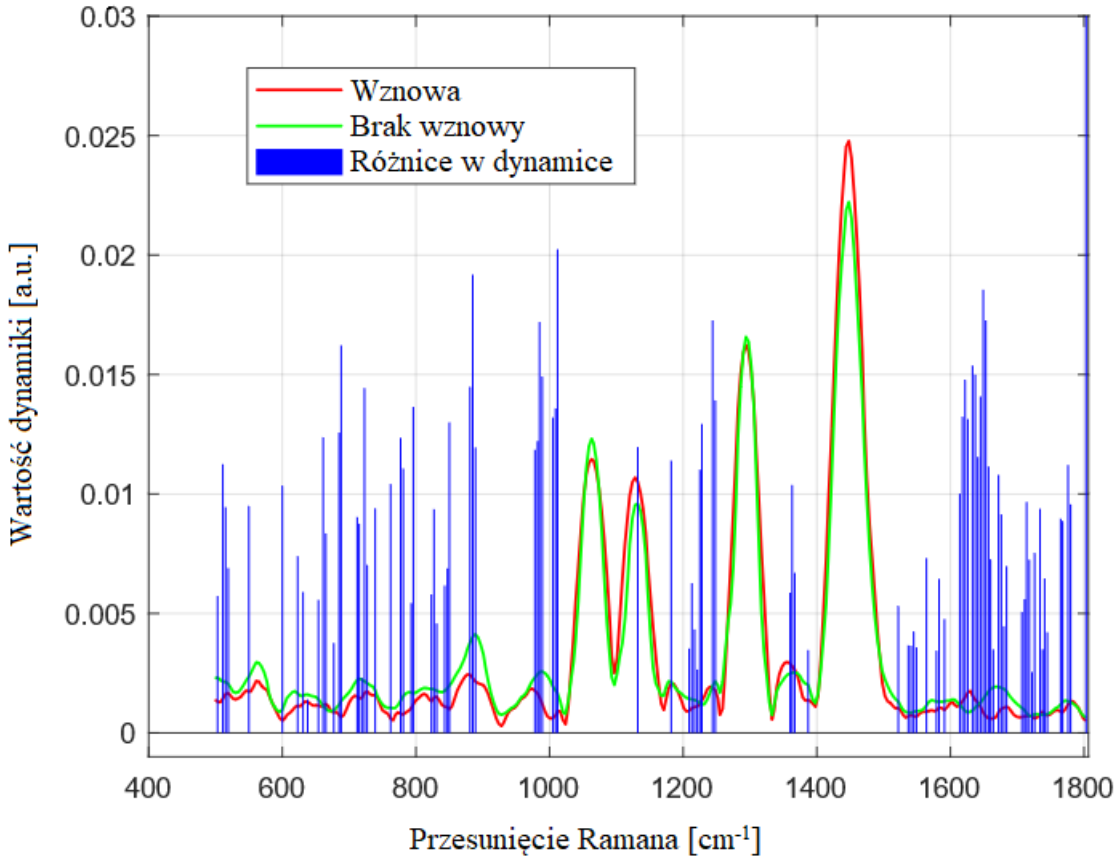


Wykres 25. Analiza PCA widm spektroskopii ramanowskiej grupy pacjentów u których zdiagnozowano wznowę (kolor różowy) oraz pacjentów bez wznowy (kolor zielony). Dwuwymiarowy (2D) wykres wyników dla poszczególnych próbek obrazujący różnice w składzie biochemicznym w analizowanym zakresie widma (bez lipidów).

Kolejna analiza PCA miała na celu rozróżnienie widm spektroskopii Ramana pacjentów, u których wystąpił nawrót choroby (5 pacjentów, na wykresie kolor różowy) od pacjentów, u których wznowa nie wystąpiła (29 pacjentów, na wykresie kolor zielony). Do analizy wykorzystano taki sam zakres widma jak poprzednio. Uzyskane wyniki przedstawiono na Wykresie 25. Dla badanych próbek dwie pierwsze główne składowe opisują 46% całkowitej wariancji zestawu pierwotnych danych, przy czym PC1 uwzględnia 33% całkowitej wariancji a PC2 13%. Analiza PCA w wybranym zakresie spektralnym nie ujawniła istotnych różnic, na podstawie których można by rozróżnić pacjentów z lub bez wznowy choroby.

4.2.4 Analiza dynamiki widm Ramana

Analiza dynamiki zmian Ramana [68], podobnie jak przypadku widm spektroskopii w podczerwieni FTIR, jest bardzo przydatnym narzędziem do poszukiwania obszarów liczb falowych, które wskazują na różną dynamikę intensywności rozproszenia Ramana w dwóch rodzajach analizowanych widm, np.: między osobami zdrowymi a pacjentami z wybraną jednostką chorobową.



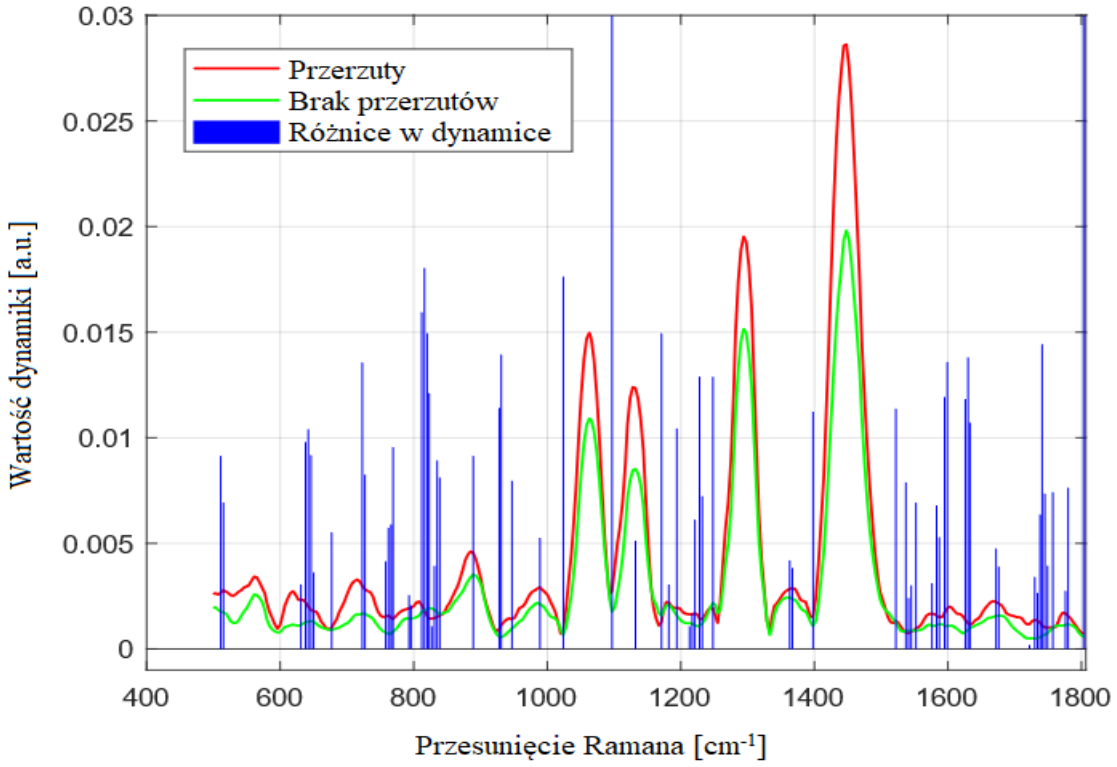
Wykres 26. Graficzna prezentacja różnic w dynamice intensywności widm Ramana pomiędzy pacjentami bez wznowy i z wznową w zakresie 500-1800 cm^{-1} liczb falowych. Czerwona linia przedstawia średnie widmo dla pacjentów ze wznową, zielona średnia dla pacjentów bez wznowy, a niebieskie słupki reprezentują znormalizowaną różnicę w dynamice między tymi dwiema grupami.

Analiza danych widmowych wraz z jej graficznym przedstawieniem na Wykresie 26 pokazała zakresy przesunięć Ramana, dla których różnice w dynamice intensywności Ramana pomiędzy próbkami od pacjentów z nawrotem w stosunku do próbek bez nawrotu są znaczące. Zakresy te zostały przedstawione w Tabeli 17.

Tabela 17. Obszary przesunięć Ramana, które mogą być wykorzystane jako potencjalne markery do rozróżniania pacjentów z nawrotem i bez nawrotu na podstawie widm Ramana.

Przesunięcie Ramana [cm^{-1}]
511 - 519
718 - 727
823 - 831
843 - 850
881 - 889
978 - 989
1005 - 1012
1209 - 1228
1360 - 1367
1614 - 1684

Podobnie możemy znaleźć różnice w dynamice intensywności promienia rozproszonego widm Ramana dla grupy pacjentów z przerzutami w zestawieniu z pacjentami bez przerzutów nowotworowych. Wyniki przedstawiono na Wykresie 27.



Wykres 27. Graficzna prezentacja różnic w dynamice intensywności widm Ramana pomiędzy pacjentami z przerzutami oraz bez przerzutów w zakresie 500-1800 cm^{-1} liczby falowej. Czerwona linia przedstawia średnie spektrum dla pacjentów z przerzutami, zielona ilustruje średnie widmo dla pacjentów bez przerzutów, a niebieskie słupki reprezentują znormalizowaną różnicę w dynamice między tymi dwiema grupami.

Analiza danych widmowych wraz z jej graficznym przedstawieniem na Wykresie 27 potwierdza fakt, iż istnieją zakresy przesunięć Ramana, dla których różnice w dynamice są znaczące. Również w tym przypadku możemy wyznaczyć zakresy przesunięć Ramana, które mogą służyć jako potencjalne markery do odróżnienia pacjentów bez przerzutów od tych z przerzutami. Zakresy te przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Obszary przesunięć Ramana, które mogą być wykorzystane jako potencjalne markery do rozróżniania pacjentów z przerzutami od pacjentów bez przerzutów na podstawie widm Ramana.

Przesunięcie Ramana [cm^{-1}]
638 - 650
758 - 769
812 - 839
1626 - 1633
1730 - 1749

Rozdział 5.

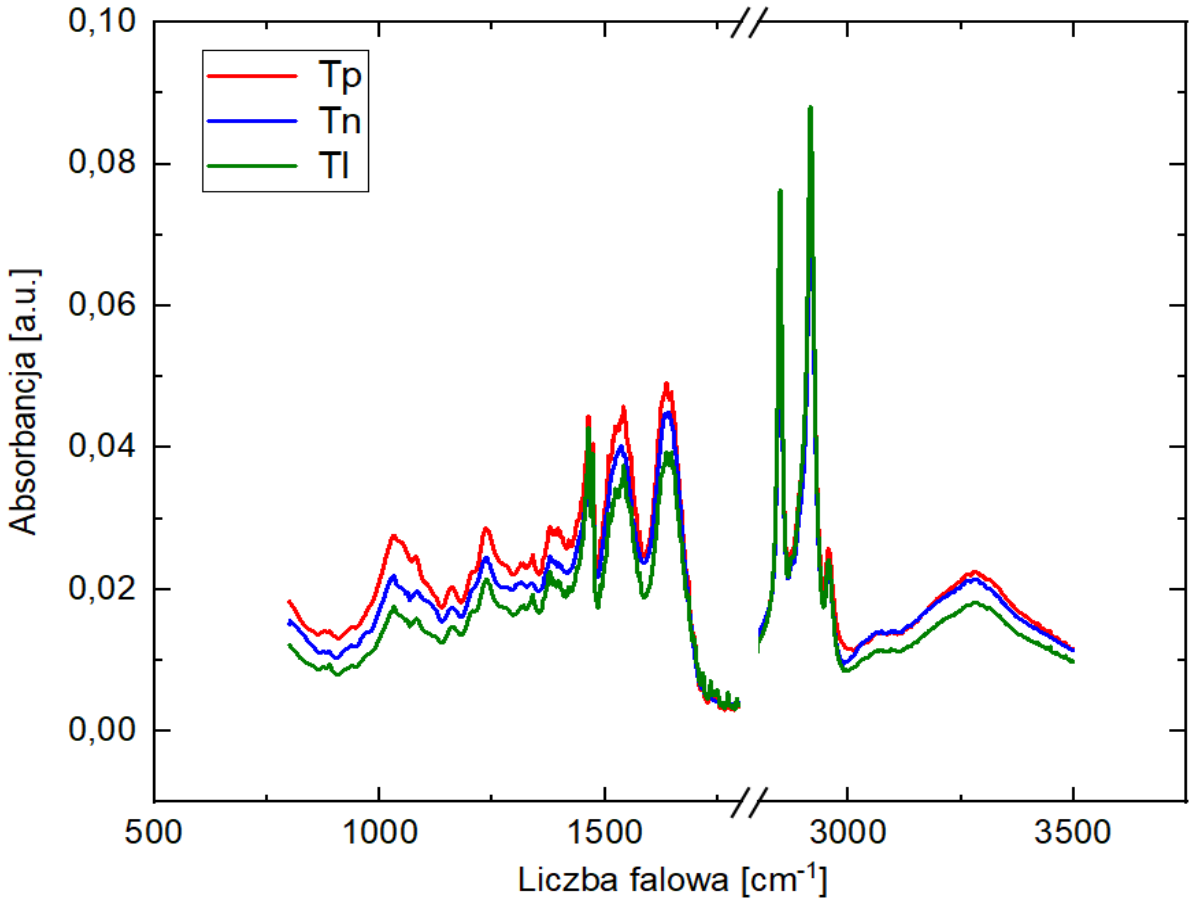
Wyniki – Mięsak Ewinga

5.1 Analiza spektralna widm FTIR

5.1.1. Przypisanie charakterystycznych pasm dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, tkanki nowotworowej przed leczeniem oraz tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej.

Wykonana w pracy analiza spektralna obejmowała przypisanie oraz charakteryzację poszczególnych pików w widmach otrzymanych od 27 pacjentów z uwzględnieniem 3 pobrań tj.: prawidłowej tkanki kostnej pobranej poza obszarem naciekania nowotworu, tkanki nowotworowej przed chemioterapią indukcyjną oraz po jej zakończeniu. W przypadku 7 pacjentów nie udało się wykonać pomiarów na prawidłowej tkance kostnej co było związane z brakiem odpowiedniej ilości materiału do analizy.

Na Wykresie 28 przedstawiono uzyskane dane dla średnich widm FTIR: Tp - prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (kolor czerwony), Tn - tkanki nowotworowej przed leczeniem (kolor niebieski), Tl - tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (kolor zielony).



Wykres 28. Średnie widma spektroskopii FTIR dla: Tp- prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (kolor czerwony), Tn- tkanki nowotworowej przed leczeniem (kolor niebieski), Tl- tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (kolor zielony). Zakres pomiaru 800-3500 cm^{-1}.

Porównanie poszczególnych widm wykazało znaczne zmiany absorbancji w całym badanym zakresie tj. 800-3500 cm^{-1}. Zestawienie pików dla poszczególnych grup wraz z opisem pasm charakterystycznych przedstawiono w Tabeli 19.

Tabela 19. Częstotliwości drgań pików wraz z ich przypisami dla: Tp - prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, Tn - tkanki nowotworowej przed leczeniem, Tl - tkanki nowotworowej po leczeniu.

Tp [cm^{-1}]	**Tn [cm^{-1}]**	**Tl [cm^{-1}]**	**Przypisanie biochemiczne głównych pasm**
1031	1032	1032	asymetryczne zginania P-O w jonie fosforanowym $\upsilon_3(PO_4^{3-})$, O-CH3 drgania rozciągające grup metoksylowych, grupy: kolagenowe, glikogenowe i fosfodiestrowe, kwasy nukleinowe
1236	1236	1236	drgania asymetryczne PO2- (fosforan I)
1316	**1314**	1317	amid III, kolagen
1396	**1399**	1399	symetryczne drgania CH3 grup metylowych w białkach
1462	1462	1462	drgania nożycowe grupy CH2
1541	**1534**	1541	amid II, drgania zginające N-H oraz drgania rozciągające C-N w białkach
1636	**1640**	1636	amid I, drgania rozciągające C = O od α-helisy w białkach
2848	2848	2848	symetryczne drgania rozciągające CH2 przeważnie w lipidach
2916	2916	2916	symetryczne i asymetryczne drgania rozciągające CH2 przeważnie w lipidach
2956	2956	2956	asymetryczne drgania rozciągające CH3 przeważnie w lipidach
3280	3281	3280	drgania NH rozciągające wiązań peptydowych (-NHCO-) w białkach oraz drgania rozciągające grup funkcyjnych wody OH

W powyższych widmach FTIR również odnotowano trzy zasadnicze grupy odpowiadające podstawowym ugrupowaniom biochemicznym komórek tj.: pasma kwasów nukleinowych, białek oraz lipidów.

W przypadku próbek ES pomiary wykonywano na próbkach odparafinowanych, dlatego też zakres widmowy 2800-3000 cm^{-1} przypisywany w głównej mierze lipidom, po odpowiednim przygotowaniu danych (korekcja linii bazowej, normalizacja) można poddać analizie ilościowej.

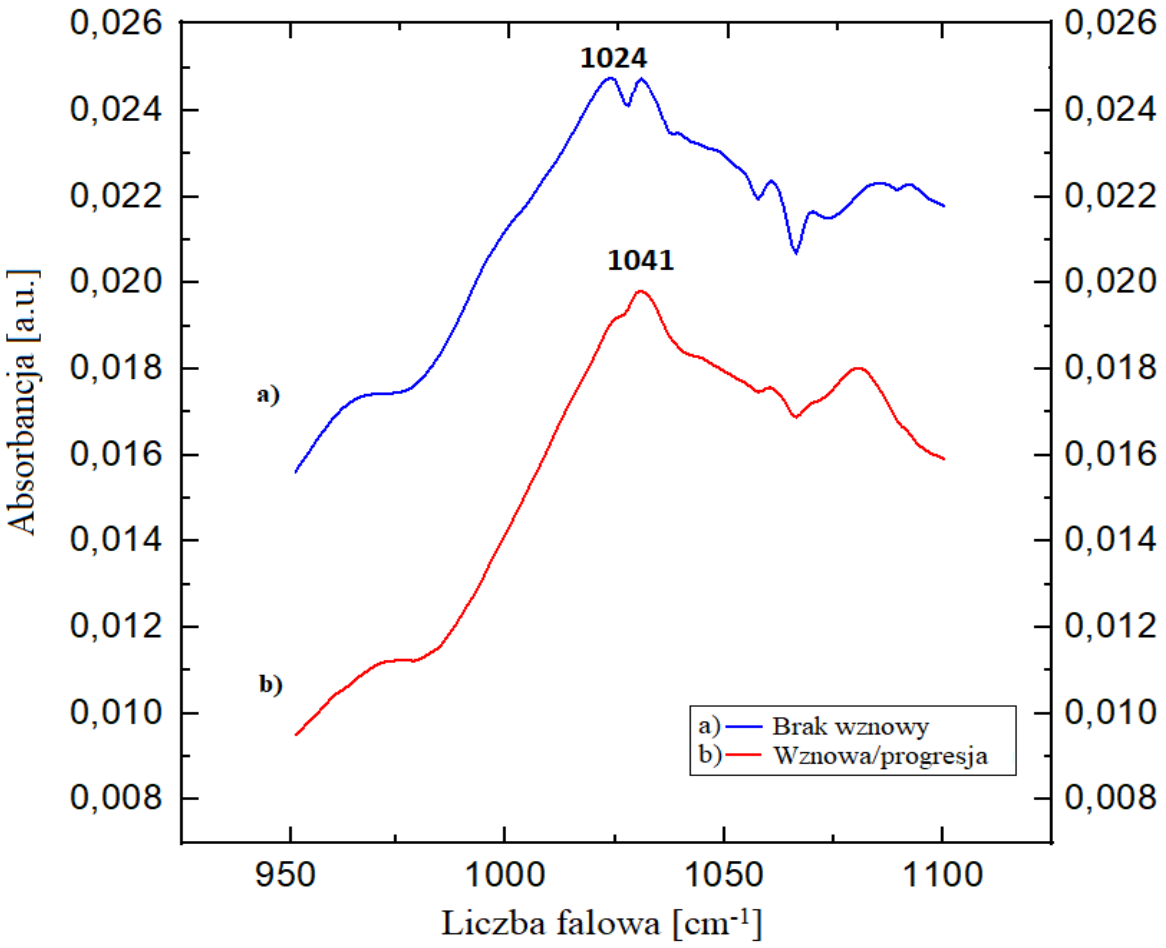
Charakterystyczny szczyt liczby falowej 1031 cm^{-1} odpowiada między innymi za: asymetryczne zginania P-O w grupie fosforanowej $\upsilon_3(PO_4^{3-})$ [77,78], drgania rozciągające $O\text{-}CH_3$ grup metoksylowych, grupy: kolagenowe [79-81], glikogenowe i fosfodiestrowe [82,83], kwasy nukleinowe [84]. W powyższym obszarze widma występuje wiele składowych dla różnych grup chemicznych dlatego też interpretacja w tym przypadku nie jest jednoznaczna.

Piki absorpcji tkanki kości na poziomie 1236 cm^{-1}, przypisuje się je drganiom asymetrycznym PO_2- (fosforan I). Widoczne jest charakterystyczne pasmo absorpcji należące do amidu III na poziomie 1316 cm^{-1} na które składają się intensywne drgania rozciągające C-C, C-N oraz drgania zginające N-H [85]. Szczyty w regionie 1396 cm^{-1} oraz 1462 cm^{-1} wynikają prawdopodobnie z symetrycznych drgań CH3 grup metylowych w białkach oraz z drgań nożycowych grupy CH_2 [77]. Szczyt liczby falowej tkanki kości na poziomie 1541 cm^{-1}

przypisuje się Amidowi II, który odpowiada za drgania zginające N-H oraz drgania rozciągające C-N w białkach [86]. Amid I, który jest jednym z głównych składników białkowych ma absorpcję w obszarze 1636 cm^{-1} wynikającą z rozciągających drgań od C = O [87]. Jest on bardzo czuły i może być wykorzystywany do badania struktury drugorzędowej białek [88]. Natomiast region od 1800 do 2800 cm^{-1} w komórkach biologicznych jest wolny od absorpcji podczerwieni [89]. Widma FTIR lipidów (na przykład fosfolipidów) odnotowano w naszym przypadku w regionie 2848-2956 cm^{-1}. Składają się na nie symetryczne i asymetryczne drgania rozciągające CH_2 (2848 i 2916cm^{-1}) oraz asymetryczne drgania rozciągające CH_3 (2956 cm^{-1}) [90]. Ostatnie pasmo o piku szczytowym na poziomie 3280 cm^{-1} jest przypisane dla υNH rozciągających wiązań peptydowych (-NHCO-) w białkach oraz drgań rozciągających grup funkcyjnych wody υOH [91].

Analiza maksimum absorpcji ujawniła istotne zmiany czterech pasm dla poszczególnych analizowanych tkanek. W przypadku prawidłowej tkanki pik amidu III wynosił 1316 cm^{-1}, natomiast w tkance nowotworowej nastąpiło przesunięcie maksimum pasm do niższych liczb falowych o 2 [cm^{-1}] czyli do 1314 [cm^{-1}], istotny jest również wzrost w przypadku tkanki po leczeniu (1317 cm^{-1}). Przesunięcie do wyższych liczb falowych nastąpiło w przypadku piku 1396 cm^{-1} gdzie odnotowano wzrost do poziomu 1399 cm^{-1} dla tkanki nowotworowej przed leczeniem jak i po leczeniu w stosunku do zdrowej kontroli. Dane przedstawione w Tabeli 19 wskazują, że w tkance nowotworowej odnotowano przesunięcie do niższych liczb falowych dla szczytu pasma amidu II w stosunku do prawidłowej tkanki oraz do wyższych lb falowych piku charakterystycznego dla amidu I. Z kolei po leczeniu piki te wróciły do wartości charakterystycznych dla tkanek zdrowych/kontrolnych. Wszystkie opisane powyżej przesunięcia maksimum liczb falowych dotyczą struktur białkowych, co mogło być wynikiem zmiany konformacji białka.

Analiza zakresu widmowego 950-1100 cm^{-1} dla poszczególnych pacjentów oraz tkanek (w którym uzyskano średni pik na poziomie 1031cm^{-1}) wraz z parametrami medycznymi i przebiegiem choroby nowotworowej ujawniła korelacje. Dlatego też z perspektywy naszych badań jest to najciekawszy pik i zostanie szczegółowo przeanalizowany w dalszej części.

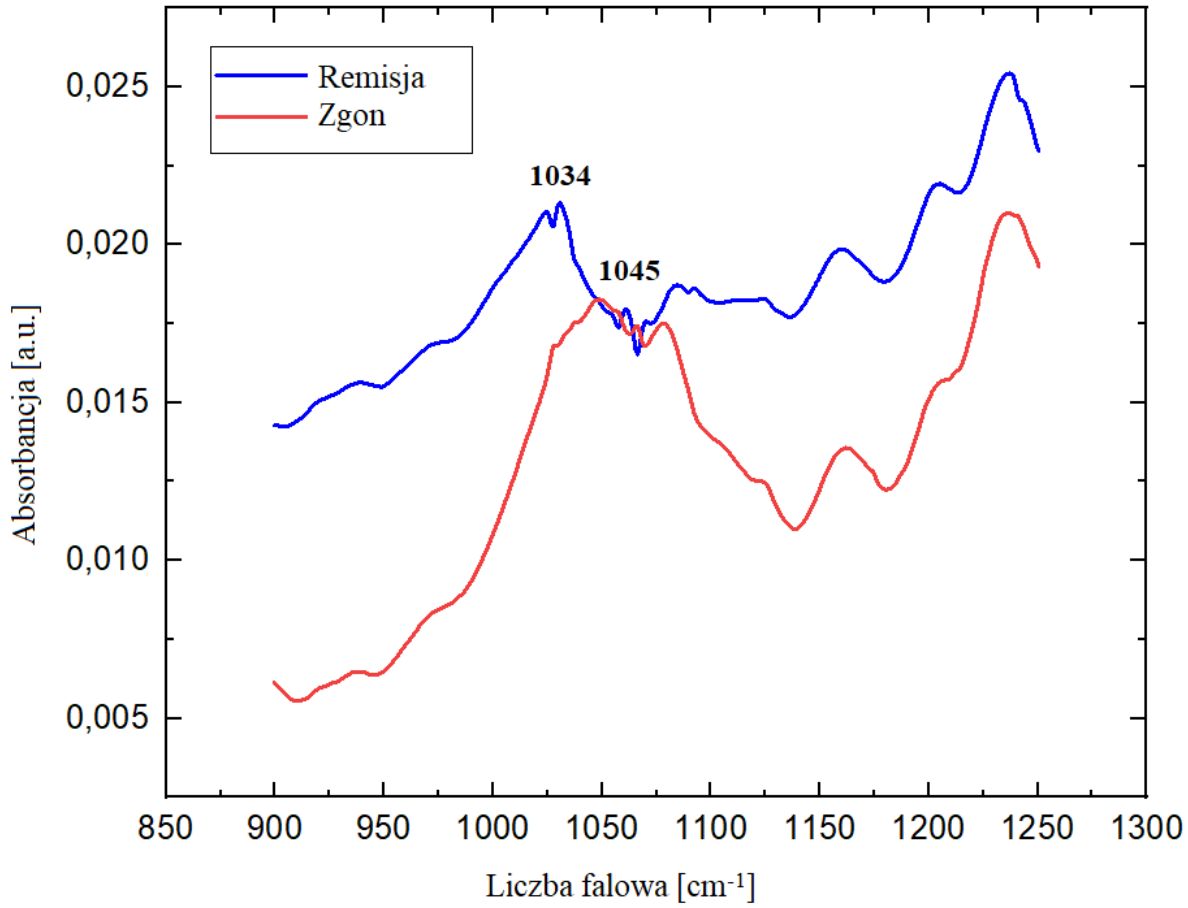


Wykres 29. Średnie widma FT-IR biopsji (Tn) mięsaka Ewinga dla piku w zakresie widmowym od 950-1100 cm^{-1}: pacjentów bez wznowy (kolor niebieski) oraz pacjentów ze wznową/progresją (kolor czerwony).

Wykres 29 przedstawia średnie widma FTIR widm z biopsji dla piku w zakresie widmowym od 950-1100 cm^{-1} dla pacjentów bez wznowy (kolor niebieski) oraz pacjentów ze wznową/progresją (kolor czerwony). W przypadku tkanki nowotworowej (Tn) dla pacjentów u których odnotowano wznowę lub progresję położenie maksimum piku plasowało się na poziomie 1041 cm^{-1}. Jest to istotna różnica w stosunku do chorych pozostających w remisji u których ten szczyt absorbancji oscylował średnio na poziomie 1024 cm^{-1}. W Tabeli 20 przedstawiono dane dla wszystkich pacjentów w analizowanym zakresie.

Tabela 20. Częstotliwości drgań dla piku w zakresie widmowym od 1000-1100 cm^{-1}: Tp - prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, Tn - tkanki nowotworowej przed leczeniem, Tl - tkanki nowotworowej po leczeniu/chemioterapii indukcyjnej. ↑ - odnotowany wzrost do wyższych liczb falowych, ↓ - odnotowany spadek do niższych liczb falowych.

Lp.	**Płeć**	**Zgon 0 – nie 1 - tak**	**Tkanka prawidłowa= Tp [cm^{-1}]**	**Tkanka nowotworowa = Tn [cm^{-1}]**	**Δ_1=Tp-Tn [cm^{-1}]**	**Tkanka po leczeniu = Tl [cm^{-1}]**	**$\lvert\Delta_2\rvert$=Tn-Tl [cm^{-1}]**	**% martwicy**
1	F	0	1029	1020	9↓	1053	33↑	100
2	F	0	1041	1027	14↓	1031	**4↑ wznowa**	100
3	F	0	1029	1026	3↓	1031	5↑	95,6
4	F	0	1044	1025	19↓	1027	2↑	100
5	F	0	1029	1022	7↓	1031	9↑	95,5
6	F	0	1045	1031	14↓	1033	2↑	100
7	F	0	1080	1061	19↓	1082	22↑	99
8	F	0	bd	1025		1030	5↑	95
9	F	0	bd	1019		1029	10↑	100
10	M	0	bd	989		1018	29↑	78
11	M	0	bd	1024		1031	6↑	100
12	F	0	bd	1024		1030	6↑	100
13	F	1	1047	1033	14↓	1047	**14↑progresja**	95
14	M	0	1032	1025	7↓	1031	**6↑progresja**	100
15	F	0	1058	1052	6↓	1058	**6↑ wznowa**	99
16	F	1	1031	1030	1↓	1034	**4↑ wznowa**	80
17	M	1	1048	1030	18↓	1050	**20↑ wznowa**	94,4
18	M	0	1050	1024	26↓	1020	4↓	30
19	M	0	bd	1030		1024	6↓	61,8
20	M	1	bd	1031		1024	7↓ **progresja**	66
21	M	1	1031	1031	0	1031	0 **progresja**	60,6
22	M	1	1079	1081	2↑	1077	1↑ **wznowa**	0
23	F	0	1014	1032	18↑	1031	1↓ **wznowa**	100
24	M	1	1080	1079	1↓	1080	1↑ **wznowa**	100
25	F	0	1027	1026	1↓	1023	3↓ **wznowa**	100
26	M	1	1030	1046	16↑	1032	14↓ **wznowa**	99,8
27	M	1	1029	1056	27↑	1032	24↓ **wznowa**	bd



Wykres 30. Średnie widma FT-IR tkanek po zastosowanym leczeniu (Tl) mięsaka Ewinga dla piku w zakresie widmowym od 950-1250 cm^{-1}: dla pacjentów pozostających w remisji (kolor niebieski) oraz pacjentów u których wystąpił zgon (kolor czerwony).

Średnie widma FTIR widm tkanek po zastosowanym leczeniu dla piku w zakresie widmowym od 900-1250 cm^{-1} dla pacjentów w remisji (kolor niebieski) oraz pacjentów u których wystąpił zgon (kolor czerwony) przedstawiono na Wykresie 30. W przypadku tkanki po leczeniu Tl dla pacjentów u których odnotowano remisję położenie maksimum piku znajdowało plasowało się na poziomie 1034 cm^{-1}. Jest to istotna różnica w stosunku do chorych, u których odnotowano zgon gdzie szczyt absorbancji oscylował średnio ok. 1045 cm^{-1}.
Uzyskano dużą różnicę w położeniu maksimum analizowanego pasma, np. u 80% chorych (n=15), u których Tn było większe lub równe 1027 cm^{-1} wystąpiła progresja lub wznowa nowotworu.

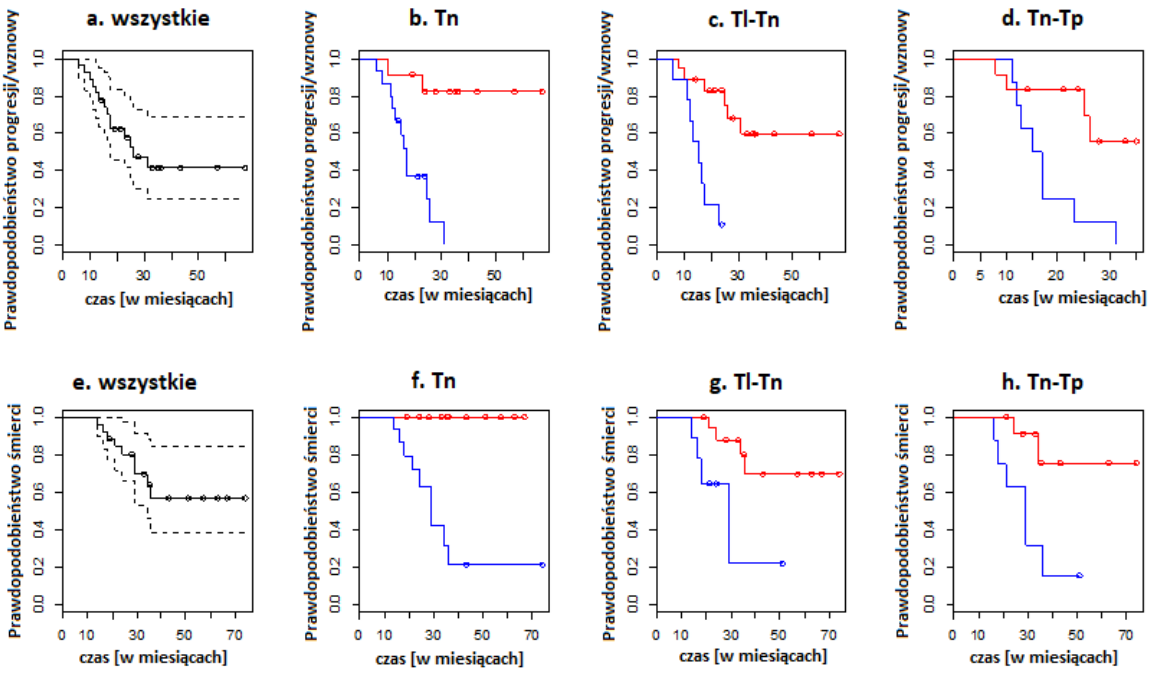
Wykonano porównanie przesunięcia maksimum pików w tkance w tkance prawidłowej oraz w tkance nowotworowej przed chemioterapią:
Δ_1 = **Tp** (tkanka prawidłowa) – **Tn** (tkanka nowotworowa)

W 12 badanych przypadkach w tkance nowotworowej odnotowano przesunięcie do niższych liczb falowych w stosunku do prawidłowej tkanki, u tych pacjentów wystąpiło 5 wznów/progresji tj.: 42%. Natomiast w 8 przypadkach wystąpił: wzrost do wyższych liczb falowych, małe przesunięcie do niższych liczb falowych (na poziomie -1cm^{-1}) lub pozostawanie na stabilnym poziomie. U wszystkich tych pacjentów (**100%** przypadków) odnotowano wznowę lub progresję choroby.

Analizowano również przesunięcia maksimum pików w tkance w tkance nowotworowej oraz w tkance nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej:

Δ_2 = **Tn** (tkanka nowotworowa) - **Tl** (tkanka po leczeniu)

Analiza widm FTIR tkanek kości z ES po chemioterapii w stosunku do tkanek nowotworowych przed leczeniem wykazała przesunięcie piku w analizowanym zakresie do wyższych liczb falowych u 17 pacjentów, w 6 przypadkach odnotowano wznowę lub progresję (35%). Natomiast u 6 pacjentów odnotowano obniżenie badanego szczytu liczby falowej do niższych wartości dodatkowo w 4 przypadkach wykazano brak istotnych zmian. Na 10 pacjentów ze spadkiem lub brakiem istotnego przesunięcia u 8 (80%) odnotowano wznowę lub progresję. Spadek lub pozostawanie na stabilnym miejscu generuje 80% wznów nawet przy wysokim procencie martwicy. Podsumowując jeżeli nie rośnie Δ_2 to pomimo dobrej odpowiedzi w postaci wysokiego odsetka martwicy pacjenci mają wznowę (8/10 tj. 100%). Można określić Δ_2 jako potencjalny istotny czynnik ryzyka wznowy lub progresji w ES. mięsaku Ewinga.



Wykres 31. Krzywe Kaplana-Meiera porównujące czas przeżycia wolny od progresji choroby (PFS) (**a–d**) i całkowite przeżycie (OS) (**e–h**) u pacjentów zgodnie z położeniem maksimum piku absorbancji w zakresie 950 - 1100 cm^{-1} liczby falowej: dla próbek guza mięsaka Ewinga (Tn) oraz przesunięcia pików wyrażone jako różnice Tn − Tp (Tp – liczba falowa dla prawidłowej tkanki kostnej); Tl − Tn (Tl - liczba falowa dla guza po leczeniu). (**b**) i (**f**) Tn ≥ 1027 cm^{-1} (niebieski) vs <1027 cm^{-1} (czerwony); (**c**) i (**g**) Tl − Tn ≥ +1 cm^{-1} (czerwony) vs Tl − Tn < +1 cm^{-1} (niebieski) (**d**) i (**h**) Tn − Tp < −1 cm^{-1} (czerwony) vs Tn −Tp > = −1 cm^{-1} (niebieski).

Mediana okresu obserwacji analizowanych pacjentów wyniosła 31,7 miesięcy (od 12 do 70 miesięcy). 3-letni czas przeżycia wolny od progresji choroby (PFS) wynosił 41,36%, a 3-letnie całkowite przeżycie (OS) wynosiło 56,66%. Krzywe Kaplana-Meiera dla PFS oraz OS z uwzględnieniem położenia maksimum piku absorbancji w zakresie 950 - 1100 cm^{-1} liczby falowej zostały przedstawione na Wykresie 31.

5.1.2 Analiza pasm składowych regionu drgań grup funkcyjnych należących do amidu I-rzędowego. Określenie struktury drugorzędowej białka.

Analiza widm FTIR wykazała znaczące przesunięcia pików absorbancji amidu I dla tkanek nowotworowych w stosunku do tkanek prawidłowych oraz tkanek nowotworowych po leczeniu, w celu dalszego zbadania tych różnic zastosowano rozkład na poszczególne pasma składowe regionu 1600 cm^{-1} do 1700 cm^{-1} przekształconego w drugą pochodną.

Tabela 21 zawiera przypisanie charakterystycznych pasm należących do amidu I-rzędowego dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, tkanki nowotworowej przed leczeniem oraz tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej. Dodatkowo ze względu na wcześniejsze znaczące wynik analizie poddano tkanki uzyskane od pacjentów bez wznowy nowotworu oraz tkanki pobrane od pacjentów u których odnotowano wznowę.

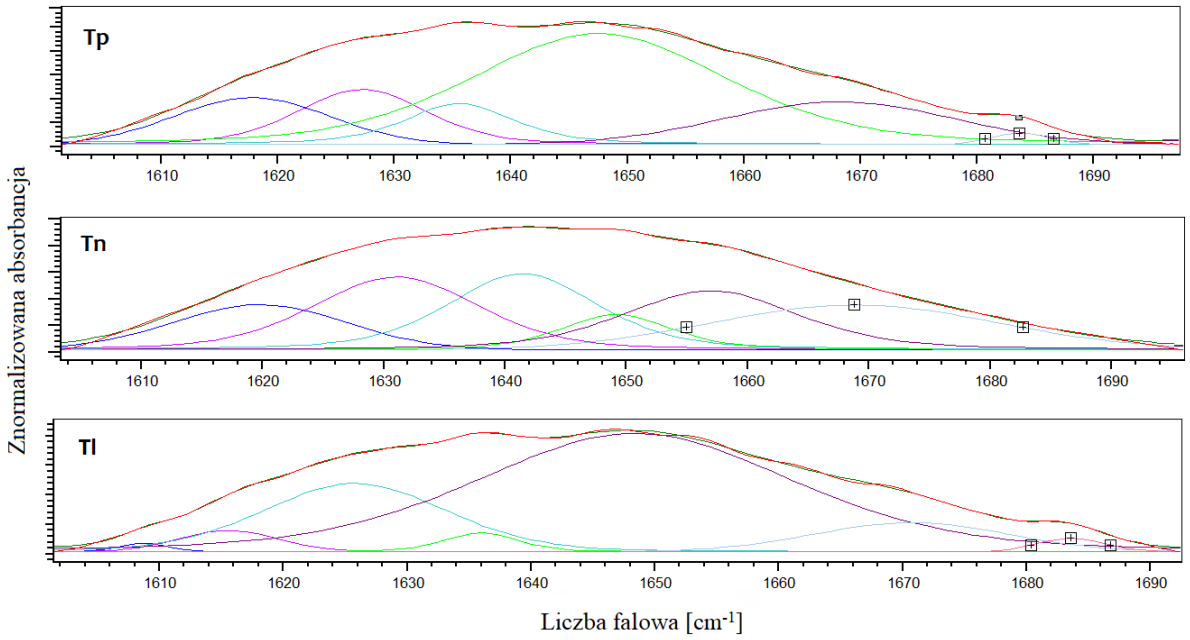
Tabela 21. Przypisanie pozycji pasma amidu I do struktury drugorzędowej białka [cm^{-1}].

Struktura drugorzędowa amidu I	**Tp** (tkanka prawidłowa)	**Tn** (tkanka nowotworowa)	**Tl** (tkanka po leczeniu)		**wznowa**	**brak wznowy**
β-kartka	1626	**1629**↗	1627		**1626**↗	1623
β-kartka						1629
β-kartka	1636	**1641**↗	1636		**1635**↙	1641
α-helisa	1650	1648	1650		**1650**↙	1659
α-helisa		**1659**				
β-zwrot	1671		1672		**1670**↙	1678
β-zwrot	1684	**1680**↙	1683		**1684**↙	1689

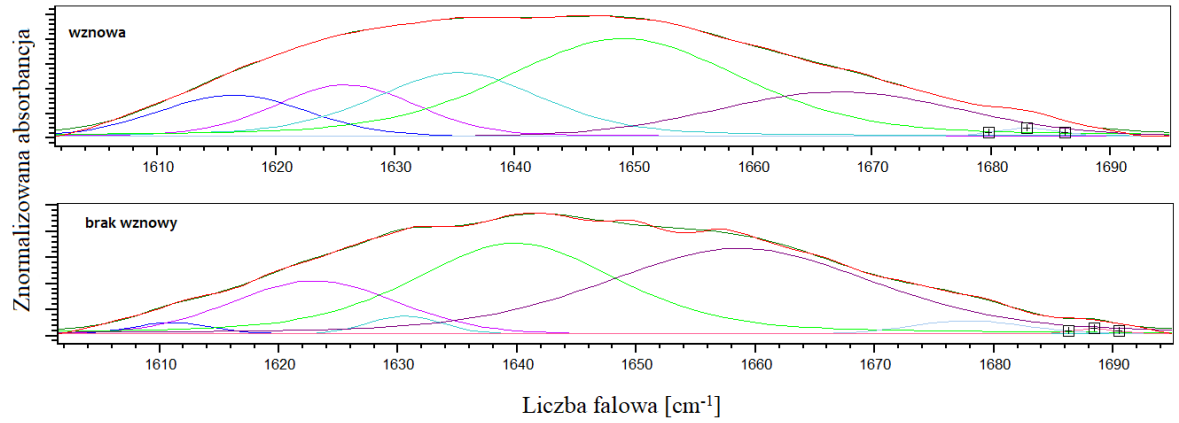
W pozycjach linii obserwowanych po dekompozycji amidu I dla próbek ES zaobserwowano znaczące różnice. Poddając analizie tkankę nowotworową w stosunku do tkanki prawidłowej jak i nowotworowej po leczeniu obserwujemy znaczące przesunięcia niemal we wszystkich pasmach. Dodatkowo w tkance ES przed leczeniem występuje nowe pasmo przypisane do α-helisy, natomiast znaczący jest też zanik linii na poziomie 1671 cm^{-1} odpowiadającego β-zwrotowi.

Natomiast porównując pozycje pasm amidu I dla pacjentów, u których odnotowano wznowę w stosunku tych u których ona nie wystąpiła zaobserwowano znaczące przesunięcia szczytów pasm dla wszystkich składowych w danym zakresie. Łącznie z występującym tylko w próbkach pacjentów bez wznowy dodatkowym pasmem dla do β-kartki na poziomie 1629 cm^{-1}.

Następnie przeprowadzono Gaussowską dekompozycję (rozplot) białka, adekwatnie do czynności przeprowadzonych i opisanych w podrozdziale 5.1.2 powyższej pracy. Na Wykresach 32 oraz 33 znajduje się graficzne przedstawienie wyników.



Wykres 32. Dopasowanie krzywej pasma amidu I dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (Tp), tkanki nowotworowej przed leczeniem (Tn), tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (Tl). Zakres dopasowania 1600-1700 cm^{-1}.



Wykres 33. Dopasowanie krzywej pasma amidu I dla próbek pacjentów bez wznowy oraz tkanek pobranych od pacjentów, u których odnotowano wznowę. Zakres dopasowania 1600-1700 cm^{-1}.

Skład procentowej struktury drugorzędowej białka w strukturze całkowitego białka dla wszystkich badanych grup (według względnej powierzchni prążków składowych) przedstawiono w Tabeli 22 i na Wykresie 34. Występują różnice w konformacji białka w tkance nowotworowej w stosunku do prawidłowej tkanki kostnej. Stwierdzono, że struktura i organizacja struktur białkowych jest różna dla poszczególnych analizowanych grup. Istotne zmiany dotyczą powierzchni zarejestrowanych linii struktur białkowych. Największe różnice

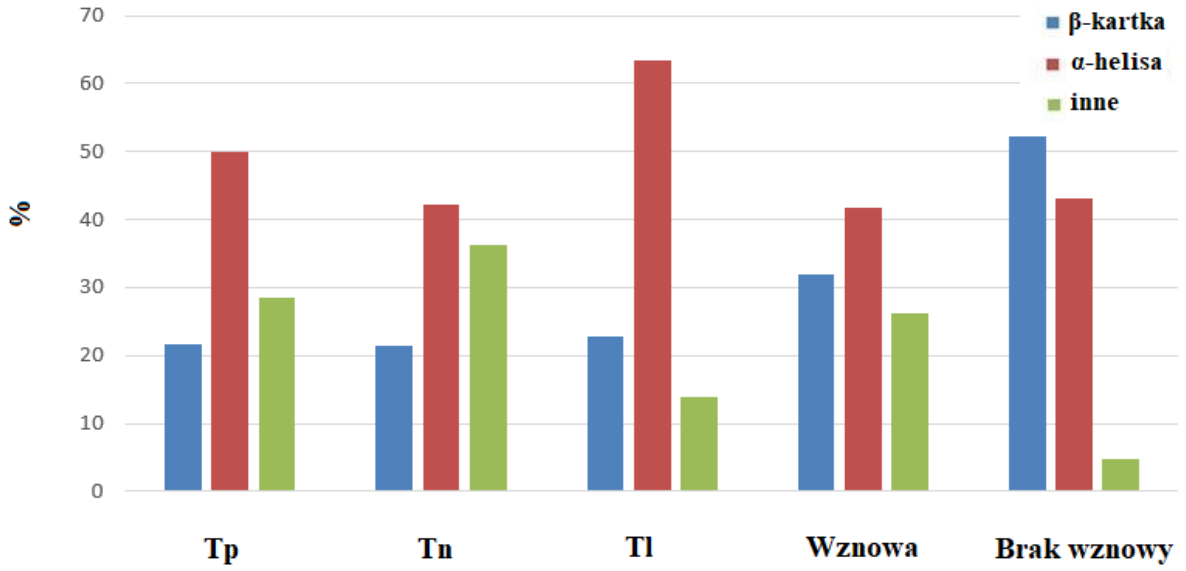
odnotowano w widmach FT-IR pasma amidu I dla struktury α-helisy tkanek nowotworowych przed leczeniem, gdzie nastąpił spadek udziału tej formy (42,3%) w porównaniu z prawidłową tkanką kostną pobraną w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (50%) oraz tkanką nowotworową po chemioterapii indukcyjnej (63,3%).

Największe różnice odnotowano w widmach FT-IR pasma amidu I dla struktury β-kartki w podtypie desmoplastycznym/guzowym, gdzie jej udział wynosił 73,7% w porównaniu z kontrolą 68,5% .

W przypadku grupy pacjentów, u których wystąpił nawrót choroby procentowy udział struktury β-kartki wynosił 31,9%, podczas gdy u pacjentów bez wznowy był on zdecydowanie wyższy i wynosił 52,3%.

Tabela 22. Skład procentowej struktury drugorzędowej białka według względnej powierzchni pasm składowych dla Tp - prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, Tn - tkanki nowotworowej przed leczeniem, Tl - tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej, jak i dla próbek pacjentów bez wznowy oraz tkanek pobranych od pacjentów u których odnotowano wznowę.

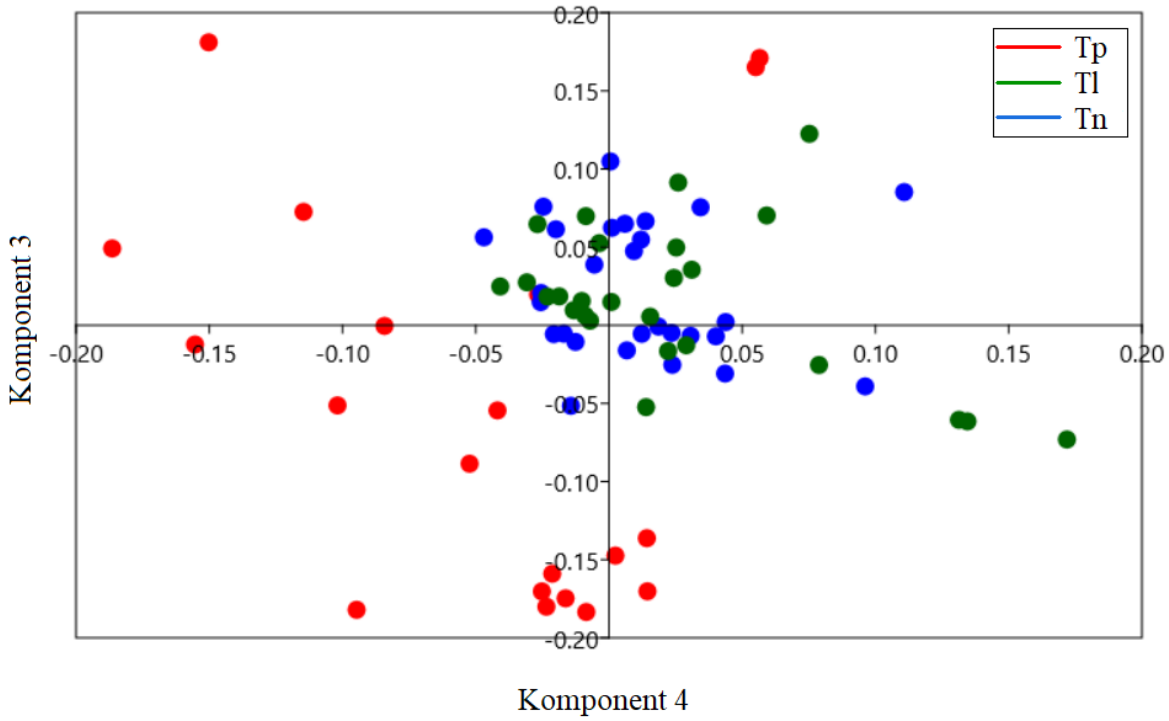
	β-kartka [%]	α-helisa [%]	inne [%]
Tp (tkanka prawidłowa)	21,6	50	28,4
Tn (tkanka nowotworowa)	21,4	42,3	36,3
Tl (tkanka po leczeniu)	22,7	63,3	14
Wznowa	31,9	41,8	26,3
Brak wznowy	52,3	43	4,7



Wykres 34. Procentowy skład struktury drugorzędowej białka dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (Tp), tkanki nowotworowej przed leczeniem (Tn), tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (Tl), jak i dla próbek pacjentów bez wznowy oraz tkanek pobranych od pacjentów u których odnotowano wznowę.

5.1.3. Statystyczne analizy wielowymiarowe

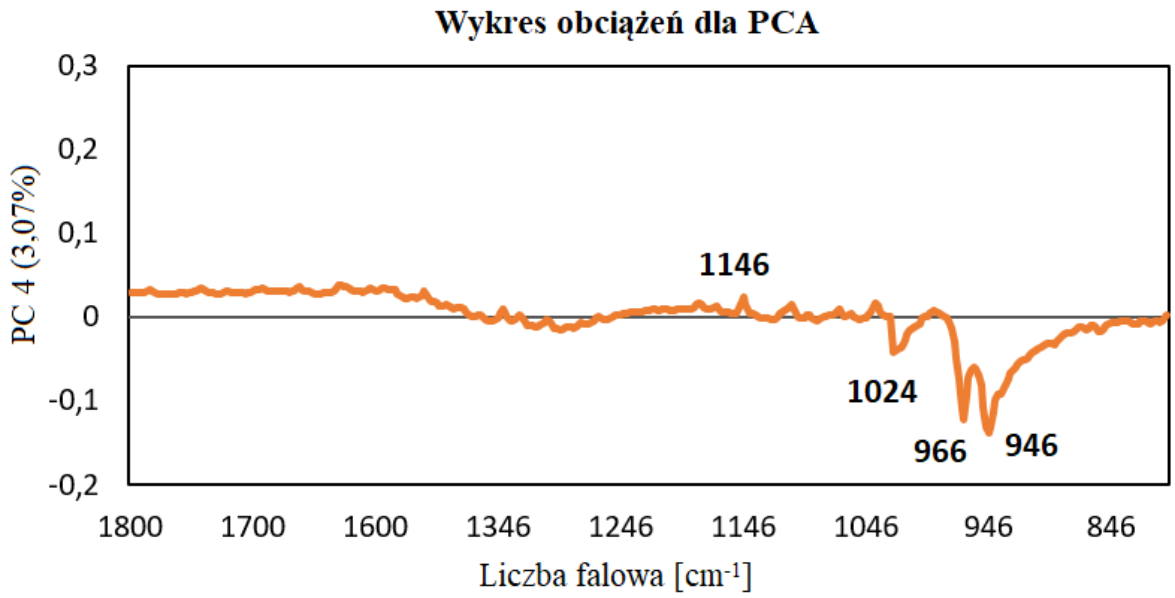
Wyniki analizy komponentów głównych (PCA) dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (kolor czerwony), tkanki nowotworowej przed leczeniem (kolor niebieski), tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (kolor zielony) zostały przedstawione na Wykresie 35. Wykres punktowy ukazuje wyraźny podział na dwa klastry, czerwoną dla próbek kontrolnych oraz drugi który składający się z próbek tkanki nowotworowej przed leczeniem (kolor niebieski) jak i tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (kolor zielony).



Wykres 35. Wyniki analizy PCA widm spektroskopii ATR-FTIR dla: Tp - prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (kolor czerwony), Tn - tkanki nowotworowej przed leczeniem (kolor niebieski), Tl - tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (kolor zielony). Zakres analizy 800-1800 cm^{-1} „*fingerprint region*".

Wyniki w grupie próbek tkanek prawidłowych są dużo bardziej rozproszone, w porównaniu do wyników grupy nowotworowej przed i po leczeniu, które znajdują się w centralnej części wykresu. Komponent 3 (PC3) wyjaśnia 3,46% zmienności danych, a komponent 4 (PC4) 3,07%. Klastry są nieznacznie ze sobą zmieszane w centralnej części grafu, jednakże wzór ten jest charakterystyczny dla próbek biologicznych, charakteryzujących się znaczną różnorodnością biologiczną.

Klaster czerwony (próbki dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu) jest przesunięty w przestrzeni wykresu w kierunku ujemnych wartości dla PC4, natomiast klaster niebieski oraz zielony (próbki ES przed oraz po chemioterapii indukcyjnej) są umiejscowione z prawej strony i przesunięte w kierunku dodatnich wartości dla tego samego komponentu.



Wykres 36. Wykres obciążeń PC4 dla PCA z Wykresu 35. Analizy przeprowadzono na widmach ATR FTIR drugiej pochodnej w obszarze „*fingerprint region*".

Wykres 36 zawiera obciążenia dla PC4 (komponent 4) z analizy PCA. W przypadku klastra oznaczonego na kolor czerwony (Wykres 35) czyli próbki dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu zaobserwowano przesunięcie w kierunku ujemnych wartości dla PC4, co odpowiada dodatnim wartościom na wykresie obciążeń, zaobserwowanym dla szczytu liczby falowej 1146 cm^{-1}. Dla klastrów niebieskiego oraz zielonego zawierających odpowiednio próbki ES przed oraz po chemioterapii indukcyjnej wyniki przybrały wartości dodatnie, co odpowiada ujemnym wartościom na wykresie obciążeń. Najbardziej widocznym negatywnym czynnikiem, który odróżnia tkanki nowotworowe przed i po leczeniu od kontrolnego zawierającego prawidłową tkankę kostną, jest obciążenie przy 946 cm^{-1}. Kolejne ujemne ładunki wskazano na 966 cm^{-1} i 1024 cm^{-1}. Wszystkie te piki znajdują się w zakresie kwasów nukleinowych co może wskazywać na zmiany w zakresie DNA i RNA.

Rozdział 6. Dyskusja

Diagnostyka histopatologiczna guzów drobnookragłokomórkowych u dzieci jest trudna, co wynika z ich morfologicznego podobieństwa, niskiego zróżnicowania komórek oraz bardzo małej częstości występowania. Dlatego, oprócz standardowych barwień histochemicznych, do ich rozpoznania konieczne jest zastosowanie metod opartych na immunologii, genetyce oraz biologii molekularnej. Generuje to tym samym wysoki koszt badania oraz jego czasochłonność, co ma szczególnie duże znaczenie w przypadku nowotworów u dzieci, gdzie należy jak najszybciej rozpocząć leczenie.

Postęp w onkologii, jaki się dokonał w ostatnich dekadach, wynika między innymi z coraz lepszej stratyfikacji pacjentów do grup terapeutycznych. Pacjenci z obecnością niekorzystnych rokowniczo markerów otrzymują zintensyfikowane schematy leczenia, pomimo większego ryzyka toksyczności i działań niepożądanych, podczas gdy pacjenci z dobrym rokowaniem mogą otrzymać schematy zredukowane. Dlatego poszukiwanie nowych markerów prognostycznych jest tak istotne dla dalszej poprawy wyników leczenia, zwłaszcza w przypadku nowotworów, gdzie wciąż nie osiągnięto prawie 100% wyleczalności. Do takich guzów u dzieci zaliczają się MB i ES. Dodatkowo dużą rolę odgrywa monitorowanie choroby w celu określenia skuteczności wybranej terapii. Odpowiedź na tak ważne pytania można uzyskać stosując techniki dające możliwości zbadania pojedynczych molekuł lub mikro- a nawet nano- obszarów tkanek. Informacje uzyskiwane przez standardowo stosowane procedury diagnostyki medycznej w niektórych przypadkach są niewystarczające, co wpływa na konieczność poszukiwania nowych metod badawczych. Stąd też rozwój technik fizycznych stosowanych w diagnostyce medycznej. Dzięki nim możliwe jest pozyskanie nowych informacji takich jak: określenie zmian biomolekuł w komórkach, wynikających z kancerogenezy lub działania leków cytotoksycznych.

Techniki spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii Ramana. Są to uzupełniające się metody spektroskopowe oparte na oznaczaniu drgań molekularnych. Pomimo tego dużego podobieństwa istnieją bezpośrednie różnice pomiędzy nimi takie jak: pochodzenie, funkcjonalność i sposób identyfikacji badanych materiałów. Zasada działania spektrosopii w podczerwieni FTIR opiera się na zmianach momentu dipolowego, podczas gdy spektroskopii Ramana na zmianach polaryzowalności cząsteczek, stąd też profil widmowy dla tej samej próbki mierzony obiema technikami będzie znacząco sie od siebie różnił [92].

Właściwa interpretacja wyników badań spektroskopowych wymaga przetworzenia ogromnej ilości danych numerycznych, które składaja się na widmo. Mogą do tego służyć

proste metody statystyczne m.in. analiza klastrowa, oraz bradzo zaawansowane metody jak generowanie sieci neuronowych [93]. Analiza statystyczna wyszukuje w danych spektralnych określone parametry różnicujące, które mogą posłużyć do klasyfikacji i zróżnicowania dwóch odmiennych rodzajów tkanek. Uzyskane różnice można następnie wykorzystać jako biomarker diagnostyczny i/lub prognostyczny dla danej jednostki chorobowej.

W czasopiśmie *Nature* już 33 lata temu zostały opublikowane badania polegające na analizie chromosomów pojedynczych komórek za pomocą spektroskopii rozpraszania ramanowskiego [94]. W roku 1976 Webb S.J. [95] opublikował artykuł dotyczący zastosowania spektroskopii Ramana w którym określono wpływ mikrofal na komórki kontrolne i nowotworowe. Obrazowanie Ramanowskie wykorzystano również w badaniu oscylacyjnych i statycznych polaryzacji dielektrycznych w komórkach złośliwych raka sutka co było tematem pracy Cooper M..S oraz Theimer O. [96] wydanej w 1980 roku.

Pierwsze doniesienia na temat diagnostyki onkologicznej za pomocą spektroskopii IR odnotowano już w roku 1985. García-Borrón J.C. i wsp. [97] przedstawili wyniki analizy spektroskopii FTIR dla naturalnych melanin wyizolowanych z czerniaka myszy Hardinga-Passeya. Potwierdzili oni, że melaniny obecne w czerniaku myszy mają związane ugrupowania białkowe, tak że powinny istnieć „in vivo" jako kompleksy melanoproteinowe. Jeszcze w tym samym roku opublikowano pracą zespołu Benedetti E. i wsp. [98] w której podkreślono, że spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera daje nowe możliwości badań przewlekłej białaczki limfatycznej. Analizie poddano dziesięć próbek limfocytów pochodzących od pacjentów dotkniętych przewlekłą białaczką limfatyczną oraz dziesięć próbek kontrolnych od osób zdrowych. Zaobserwowane różnice spektralne między dwoma rodzajami badanych komórek odpowiadające wzrostowi intensywności, w próbkach białaczkowych w stosunku do próbek prawidłowych, prążków odpowiadających głównie za symetryczne i asymetryczne drganiom rozciągające PO_2^- przypisane dla DNA. W roku 1986 Theophanides T. i współpracownicy [99] opublikowali artykuł dotyczący zmiany konformacyjnych kwasu magnezowo-nukleinowego w nowotworach.

W związku z faktem, iż spektroskopia FTIR oraz spektroskopia Ramana może rozpoznawać nowotworowe tkanki od zdrowych na poziomie molekularnym, ich zastosowania w praktyce diagnostyki onkologicznej rosną z roku na rok. Do tej pory zostały one do badania: raka jamy ustnej i gardła [100], raka piersi [101], raka prostaty [102], raka pęcherza moczowego [103], raka jelita grubego [104], raka płuc [105], raka jajnika [106], raka szyjki macicy [107], raka żołądka [108], raka okrężnicy [109], a nawet do badania mikroflory w chorobach nowotworowych [110].

Ostatnimi czasy nabiera też znaczenia stosowanie spektroskopii FTIR jako szybkiej oraz dokładnej techniki diagnostycznej w czasie rzeczywistym do określanie marginesów tkanek nowotworowych w badaniach śródoperacyjnych. Tian P. i wsp. [111] opublikowali wynik badań w których podsumowali śródoperacyjne wykrywanie przerzutów do węzłów chłonnych w raku piersi metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera. Badanie wykonano na 149 węzłach pobranych od 49 pacjentów. Badanie histopatologiczne potwierdziło 38 węzłów z przerzutami i 111 bez przerzutów. Osiemnaście z 29 parametrów spektralnych różniło się znacząco między węzłami z przerzutami i bez przerzutów. Wybrano pięć parametrów jako niezależnych czynników tworzących funkcje dyskryminacyjne. Czułość, swoistość i dokładność tej metody wyniosły odpowiednio 94,7, 90,1 i 91,3%. Potwierdzono tym samym skuteczność tej metody w szybkiej i dokładnej ocenie śródoperacyjnej co do rozprzestrzeniania się przerzutów która dostarcza chirurgowi niezbędnych informacji do natychmiastowego reagowania w trakcie trwania operacji. Ta sama grupa pod przewodnictwem Tian P. przedstawiła badanie którego celem było opracowanie szybkiej i dokładnej metody diagnostycznej za pomocą spektroskopii FTIR do śródoperacyjnego różnicowania zmian złośliwych od łagodnych tkanek piersi. W badaniu pobrano łącznie 100 próbek tkanki piersi od 100 pacjentek [112].

Medulloblastoma

Szybka, obiektywna oraz poprawna diagnostyka histopatologiczna zmian w ośrodkowym układzie nerwowym pozwala na wczesne wdrożenie odpowiedniego leczenia co daje realne szanse na zapobieganie progresji choroby. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) wraz z spektroskopią Ramanowska są z powodzeniem stosowane jako techniki oparte na poszukiwaniu biomarkerów w nowotworach mózgu. Z biegiem czasu stały się bardziej czułe, osiągając w kilku badaniach dokładność diagnostyczną na poziomie powyżej 90%. Bezpośrednio wskazuje to na ich potencjał do wdrożenia klinicznego w niedalekiej przyszłości [92].

Istnieją liczne doniesienia naukowe w których autorzy opisują charakterystyczne cechy widm FTIR jako różnicujące prawidłową i nowotworową tkankę mózgu. Gajjar W. i wsp. [113] wykazali, że badanie ludzkiej tkanki mózgowej za pomocą spektroskopii ATR-FTIR lub Ramana pozwala na łatwe odróżnienie zdrowej tkanki mózgu od nowotworowej. Badaniu zostało poddane kilka typów histologicznych guzów pierwotnych wraz z próbkami przerzutów

do mózgu. Stwierdzono, że pewne stosunki pików odpowiadające głównym grupom biochemicznym mogą służyć jako biomarkery spektralne w diagnozowaniu guzów mózgu. Największej znaczenie miały różnice stosunków lipid/białko, fosforan/węglowodan, RNA/DNA i estry, a także cholesterol/fenyloalanina. W innym badaniu przeprowadzonym przez Depciuch i wsp. [54] autorzy wykazali, że obszary odpowiadające lipidom, kolagenowi i białkom w widmach Ramana i FTIR najlepiej różnicują glejaka i kontrolne tkanki mózgu. Zaznaczyli, że lipidy mogą być spektroskopowym markerem w badanych przez nich guzach mózgu. Również w powyższym badaniu MB obszary spektroskopowe przypisane do białek oraz kwasów nukleinowych wyróżniono jako najbardziej odpowiednie do różnicowania tego nowotworu od normalnej tkanki mózgowej. W przypadku lipidów, które są bogate w sygnały wibracyjne C-O w spektroskopii FTIR, wykazano brak piku przy 1737 cm^{-1} w klasycznym podtypie MB w przeciwieństwie do grupy kontrolnej i innych podtypów MB.

Zmiany zawartości RNA monitorowano przy piku 1125 cm^{-1}. Obecność tego pasma zanika wraz z karciogenezą (brak jego obecności we wszystkich podtypach histologicznych) w porównaniu z kontrolą. Obniżenie zawartości tego piku obserwowano również w badaniach osocza i surowicy pacjentów ze stwardnieniem rozsianym [114]. Ciekawym przypadkiem jest pik 1341 cm^{-1}, który występuje tylko w podtypie anaplastycznym MB, przypisuje się go do białek. Dodatkowo u pacjentów z tkankami nowotworowymi zaobserwowano, że piki przypisane białkom: 1541 cm^{-1} (amid II) i 1650 cm^{-1} (amid I) wykazują przesunięcie do niższych liczb falowych w porównaniu z próbką kontrolną, co może wskazywać wskazuje na zmiany powodujące zaburzenia w funkcjonowaniu białek [54]. Potwierdzają to badania proteomiczne opisane przez S. Rivero-Hinojosa i in. Naukowcy ci wykazali, że ekspresja białek i ich modyfikacje odzwierciedlają stan funkcjonalny komórek nowotworowych, ukazując wpływ, jaki mutacje somatyczne i inne zmiany genetyczne i epigenetyczne wpływają na stan komórki podczas transformacji nowotworowej [115]. Wiele białek występuje jako krążące markery zapalenia i angiogenezy [66]. Przykładem może być YKL-40 w surowicy który jest markerem rokowniczym i prognostycznym w glejakach [116-118].

Grupa Husseina Ali i wsp. [55] przedstawiła również rozróżnienie pomiędzy tkanką kontrolną a nowotworową tkanką z OUN. W tym przypadku otrzymano je głównie dzięki analizie pasm przypisanych białkom (amid II i amid I) zlokalizowanym przy 1545 i 1650 liczby falowej. Jest to zgodne z uzyskanymi w powyższym badaniu wynikami, ponieważ piki białkowe na poziomie: 1541 cm^{-1} (amid II) i 1650 cm^{-1} (amid I) przesuwają się w kierunku niższych liczb falowych w próbkach MB w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Ponadto w powyżej wspomnianej publikacji autorzy pokazali, że prążki lipidowe przy 2950-2850 cm^{-1}

wykazują mniejszą wartość absorbancji w tkance nowotworowej. W niniejszym badaniu, w przeciwieństwie do wyników Hussein Ali i wsp., nie uzyskano istotnych różnic w paśmie lipidów przy 2950-2850 cm^{-1} między próbkami MB oraz kontrolnymi.

Znaczącą różnicą w widmie uzyskanym od pacjentów u których nie odnotowano przerzutów jest fakt iż nie zarejestrowano dodatkowego piku na poziomie 1078 cm^{-1} liczby falowej który pojawił się w grupie pacjentów z przerzutami. Badania opublikowane przez grupę Agrov S. i wsp. na temat chorób zapalnych jelit jako stadium pośredniego pomiędzy stanem normalnym a rakiem wskazują, iż obecność piku na poziomie 1078 cm^{-1} jest powiązana z rolą fosforanów w przebiegu choroby [119]. Analiza zmian fizykochemicznych guza oraz składu biochemicznego w poszczególnych podtypach histologicznych rdzeniaka zarodkowego widm FTIR, pozwala na powiązanie poszczególnych zmian z obecnością przerzutów (dodatkowy pik 1078 cm^{-1}) lub wznowy (przesunięcie piku 1539 cm^{-1}) u pacjentów. Zależności te zostały określone dla tej grupy badanej w celu ich jednoznacznego potwierdzenia wymagane jest poszerzenie badań.

Cameron i wsp. opublikowali badanie [66] z zakresu spektroskopii w podczerwieni w którym analizowano 641 próbek surowicy pobranych od pacjentów z nowotworem mózgu oraz pacjentów kontrolnych. Udało im się rozróżnić (z dokładnością na poziomie >80%) kilka rodzajów zmian zachodzących w tkance mózgowej, takich jak: glejaka wielopostaciowego, oponiaka, pierwotnego chłoniaka ośrodkowego układu nerwowego oraz zmiany przerzutowe w mózgu. Ujawniono pewne subtelne różnice w strukturach drugorzędowych białek między grupami pacjentów które uzyskano poprzez dekonwolucję amidu I. W powyższym badaniu w wyniku dekonwolucji wykazano różnice w prążku amidowym I odpowiadające strukturom białkowym β-kartki i α-helisy pomiędzy kontrolami a wszystkimi trzema badanymi podtypami MB (klasycznym, wielkokomórkowym/ anaplastycznym i desmoplastycznym / guzkowym). To różnicowanie zostało następnie potwierdzone poprzez wykonane analizy PCA, jak i HCA.

Pomimo licznych prac wykorzystujących spektroskopię FTIR do analizy nowotworów mózgu nie znaleziono w literaturze badania do wykrywania i rozróżniania MB u dzieci. Natomiast grupa Polis i wsp. [57] wykorzystała spektroskopię Ramanowską do diagnostyki MB u dorosłych. Wykazano, że technika ta może zostać wykorzystana do identyfikacji składu biochemicznego charakterystycznego dla rdzeniaka zarodkowego. Pokazano, iż próbki MB zawierały duże ilości białek przy znacznie zmniejszonej zawartości lipidów, podczas gdy zdrowa tkanka zawierała oba te związki z dużej ilości. W publikacji tej szczegółowo określono stosunki absorbancji szczytów następujących liczb falowych: I2930/I2845 i I1586/I1444, czego

nie można było oznaczyć w niniejszej pracy ze względu na parafinowy charakter użytych do analizy próbek.

W innej publikacji Le Reste P.J. oraz wsp. [120] pokazali, że możliwa jest integracja widm ramanowskich z danymi uzyskanymi z transkryptomu w glejaku wielopostaciowym, co pozwoliło na rozróżnienie podtypów GM oraz miało wartość predykcyjną dotyczącą wyników leczenia pacjentów.

W niniejszym badaniu wykorzystano nowatorskie narzędzie analityczne widm spektroskopowych opracowane przez zespół Katedry Badań Biofizycznych i Strukturalnych Instytutu Nauk Fizycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego. Opiera się ono na ocenie dynamiki absorbancji dla spektroskopii w podczerwieni oraz dynamiki widma dla spektroskopii Ramanowskiej i zostało już wykorzystane m.in. w badaniach dotyczących ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci [67]. Wykorzystując tę technikę można odróżnić tkankę prawidłowego mózgowia od tkanki MB, natomiast nie udało się rozróżnić poszczególnych podtypów histologicznych MB. Analiza dynamiki absorbancji dla pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym ze średnim widmem grupy kontrolnej pokazała, iż się zakres liczb falowych 1714-1716 cm^{-1} charakteryzuje 100% zmienioną dynamiką absorpcji w MB w porównaniu ze średnim widmem grupy kontrolnej. Oznacza to potencjalną możliwość rozróżniania na tej podstawie tych dwóch rodzajów tkanek. Pik ten jest przypisywany w literaturze (Movasaghi Z. i wsp.) [121] dla wiązania C=O w tyminie, a zaobserwowane różnice mogą być wyrazem zmian w kwasach nukleinowych. Potwierdzają to wyniki uzyskane przez Dovbeshko, G.I. i wsp. [122] gdzie powiązano go z drganiami rozciągającymi C=O zasady purynowej w DNA i RNA oraz dla Amidu I (powstaje z drgań rozciągających C=O). W pracy Dovbeshko, G.I. analizowano widma FTIR dla RNA izolowanego z guza mózgu (glejaka) oraz DNA izolowanego z komórek najądrza szczurów ze strefy awarii elektrowni atomowej w Czarnobylu napromieniowanych promieniami gamma w niskich dawkach. Obserwowane zmiany wskazywały na uszkodzenia pierwszorzędowej, drugorzędowej i trzeciorzędowej struktury kwasu nukleinowego, które wydają się być związane z modyfikacją zasad i cukrów oraz redystrybucją sieci wiązań. W innej publikacji Gunjana T. i wsp. [69], badano zmiany w podwójnej helikalnej strukturze DNA po dodaniu winkrystyny, opisano pik 1714 cm^{-1} jako prążek guaniny.

W kolejnym etapie powyższej, autorskiej metody analizy dynamiki absorpcji zastosowanoprocedurę chemometryczną polegającą na porównywaniu widm spektroskopowych osób chorych z widmem referencyjnym, którym było widmo średnie otrzymane z widm kontrolnych. Porównywanie widm zostało oparte na analizie różnicy tempa

zmian absorpcji porównywanych widm w dziedzinie liczb falowych. Graficznie powyższe warunki oznaczają, że w analizowanym regionie absorbancja tkanek MB od osób chorych maleje, a dla osób z grupy kontrolnej rośnie lub jest stała. Postawiona hipoteza została pozytywnie zweryfikowana na wcześniej wykrytym istotnym zakresie tj. 1714-1716 cm^{-1}.

Wykorzystanie spektroskopii FTIR i Ramana jako narzędzi diagnostycznych w medycynie wymaga w wielu przypadkach użycia zaawansowanych metod komputerowych do analizy danych [93]. W powyższej pracy zastosowano uczenie maszynowe ML, a dokładnie algorytm drzewa decyzji C5.0. W wyniku czego uzyskano drzewo decyzji zbudowane na podstawie całej bazy, które ukazuje perfekcyjną klasyfikację różnicującą pomiędzy tkankami z MB oraz tkankami kontrolnymi (z dokładnością na poziomie 97,99%) przy zastosowaniu absorbancji dla wybranych 7 liczb falowych tj.: 800 cm^{-1}, 1150 cm^{-1}, 1698 cm^{-1}, 2930 cm^{-1}, 3220 cm^{-1}, 3476 cm^{-1}, 3500 cm^{-1}. Tym samym piki te można dla tej grupy badanej określić jako markery spektralne.

W niniejszej pracy został użyty szereg metod w celu różnicowania widm histopatologicznych podtypów MB i normalnej tkanki mózgowej za pomocą spektroskopii FTIR oraz Ramana. Pomimo dość wyraźnej różnicy między widmami MB i prawidłową tkanką mózgową, różnice w składzie biochemicznym poszczególnych podtypów histologicznych były zbyt małe, aby można je jednoznacznie zidentyfikować za pomocą spektroskopii wibracyjnej. Pomimo tego iż możliwa była klasyfikacja poszczególnych widm kontrolnych i MB na trzy grupy histopatologiczne za pomocą analizy PCA i HCA, przypisanie każdej indywidualnej próbki do określonego podtypu histologicznego okazało się zbyt niedokładne. Skuteczność tych metod w diagnostyce poszczególnych guzów mózgu potwierdzono natomiast w badaniu przeprowadzonym przez Pinto Aguiar i wsp. [123] gdzie opracowano model rozróżniania widm prawidłowej tkanki i guzów OUN, oparty na wynikach analizy głównych składowych (PCA) oraz odległości euklidesowej.

W przypadku pozytywnej weryfikacji w innych ośrodkach na innych grupach pacjentów, uzyskane w niniejszej pracy wyniki mogą stać się podstawą do zastosowania spektroskopii wibracyjnej jako metody komplementarnej w diagnostyce histopatologicznej tych guzów. Miałoby to szczególnie duże znaczenie w badaniach śródoperacyjnych, gdzie na podstawie szybkiej i zautomatyzowanej analizy składu chemicznego tkanki, neurochirurg otrzymałby w czasie rzeczywistym informację, czy w danym obszarze mózgowia znajduje się tkanka MB. Pozwoliłoby to na optymalizację zakresu resekcji guza, która nie opierałaby się jedynie na ocenie wizualnej. W przypadku badania standardowego, widma spektroskopii FTIR

i Ramana mogłyby skrócić czas do uzyskania diagnozy, zmniejszyć ich koszt oraz zmniejszyć ryzyko błędu diagnostycznego.

Mięsak Ewinga

W przypadku mięsaka Ewinga (ES) przez ostatnie 40 lat stosowanie terapii miejscowej, jak i wielolekowej chemioterapii neoadjuwantowej spowodowało duży postęp w leczeniu choroby zlokalizowanej, poprawiając 5-letnie przeżycie z mniej niż 20% do ponad 70% [44]. Niestety pacjenci z przerzutami lub nawrotem mają nadal złe rokowania [124,125], fakt ten podkreśla pilną potrzebę opracowania nowych terapii dla ES [42,126].

Badania dotyczące zastosowania spektroskopii wibracyjnej w diagnostyce złośliwych guzów kości, które są częścią niniejszej pracy, mają charakter pionierski i do chwili obecnej nie znaleziono podobnych opracowań opublikowanych przez inne zespoły badawcze na świecie [39,41,89,127]. Nie ma również opublikowanych wielu prac, które oceniałyby wpływ leczenia innych nowotworów na zmianę ich widma w spektroskopii FTIR i Ramana. Jedno z takich badań zaostało opublikowane przez zespół Walda i wsp. [128], analizowano w nim progresję czerniaka złośliwego. Wykazano, że na podstawie nienadzorowanej analizy danych uzyskanych ze spektroskopii FTIR można przypisać pacjentów do dwóch grup, które korelują z odpowiedzią kliniczną na zastosowane leczenie dakarbazyną. Stworzono model statystyczny, który klasyfikował ze skutecznością 83 % pacjentów do grupy reagującej lub niereagującej na zastosowaną chemioterapię DTIC. Pokazano również, że obie grupy różniły się pod względem zmiany konformacji białka oraz ilości lipidów w badanych komórkach czerniaka.

W innej publikacji. Zawlik i wsp. opisali wykorzystanie FPA-FTIR w połączeniu z analizą głównych składowych (PCA). Umożliwiło to ocenę wpływu chemioterapii na leczenie pacjentek z rakiem piersi [129]. Udokumentowano tym samym potencjał tej techniki jako narzędzia monitorującego. Tolstorozhev G.B. i in. [130] również potwierdzili, że analiza spektroskopowa w podczerwieni może być z powodzeniem wykorzystana do diagnostyki i monitorowaniu leczenia na poziomie molekularnym w przypadku: czerniaka, nowotworów piersi i tarczycy.

Zakres daktyloskopowy liczby falowej tzw. *„fingerprint region”* zawarty w przedziale od 900 cm^{-1} do 1800 cm^{-1} widma średniej podczerwieni zawiera najważniejsze tryby wibracyjne dla wiązań chemicznych białek i kwasów nukleinowych [51]. Dlatego też w pracy starano się skupić właśnie na nim w poszukiwaniu biomarkera nowotworowego w tkance ES. Analizie

poddano prawidłową tkankę kostną pobraną w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, tkankę nowotworową ES przed leczeniem oraz tkankę nowotworową ES po chemioterapii indukcyjnej. Porównanie widm wykazało istotne zmiany absorbancji w całym analizowanym zakresie, tj. 800-3500 cm^{-1}.

Zidentyfikowano charakterystyczne pasma w widmach tkanek spektroskopowych w szczególności zakres od 1024 cm^{-1} do 1041 cm^{-1}, który pozwala na wstępną predykcję występowania wznowy u pacjentów. Zauważono znaczny wzrost wielkości absorbancji w próbkach mięsaka Ewinga w porównaniu z kontrolami, co sugeruje namnażanie się komórek nowotworowych w procesie nowotworzenia. Takie zmiany w komórkach nowotworowych zostały niejednokrotnie udokumentowane w literaturze [131]. Może być to wynikiem ich niekontrolowanego wzrostu oraz podziału przy jednoczesnej zmniejszonej stabilności DNA [132].

W pracy wykazano silną wartość prognostyczną dla liczby falowej maksymalnej absorbancji piku w zakresie 950-1100 cm^{-1} w tkankach kości z mięsakiem Ewinga w momencie diagnozy jeszcze przed podaniem chemioterapii (Tn), jak również różnicę liczby falowej między pozycją tego piku a jego odpowiednikiem w próbce guza po zakończeniu chemioterapii indukcyjnej (Tn-Tl) lub w próbce prawidłowej tkance kostnej (Tp-Tn) pobranej od tego samego pacjenta.

Wyniki powyższych analiz dla badanej grupy pokazały istotny wpływ przesunięcia szczytu liczby falowej w analizowanym zakresie na czas wolny od progresji i czas przeżycia całkowitego. Dzięki temu można było wyselekcjonować z badanej grupy z dużym prawdopodobieństwem pacjentów, u których dojdzie do progresji choorby jeszcze przed włączenem chemioterapii neodajuwantowej.

W przeprowadzonych badaniach literaturowych poszukiwano opowiedzi na pytanie za jaką czastęczkę/molekułę jest odpowiedzialny pik absorbancji w zakresie od 950 cm^{-1} 1100 cm^{-1} liczby falowej. W analizowanym obszarze widma występują piki dla rożnych istotnych biologicznie ugrupowań chemicznych/ molekularnych komórki, które odpowiadają podobnym zakresom liczb falowych dlatego też powstały obraz widma jest ich składową i zwykle nie ma możliwości ich jednoznacznej interpretacji.

Maksymalny pik absorbancji, który w badanej grupie pacjentów z ES był odpowiedzialny za przewidywanie wyniku leczenia ES jest najprawdopodobniej związany ze grupami fosforanowymi, które zawierają między innymi nukleotydy w DNA lub RNA, fosfolipidy w błonach komórkowych, fosforylowane białka, estry fosforanowe, ale może również pochodzić z hydroksyapatytu, z którego zbudowana jest kość [133]. Inną molekułą

o istotnym znaczeniu biologicznym, dla której obserwuje się szczyt absorbancji w przedziale od 1000-1100 cm^{-1} [12], jest glikogen. Dlatego zmiany fizykochemiczne, jakie zachodzą w glikogenie komórek ES, mogą również wpływać na położenie piku w zakresie 1024-1041 cm^{-1}.

Zawartość glikogenu w komórkach nowotworowych różni się w zależności od typu nowotworu. Na przykład stężenie tej molekuły jest wyższa w tkance guza okrężnicy w stosunku do tkanki zdrowej, ale w przypadku guzów szyjki macicy oraz wątroby następuje zmniejszenie jego zawartości [134]. Zwiększone poziomy glikogenu wykrywane za pomocą spektroskopii FTIR w komórkach nowotworowych mogą być potencjalnym markerem diagnostycznym dla raka płuc [83,134-136].

W aspekcie badań medycznych istotną staje się możliwość oznaczania przy wykorzystaniu spektroskopii IR struktury drugorzędowej białek. Takie zmiany mogą pojawiać się m.in. w niektórych schorzeniach neurodegeneracyjnych [137].

W przeprowadzonych badaniach odnotowano różne wartości absorbancji dla regionu FTIR odpowiadające grupom amidowym II i amidowym I dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, tkanki nowotworowej przed leczeniem, tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej, jak i dla próbek pacjentów bez wznowy oraz tkanek pobranych od pacjentów u których odnotowano wznowę. Odzwierciedlają one jakościowe i ilościowe różnice w zawartości białka nimi poszczególnych tkankach. Dekonwolucja regionu amidu I widm FTIR ujawniła różną liczbę pasm składowych w każdej z analizowanych próbek kości. Ponadto stosunki α-helisy i β-kartki pokazują, że drugorzędowa struktura białek w prawidłowej tkance kostnej różni się od tej w ES przed i po leczeniu. Różny skład procentowej struktury drugorzędowej białka według względnej powierzchni pasm składowych oraz same zmiany w konformacji białka pomiędzy wszystkimi badanymi próbkami ES mogą być wynikiem karciogenezy oraz wpływu CHT na komórki nowotworowe. W powstawaniu wielu nowotworów biorą udział białka, które są produktem nieprawidłowych genów, które nie występują w zdrowych komórkach. W przypadku ES jest nim najczęściej onkoproteina EWS-FLI1, której ciągła ekspresja i aktywność jako czynnika transkrypcyjnego są krytycznie wymagane do tworzenia, utrzymywania i proliferacji guza mięsaka Ewinga [138-142].

Parafina w analizowanych próbkach

W przedstawionej pracy doktorskiej zbadano właściwości spektroskopowe tkanek dwóch jednostek chorobowych tj. ES oraz MB. Analizie poddano materiał uzyskany w trakcie standardowej diagnostyki i utrwalony w postaci bloków parafinowych (FFPE). Na tym etapie największy problem diagnostyczny w analizie spektroskopowej stanowiła obecność parafiny. Wynika to z faktu, iż w chwili zatopienia tkanek w parafinie jej pasma nakładają się na pasma pochodzące od lipidów analizowanych tkanek. Dlatego też bezpośrednia analiza widm skrawków FFPE bez odparafinowania w zakresach występowania pasm lipidowych jest obarczona błędem. Obecnie w literaturze spotykane są dwa przeciwstawne stanowiska dotyczące odparafinowania próbek do badań spektroskopowych próbek biologicznych:

- według pierwszego jedynym właściwym sposobem analizy tkanek FFPE jest zastosowanie właściwego odparafinowania oraz nawodnienia tkanek zgodnego z wybranym protokołem [143,144], co wpłynie bezpośrednio na zniwelowanie obecności pasm pochodzenia parafinowego [143,145]. Odparafinowanie najczęściej przeprowadza się przy użyciu ksylenu lub innych rozpuszczalników, np. heksanu.

Taką metodę zastosowano dla analizowanych tkanek mięsaka Ewinga. Wykonano odparafinowania tkanek poprzez płukanie próbek w dwóch zmianach ksylenu, a następnie nawodnienie poprzez płukanie w szeregu alkoholowym. Preparatyka wraz z zastosowaniem korekcji linii bazowej oraz normalizacji pozwoliła na analizę całego wybranego zakresu liczby falowej łącznie z pasmami charakterystycznymi dla lipidów (2800-3000 cm^{-1}).

- według drugiego podejścia neguje się fakt odparafinowania tkanek jako metodę jednorodną dla całej próbki. Dlatego też wskazuje na konieczność analizy skrawków tkanek FFPE bez dodatkowej ingerencji chemicznej [146] (wykonanie analizy wraz z parafiną). W wielu publikacjach można znaleźć informację, że parafina nie wpływa na zdolność rozróżniania widm zdrowych tkanek od nowotworowych. Przykładowo przedstawiono je w pracy Chaber i wsp. [9]. Gdzie stwierdzono, że porównanie widm absorbancji ATR-FTIR tkanek kości zatopionych w parafinie wraz z odparafinowanymi wykazało brak istotnych zmian w widmie. Fakt ten potwierdza publikacja Meksiarun i wsp. [143], w której nie wykazano różnic podczas badania parafinowych tkanek raka płaskonabłonkowego jamy ustnej przy zastosowaniu metod analizy wielowymiarowej jako narzędzia diagnostycznego dla skrawków tkanek zatopionych w parafinie.

Takie podejście (badanie tkanek wraz z parafiną) zastosowano dla próbek MB wraz z jej próbkami kontrolnymi, dodatkowo w celu uniknięcia ewentualnego zafałszowania wyników wycięto pasma pochodzące od parafiny.

Oba podejścia mają swoje wady i zalety. Odparafinowanie w wyniku zastosowanych odczynników jest kosztowne, czasochłonne oraz może potencjalnie wpływać na zmiany lub uszkodzenia struktury chemicznej tkanek, w szczególności samych lipidów [147]. Uważa się, że usuwanie parafiny przez rozpuszczalniki powoduje również wypłukiwanie lipidów z tkanki co prowadzi do późniejszych błędnych wniosków uzyskanych w wyniku analizy pozostałych pasm lipidowych [148]. Dodatkowo ciężko jest określić czy cała analizowana tkanka została w równym stopniu odparafinowana, ponieważ oczywistym jest, że ze względu na niejednorodną strukturę tkanek podczas powstawania tkanek FFPE parafina w różnym stopniu wnikała w poszczególne struktury [144]. Niemniej jednak analiza tkanek FFPE bez odparafinowania a jedynie z wycięciem zakresów przypisanych lipidom pozbawia nas wiedzy na temat jednej z podstawowych grup biochemicznych tworzących tkanki. W ostatnich latach stają się popularne specjalne program komputerowe lub algorytmy które mają za zadanie niwelowanie wpływu parafiny, przykładem może być praca Luz F. Sua at al. [149]. Autorzy przedstawiają budowę programu Pat-Scan który umożliwia identyfikację i oznaczenie ilościowe prątków w zatopionych w parafinie tkankach barwionych metodą Ziehl-Neelsena, oferując tym samym powtarzalną metodę diagnostyczną.

Autorka pragnie zwrócić uwagę na fakt, iż najważniejszym aspektem podczas wyboru metodyki analizy tkanek FFPE jest fakt aby zastosować tą samą metodę dla poszczególnych grup w jednym badaniu tj. grupy kontrolnej oraz badanej. Tylko takie podejście sprawi, że uzyskane wyniki będą spójne. Opinię, że zatapianie tkanek w parafinie wpływa na skład molekularny próbki, ale nie powoduje zmniejszenia zawartości informacji, o ile wszystkie próbki są przetwarzane w podobny sposób, podzielają inni autorzy, a także wyniki uzyskane w innych badaniach [150-154].

W związku z powyższymi aspektami dotyczącymi parafiny w pracy celowo wykonano badanie tkanek MB wraz z parafiną oraz drugie badanie tkanek ES bez parafiny (po wykonaniu odparafinowania).

Ograniczenia/limitations

Mała liczebność grupy badanej zarówno w przypadku MB jak i ES, co wynika z epidemiologii tych nowotworów oraz dużą trudnością pozyskania materiału biologicznego do badań naukowych. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj grupa kontrolna dla medulloblastomy która jest materiałem wręcz unikatowym (niezmieniona morfologicznie tkanka mózgu pobrana od żywych pacjentów operowanych z innych przyczyn). Również należy zwrócić uwagę na małą grupę badaną pacjentów z mięsakiem Ewinga, co wynika z faktu iż w Polsce występuje 20-25 nowych zachorowań na ten nowotwór w ciągu roku.

Pomimo tych ograniczeń wyniki badań eksperymentalnych otrzymanych z wykorzystaniem spektroskopii Ramana oraz spektroskopii IR, zaprezentowane w niniejszej rozprawie potwierdzają potencjalną użyteczność metod spektroskopowych w identyfikacji i biochemicznej charakterystyce zmian nowotworowych opisanych powyżej jednostek chorobowych.

Rozdział 7.

Wnioski

Szczegółowe wnioski wypływające z przeprowadzonych badań są następujące:

1. **Analiza spektralna widm ramanowskich rdzeniaka zarodkowego:**

   - Istnieją różnice fizykochemiczne które mogą być identyfikowane przez spektroskopię Ramana w przypadku porównania: tkanek rdzeniaka zarodkowego w momencie rozpoznania oraz prawidłowej tkanki mózgu.

   - Analiza PCA oraz HCA widm Ramana z pomiarów skrawków histopatologicznych rdzeniaka zarodkowego (MB) w momencie rozpoznania wraz z prawidłową tkanką mózgu pozwala na ich rozróżnienie.

   - Nie wykazano wartości prognostycznej widm Ramana dla MB.

2. **Analiza spektralna widm FTIR rdzeniaka zarodkowego:**

   - Istnieją różnice fizykochemiczne na poziomie biochemicznym między próbkami z tkanki rdzeniaka w momencie rozpoznania a prawidłową tkanką mózgową, które można zidentyfikować za pomocą spektroskopii FTIR.

   - Analiza PCA oraz HCA widm spektroskopowych w podczerwieni z pomiarów skrawków histopatologicznych rdzeniaka zarodkowego (MB) w momencie rozpoznania wraz z prawidłową tkanką mózgu pozwala na ich rozróżnienie.

   - Z przeprowadzonych w niniejszej pracy analiz wynika, iż największe zmiany zachodzą w zakresie kwasów nukleinowych i białek w obszarze daktyloskopowym liczby falowej w obszarze 800-1800 cm^{-1} (tzw. „*fingerprint region*”), które ujawniono w analizie przesunięć pików w widmie.

   - Dodatkowo analiza dynamiki absorbancji w zakres liczby falowej od 1714 cm^{-1} do 1716 cm^{-1} pozwala w 100% na rozróżnienie nienowotworowej tkanki kontrolnej wraz z tkanką MB.

   - Ocena konformacji białek (α-helisy, β-kartki i innych struktur) w prążku amidowym I ukazała istotne różnice w ich ilości dla poszczególnych grup.

   - Analiza zmian fizykochemicznych guza oraz składu biochemicznego w poszczególnych podtypach histologicznych rdzeniaka zarodkowego widm FTIR,

pozwala na powiązanie poszczególnych zmian z obecnością przerzutów (pik 1078 cm^{-1}) lub wznowy (przesunięcie piku 1539 cm^{-1}) u pacjentów.

- Uczenie maszynowe ML wykorzystując algorytm drzewa decyzji C5.0 wykonane na poszczególnych pomiarach uzyskanych dla tkanek MB w porównaniu z tkankami kontrolnymi ukazało perfekcyjną klasyfikację/rozróżnienie z dokładnością na poziomie 97,99% dla wartości absorbancji 7 liczb falowych tj.: 800 cm^{-1}, 1150 cm^{-1}, 1698 cm^{-1}, 2930 cm^{-1}, 3220 cm^{-1}, 3476 cm^{-1}, 3500 cm^{-1}.
- Nie wykazano wartości prognostycznej widm FTIR dla MB.

3. Analiza spektralna widm FTIR mięska Ewinga:

- Istnieją różnice fizykochemiczne które mogą być identyfikowane przez spektroskopię w podczerwieni w przypadku: guza mięsaka Ewinga (ES) w momencie rozpoznania oraz po zakończeniu chemioterapii neoadjuwantowej, a także prawidłowej tkanki kostnej z bezpośredniego sąsiedztwa nowotworu.
- Porównanie widm spektroskopowych w podczerwieni z pomiarów skrawków histopatologicznych guza mięsaka Ewinga w momencie rozpoznania oraz po zakończeniu chemioterapii neoadjuwantowej, a także prawidłowej tkanki kostnej z bezpośredniego sąsiedztwa nowotworu daje informacje na temat zmian konformacji białka.
- Zastosowanie metod chemometrycznych tj. analizy PCA dla widm FTIR mięsaka Ewinga pozwoliło zaś na wskazanie częstości pasm odpowiadających DNA i RNA różnicujących komórki prawidłowe od zmienionych nowotworowo.
- Identyfikacja charakterystycznych pasm w widmach tkanek spektroskopowych (w szczególności zakres od 1024 cm^{-1} do 1041 cm^{-1}) pozwala na wstępną predykcję występowania progresji choroby u pacjentów.

Reasumując, na podstawie uzyskanych w niniejszej pracy wyników, potwierdzono przydatność spektroskopii wibracyjnej jako testu diagnostycznego zarówno w MB jak i w ES. Dodatkowo wykazano dużą wartość prognostyczną spektroskopii FTIR w ES. Uzasadnia to kontynuację dalszych badań w tym zakresie, zwłaszcza, że analizowane grupy pacjentów nie były liczne. Dlatego konieczne jest potwierdzanie uzyskanych wyników na większych grupach pacjentów. W przypadku pozytywnej weryfikacji spektroskopia FTIR i Ramana mogłyby się stać uznanymi metodami diagnostycznymi w tych nowotworach.

Streszczenie

Nowotwory u dzieci występują relatywnie rzadko (ok. 1% wszystkich zachorowań na nowotwory), a ich patogeneza i histopatologia jest odmienna w stosunku do nowotworów u ludzi starszych. W Europie stwierdza się każdego roku ok. 15 000 nowych przypadków nowotworów złośliwych wśród dzieci od 0 do 14. roku życia oraz 20 000 zachorowań wśród młodzieży i młodych osób w przedziale wiekowym 15-24 lata. W Polsce obserwuje się około 1200-1300 zachorowań rocznie na chorobę nowotworową wśród dzieci.

Charakterystyczną cechą większości nowotworów u dzieci, w przeciwieństwie do dorosłych, jest ich szybki wzrost oraz krótki czas do momentu, w którym są zdolne do przerzutowania. Opóźnione rozpoznanie choroby nowotworowej może się wiązać z gorszym rokowaniem, a nawet z zagrożeniem życia. Dlatego tak istotne jest poszukiwanie nowych skutecznych, obiektywnych, tanich oraz szybkich metod diagnostycznych.

Spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) oraz spektroskopia Ramana są fizykochemicznymi, nieinwazyjnymi, czułymi i powtarzalnymi metodami, które dostarczają istotnych informacji na temat zmian w strukturze molekularnej. Uzyskane widma są sumą częstotliwości wielu obecnych biomolekuł, co pozwala ujawnić m.in. istotne zmiany biochemiczne, jakie zaszły w tkance nowotworowej oraz w płynach ustrojowych na skutek zmienionego metabolizmu komórek zdrowych i nowotworowych. Szczególne znaczenie w diagnostyce tkanek ma obszar widma w tzw. zakresie daktyloskopowym liczby falowej (tzw. „*fingerprint region*"), który dotyczy najczęściej zakresu 800-1800 cm^{-1}, co odpowiada m.in. sygnałowi z ważnych biomolekuł przypisanych do białek oraz kwasów nukleinowych. Daje to potencjalną możliwość odróżnienia tkanek zdrowych od nowotworowych oraz wczesnego wykrycia nowotworu jeszcze przed ujawnieniem się zmian w mikroskopie świetlnym. Uzyskane widmo i jego zmiany mogą zostać także potencjalnie wykorzystane do monitorowania przebiegu choroby oraz jako marker prognostyczny do stratyfikacji leczenia onkologicznego.

Celem niniejszego badania była próba wykorzystania uzyskanych widm spektroskopowych jako potencjalnego narzędzia diagnostycznego oraz jako markera prognostycznego dla: mięsaka Ewinga (ES) oraz rdzeniaka zarodkowego- medulloblastoma (MB) u dzieci.

W pierwszych rozdziałach pracy dokonano przeglądu literatury naukowej dotyczącej dotychczasowego zastosowania spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii Ramanowskiej w onkologii oraz podano charakterystykę, badanych nowotworów

drobnookrągłokomórkowych u dzieci. Następnie omówiono metodykę badań oraz charakterystykę badanej populacji wraz z danymi medycznymi. W kolejnych rozdziałach przedstawiono wyniki badań pomiarów spektralnych widm mięska Ewinga oraz rdzeniaka zarodkowego, wykonano analizę pasm składowych regionu drgań grup funkcyjnych należących do amidu I-rzędowego i określono strukturę drugorzędową białka. Dodatkowo dla uzyskanych widm MB oraz grupy kontrolnej wykonano analizę dynamiki absorbancji oraz uczenie maszynowe (ML). W kolejnej części pracy przedstawiono dyskusję oraz wnioski z uzyskanych badań.

Reasumując, na podstawie uzyskanych w niniejszej pracy wyników, potwierdzono przydatność spektroskopii wibracyjnej jako testu diagnostycznego zarówno w MB jak i w ES. Dodatkowo wykazano dużą wartość prognostyczną spektroskopii FTIR w ES. Uzasadnia to kontynuację dalszych badań w tym zakresie, zwłaszcza, że analizowane grupy pacjentów nie były liczne. Dlatego konieczne jest potwierdzanie uzyskanych wyników na większych grupach pacjentów. W przypadku pozytywnej weryfikacji spektroskopia FTIR i Ramana mogłyby się stać uznanymi metodami diagnostycznymi w tych nowotworach.

Abstract

Cancers in children are relatively rare (approx. 1% of all cancer cases), and their pathogenesis and histopathology are different from cancers in the elderly. In Europe, approximately 15,000 new cases of cancer are diagnosed each year among children from 0 to 14 years of age and 20,000 cases among adolescents and young people aged 15-24. In Poland, there are about 1200-1300 cases of cancer among children per year.

A characteristic feature of most childhood cancers, in contrast to adults, is their rapid growth and short time to the point when they are able to metastasize. Delayed diagnosis of cancer may be associated with a worse prognosis and even life-threatening. That is why it is so important to search for new effective, objective, cheap and quick diagnostic methods.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy are physicochemical, non-invasive, sensitive and reproducible methods that provide important information on changes in molecular structure. The obtained spectra are the sum of the frequencies of many present biomolecules, which reveals, among others, significant biochemical changes that have occurred in neoplastic tissue and body fluids as a result of altered metabolism of healthy and cancerous cells. Of particular importance in tissue diagnostics is the spectral region in the so-called in the fingerprint range of the wavenumber (the so-called "fingerprint region"), which most often concerns the range of 800-1800 cm^{-1}, which corresponds to, among others, signal from important biomolecules assigned to proteins and nucleic acids. This gives a potential opportunity to distinguish between healthy and cancerous tissues and to detect cancer early, even before the changes appear in the light microscope. The obtained spectrum and its changes can also be potentially used to monitor the course of the disease and as a prognostic marker for the stratification of oncological treatment.

The aim of this study was an attempt to use the obtained spectroscopic spectra as a potential diagnostic tool and as a prognostic marker for: Ewing's sarcoma (ES) and medulloblastoma (MB) in children.

In the first chapters of the work, the scientific literature on the current application of infrared spectroscopy and Raman spectroscopy in oncology was reviewed, and the characteristics of small round cell tumors in children were given. Then, the research methodology and the characteristics of the study population together with medical data were discussed. In the following chapters, the results of spectral measurements of Ewing's flesh and medulloblastoma spectra were presented, an analysis of the component bands of the region of

vibration of functional groups belonging to the primary amide was performed, and the secondary structure of the protein was determined. In addition, for the obtained MB spectra and the control group, an analysis of absorbance dynamics and machine learning (ML) were performed. The next part of the paper presents a discussion and conclusions from the obtained research.

Summing up, on the basis of the results obtained in this work, the usefulness of vibrational spectroscopy as a diagnostic test in both MB and ES was confirmed. Additionally, the high prognostic value of FTIR spectroscopy in ES has been demonstrated. This justifies the continuation of further research in this area, especially since the analyzed groups of patients were not numerous. Therefore, it is necessary to confirm the obtained results in larger groups of patients. In the case of positive verification, FTIR and Raman spectroscopy could become recognized diagnostic methods in these cancers.

Spis tabel:

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów. Czas obserwacji liczono od daty operacji do ostatniego badania kontrolnego.

Tabela 2. Charakterystyka pacjentów. Czas obserwacji liczono od daty operacji do ostatniego badania kontrolnego.

Tabela 3. Widma FTIR średniej grupy kontrolnej oraz średniej złośliwej tkanki nowotworowej mózgu - rdzeniaka. Zakres pomiarowy 800-3500 cm^{-1}.

Tabela 4. Częstotliwości drgań pików i ich przypisania w różnych podtypach histologicznych w widmach FTIR.

Tabela 5. Przypisanie pozycji pasma amidu I do struktury drugorzędowej białka [cm^{-1}].

Tabela 6. Skład procentowej struktury drugorzędowej białka w każdym podtypie histologicznym, według względnej powierzchni pasm składowych.

Tabela 7. Regiony liczb falowych, które mogą być wykorzystane jako potencjalne markery do rozróżniania pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym na podstawie widma FTIR. Kolumny od 2 do 5 pokazują odpowiednie prawdopodobieństwa dyskryminacji.

Tabela 8. Wartość dynamiki absorpcji [a.u.] dla próbek MB oraz poszczególnych podtypów histologicznych w zakresach, dla których prawdopodobieństwo dyskryminacji > 80%.

Tabela 9. Schemat tablicy decyzji dla ML zawierający dane ze spektrometrii FTIR.

Tabela 10. Przedstawienie uzyskanych wyników klasyfikacji metodą 10-CV dla obu uzyskanych zbiorów. Zastosowane algorytmy: drzewa decyzji (C5.0), las losowy (RF) oraz k najbliższych sąsiadów (kNN). Parametry oceny jakości modeli: accuracy, sensitivity, specificity, precision, f1 i mcc.

Tabela 11. Piki uzyskane z średnich widm FT-IR w zakresie pomiaru 800-1800 cm^{-1} dla próbek od pacjentów u których odnotowano wystąpienie przerzutów oraz tkanek pacjentów u których nie wystąpiły przerzuty.

Tabela 12. Obecność piku w zakresie widmowym od 1056-1079 cm^{-1} widm FTIR dla: tkanek pacjentów MB u których wystąpiły przerzuty, tkanek pacjentów MB u których nie wystąpiły przerzuty oraz dla całości MB.

Tabela 13. Piki uzyskane z średnich widm FT-IR w zakresie pomiaru 800-1800 cm^{-1} dla pacjentów z MB u których nie odnotowano wznowy oraz tkanek pacjentów u których wystąpiła wznowa. Zakres pomiaru 1500-1700 cm^{-1}.

Tabela 14. Obecność piku w zakresie widmowym od 1535-1540 cm^{-1} widm FTIR dla: tkanek pacjentów MB u których wystąpiła wznowa, tkanek pacjentów MB u których nie odnotowano wznowy oraz dla całości analizowanej grupy.

Tabela 15. Widma Ramana średniej grupy kontrolnej oraz średniej złośliwej tkanki nowotworowej mózgu - rdzeniaka. Zakres pomiarowy 800-3500 cm-1.

Tabela 16. Częstotliwości drgań pików i ich przypisania w różnych podtypach histologicznych w widmach ramanowskich

Tabela 17. Obszary przesunięć Ramana, które mogą być wykorzystane jako potencjalne markery do rozróżniania pacjentów z nawrotem i bez nawrotu na podstawie widm Ramana.

Tabela 18. Obszary przesunięć Ramana, które mogą być wykorzystane jako potencjalne markery do rozróżniania pacjentów z przerzutami od pacjentów bez przerzutów na podstawie widm Ramana.

Tabela 19. Częstotliwości drgań pików wraz z ich przypisami dla: Tp - prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, Tn - tkanki nowotworowej przed leczeniem, Tl - tkanki nowotworowej po leczeniu.

Tabela 20. Częstotliwości drgań dla piku w zakresie widmowym od 1000-1100 cm^{-1}: Tp - prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, Tn - tkanki nowotworowej przed leczeniem, Tl - tkanki nowotworowej po leczeniu/chemioterapii indukcyjnej. ↑ - odnotowany wzrost do wyższych liczb falowych, ↓ - odnotowany spadek do niższych liczb falowych.

Tabela 21. Przypisanie pozycji pasma amidu I do struktury drugorzędowej białka [cm^{-1}].

Tabela 22. Skład procentowej struktury drugorzędowej białka według względnej powierzchni pasm składowych dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu, tkanki nowotworowej przed leczeniem, tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej, jak i dla próbek pacjentów bez wznowy oraz tkanek pobranych od pacjentów u których odnotowano wznowę.

Spis wykresów:

Wykres 1. Widma FTIR średniej złośliwej tkanki nowotworowej mózgu - rdzeniaka (czarny) i średniej grupy kontrolnej (czerwony). Zakres pomiarowy 800-3500 cm^{-1} .

Wykres 2. Średnie widma spektroskopii FTIR dla MB podtypu: 1- klasycznego (kolor zielony), 2- desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), 3- anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Zakres pomiarowy 800-3500 cm^{-1}.

Wykres 3. Dopasowanie krzywej pasma amidu I dla kontroli i rdzeniaka zarodkowego w trzech podtypach histologicznych: klasycznym, desmoplastycznym/guzkowym i anaplastycznym/ duże komórki.

Wykres 4. Procentowy skład struktury drugorzędowej białka dla kontroli i rdzeniaka zarodkowego w różnych podtypach histologicznych: klasycznym, desmoplastycznym/ guzkowym i anaplastycznym/ duże komórki.

Wykres 5. Analiza PCA widm ATR-FTIR dla MB podtypu: klasycznego (kolor zielony), desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Wykres dla średnich próbek z ujętymi różnicami w składzie biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*". Analizę przeprowadzono na drugiej pochodnej widma.

Wykres 6. Analiza HCA widm ATR-FTIR dla grupy kontrolnej (kolor czerwony) oraz MB podtypu: anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski), klasycznego (kolor zielony), desmoplastycznego/ guzkowego (kolor czarny). Wykres dla średnich próbek z ujętymi różnicami w składzie biochemicznym przedstawiony w obszarze „fingerprint region". Analizę przeprowadzono na drugiej pochodnej widma.

Wykres 7. Analiza PCA poszczególnych widm spektroskopii ATR-FTIR grupy kontrolnej (kolor czerwony) oraz podtypu desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny). Dwuwymiarowy (2D) wykres wyników dla próbek z różnicami w składnikach biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*". Analizie poddano każdy indywidualny pomiar.

Wykres 8. Wykres obciążeń PC1 dla PCA z Wykresu 7. Analizy przeprowadzono na widmach ATR FTIR drugiej pochodnej w obszarze „*fingerprint region*".

Wykres 9. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) ze spektroskopii ATR-FTIR drugiej pochodnej widma kontrolnego (kolor czerwony) i podtypu desmoplastycznego/guzkowatego MB (kolor czarny). Przeanalizowano każdy indywidualny pomiar.

Wykres 10. Graficzne przedstawienie różnic w dynamice absorpcji pomiędzy pacjentami z rdzeniakiem zarodkowym a grupą kontrolną w obszarze 800-1800 cm^{-1} liczby falowej (uwzględniono resekcję lipidów w zakresie 1350-1500 cm^{-1}). Czerwone linie przedstawiają widma pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym, zielona to średnia dla grupy kontrolnej, a niebieskie pionowe słupki przedstawiają zsumowaną, znormalizowaną różnicę w dynamice absorbancji między pacjentami z rdzeniakiem zarodkowym a grupą kontrolną.

Wykres 11. Analiza różnicy tempa zmian absorpcji pomiędzy widem referencyjnym oraz pacjentami z: K- grupy kontrolnej, 1- podtypu klasycznego, 2- podtypu desmoplastycznego/guzkowego, 3- podtypu anaplastycznego/duże komórki. Zakres analizy 1714-1718 cm^{-1}.

Wykres 12. Przedstawienie graficzne uzyskanych wyników klasyfikacji metodą 10-CV dla obu uzyskanych zbiorów. Zastosowane algorytmy: drzewa decyzji (C5.0), las losowy (RF) oraz k najbliższych sąsiadów (kNN). Parametry oceny jakości modeli: accuracy, sensitivity, specificity, precision, f1 i mcc.

Wykres 13. Drzewo decyzji uzyskane dla algorytmu C5.0 zbudowane na podstawie całej bazy, gdzie zobrazowano perfekcyjną klasyfikację pomiędzy P (tkanka MB) i N (tkanka kontrolna) dla absorbancji 7 liczb falowych.

Wykres 14. Średnie widma FT-IR w zakresie pomiaru 990-1140 cm^{-1} dla próbek od pacjentów u których odnotowano wystąpienie przerzutów (kolor zielony) oraz tkanek pacjentów u których nie wystąpiły przerzuty (kolor niebieski).

Wykres 15. Procentowe zestawienie obecność piku w zakresie widmowym od 1056-1079 cm^{-1} widm FTIR dla: tkanek pacjentów MB u których wystąpiły przerzuty, tkanek pacjentów MB u których nie wystąpiły przerzuty oraz dla całości MB.

Wykres 16. Analiza PCA widm ATR-FTIR dla grupy kontrolnej (kolor czerwony), pacjentów MB z odnotowaną obecnością z przerzutów (kolor zielony) oraz pacjentów MB u których nie wystąpiły przerzuty (kolor niebieski). Wykres przedstawia uśrednione pomiary dla każdego poszczególnego pacjenta w zakresie „*fingerprint region*". Analizę przeprowadzono na drugiej pochodnej widma.

Wykres 17. Średnie widma FT-IR piku pochodzącego od amidu II dla próbek od pacjentów u których wystąpiła wznowa (kolor czerwony) oraz tkanek pacjentów u których nie odnotowano wznowy (kolor czarny). Zakres pomiaru 1500-1700 cm^{-1}.

Wykres 18. Procentowe zestawienie obecność piku w zakresie widmowym od 1535-1540 cm^{-1} widm FTIR dla: tkanek pacjentów MB u których wystąpiła wznowa, tkanek pacjentów MB u których nie odnotowano wznowy oraz dla całości analizowanej grupy.

Wykres 19. Analiza PCA widm ATR-FTIR dla grupy kontrolnej (kolor czerwony), pacjentów MB z odnotowaną wznową (kolor pomarańczowy) oraz pacjentów MB u których nie wystąpiła wznowa (kolor czarny). Wykres przedstawia uśrednione pomiary dla każdego poszczególnego pacjenta w zakresie „*fingerprint region*". Analizę przeprowadzono na drugiej pochodnej widma.

Wykres 20. Widma Ramana średniej złośliwej tkanki nowotworowej mózgu - rdzeniaka zarodkowego (czarny) i średniej grupy kontrolnej (czerwony). Zakres pomiarowy 500-3500 cm^{-1}.

Wykres 21. Średnie widma spektroskopii Ramana dla MB podtypu: 1- klasycznego (kolor zielony), 2- desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), 3- anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Zakres pomiarowy 500-3500 cm^{-1}.

Wykres 22. Wykres 22. Analiza PCA widm ramanowskich dla MB podtypu: klasycznego (kolor zielony), desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Wykres dla średnich próbek z ujętymi różnicami w składzie biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*" 500-1800 cm^{-1} z wyciętymi regionami charakterystycznymi dla lipidów.

Wykres 23. Analiza HCA widm ramanowskich dla MB podtypu: klasycznego (kolor zielony), desmoplastycznego/guzkowego (kolor czarny), anaplastycznego/duże komórki (kolor niebieski) oraz grupy kontrolnej (kolor czerwony). Wykres dla średnich próbek z ujętymi różnicami w składzie biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*" 500-1800 cm^{-1} z wyciętymi regionami charakterystycznymi dla lipidów.

Wykres 24. Analiza PCA widm spektroskopii ramanowskiej grupy pacjentów bez przerzutów (kolor zielony) oraz pacjentów z przerzutami (kolor pomarańczowy). Dwuwymiarowy (2D) wykres wyników dla próbek z różnicami w składnikach biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*" z wyciętym rejonem lipidowym. Analizie poddano próbki od każdego indywidualnego pacjenta.

Wykres 25. Analiza PCA widm spektroskopii ramanowskiej grupy pacjentów u których odnotowano wznowę (kolor różowy) oraz pacjentów bez wznowy (kolor zielony). Dwuwymiarowy (2D) wykres wyników dla próbek z różnicami w składnikach biochemicznym przedstawiony w obszarze „*fingerprint region*" z wyciętym rejonem lipidowym. Analizie poddano próbki od każdego indywidualnego pacjenta.

Wykres 26. Graficzna prezentacja różnic w dynamice intensywności widm Ramana pomiędzy pacjentami bez wznowy i z wznową w zakresie 500-1800 cm^{-1} liczb falowych. Czerwona linia przedstawia średnie widmo dla pacjentów ze wznową, zielona średnia dla pacjentów bez wznowy, a niebieskie słupki reprezentują znormalizowaną różnicę w dynamice między tymi dwiema grupami.

Wykres 27. Graficzna prezentacja różnic w dynamice intensywności widm Ramana pomiędzy pacjentami z przerzutami oraz bez przerzutów w zakresie 500-1800 cm^{-1} liczby falowej. Czerwona linia przedstawia średnie spektrum dla pacjentów z przerzutami, zielona ilustruje średnie widmo dla pacjentów bez przerzutów, a niebieskie słupki reprezentują znormalizowaną różnicę w dynamice między tymi dwiema grupami.

Wykres 28. Średnie widma spektroskopii FTIR dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (kolor czerwony), tkanki nowotworowej przed leczeniem (kolor niebieski), tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (kolor zielony). Zakres pomiaru 800-3500 cm^{-1}.

Wykres 29. Średnie widma FT-IR biopsji (Tn) mięsaka Ewinga dla piku w zakresie widmowym od 950-1100 cm^{-1}: pacjentów bez wznowy (kolor niebieski) oraz pacjentów ze wznową/progresją (kolor czerwony).

Wykres 30. Średnie widma FT-IR tkanek po zastosowanym leczeniu (Tl) mięsaka Ewinga dla piku w zakresie widmowym od 950-1250 cm^{-1}: dla pacjentów pozostających w remisji (kolor niebieski) oraz pacjentów u których wystąpił zgon (kolor czerwony).

Wykres 31. Krzywe Kaplana-Meiera porównujące czas przeżycia wolny od progresji choroby (PFS) (**a–d**) i całkowite przeżycie (OS) (**e–h**) u pacjentów zgodnie z położeniem maksimum piku absorbancji w zakresie 950 - 1100 cm^{-1} liczby falowej: dla próbek guza mięsaka Ewinga (Tn) oraz przesunięcia pików wyrażone jako różnice Tn − Tp (Tp – liczba falowa dla prawidłowej tkanki kostnej); Tl − Tn (Tl - liczba falowa dla guza po leczeniu). (**b**) i (**f**) Tn ≥ 1027 cm^{-1} (niebieski) vs <1027 cm^{-1} (czerwony); (**c**) i (**g**) Tl − Tn ≥ +1 cm^{-1} (czerwony) vs Tl − Tn < +1 cm^{-1} (niebieski) (**d**) i (**h**) Tn − Tp < −1 cm^{-1} (czerwony) vs Tn −Tp > = −1 cm^{-1} (niebieski).

Wykres 32. Dopasowanie krzywej pasma amidu I dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (Tp), tkanki nowotworowej przed leczeniem (Tn), tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (Tl). Zakres dopasowania 1600-1700 cm^{-1}.

Wykres 33. Dopasowanie krzywej pasma amidu I dla próbek pacjentów bez wznowy oraz tkanek pobranych od pacjentów, u których odnotowano wznowę. Zakres dopasowania 1600-1700 cm^{-1}.

Wykres 34. Procentowy skład struktury drugorzędowej białka dla prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (Tp), tkanki nowotworowej przed leczeniem (Tn), tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (Tl), jak i dla próbek pacjentów bez wznowy oraz tkanek pobranych od pacjentów u których odnotowano wznowę.

Wykres 35. Wyniki analizy PCA widm spektroskopii ATR-FTIR dla: Tp - prawidłowej tkanki kostnej pobranej w strefie poza obszarem naciekania nowotworu (kolor czerwony), Tn - tkanki nowotworowej przed leczeniem (kolor niebieski), Tl - tkanki nowotworowej po chemioterapii indukcyjnej (kolor zielony). Zakres analizy 800-1800 cm^{-1} „*fingerprint region*".

Wykres 36. Wykres obciążeń PC4 dla PCA z Wykresu 35. Analizy przeprowadzono na widmach ATR FTIR drugiej pochodnej w obszarze „*fingerprint region*".

Bibliografia:

1. Perek D. Biologia nowotworów dziecięcych. W: Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej. Pod red. Kowalczyk JR. Centrum medyczne kształcenia podyplomowego. Warszawa, 2011. Str. 21.

2. Małdyk D. Patologia i systemy kwalifikacyjne nowotworów. W: Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej. Pod red. Kowalczyk JR. Centrum medyczne kształcenia podyplomowego. Warszawa, 2011. Str. 65.

3. Wojciechowska U, Barańska K, Michałek I, Olasek P, Miklewska M, Didkowska JA. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku. Raport roczny. Krajowy Rejestr Nowotworów. Warszawa, 2022.

4. Kowalczyk JR. Etiopatogeneza chorób nowotworowych u dzieci. W: Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej. Pod red. Kowalczyk JR. Centrum medyczne kształcenia podyplomowego. Warszawa, 2011. Str. 13-18.

5. Kowalczyk JR. Epidemiologia nowotworów dziecięcych. W: Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej. Pod red. Kowalczyk JR. Centrum medyczne kształcenia podyplomowego. Warszawa, 2011. Str. 7-8.

6. Perek D. Diagnostyka kliniczna chorób nowotworowych u dzieci. W: Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej. Pod red. Kowalczyk JR. Centrum medyczne kształcenia podyplomowego. Warszawa, 2011. Str. 51.

7. Peng W, Chen S, Kong D, Zhou X, Lu X, Chang C. Grade diagnosis of human glioma using Fourier transform infrared microscopy and artificial neural network. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. (2021) 260:119946.

8. National Cancer Insitute. An official website of the United States government. https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/prognosis/tumor-grade-fact-sheet

9. Depciuch J, Kaznowska E, Szmuc K, Zawlik I, Cholewa M, Heraud P, Cebulski J. Comparing paraffined and deparaffinized breast cancer tissue samples and an analysis of Raman spectroscopy and infrared methods. Infrared Physics & Technology (2016) 76:217-226.

10. Miller LM, Dumas P. Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light. Biochim Biophys Acta. (2006) 1758(7):846-57.

11. Matthäus C, Bird B, Miljković M, Chernenko T, Romeo M, Diem M. Chapter 10: Infrared and Raman microscopy in cell biology. Methods Cell Biol. (2008) 89:275-308.

12. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. Am J Cancer Res. (2012) 2(1):1-21.

13. Sloan-Dennison S, Laing S, Graham D, Faulds K. From Raman to SESORRS: moving deeper into cancer detection and treatment monitoring. Chem Commun (Camb). (2021) 57(93):12436-12451.

14. Ślósarek G. Biofizyka molekularna. Zjawiska. Instrumenty, Modelowanie. PWN. Warszawa, 2011.Str. 435.

15. Ślósarek G. Biofizyka molekularna. Zjawiska. Instrumenty, Modelowanie. PWN. Warszawa, 2011.Str. 434.

16. Leng H, Chen C, Chen C, Chen F, Du Z, Chen J, Yang B, Zuo E, Xiao M, Lv X, Liu P. Raman spectroscopy and FTIR spectroscopy fusion technology combined with deep learning: A novel cancer prediction method. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. (2023) 285:121839.

17. Małek K, Staniszewska-Ślęzak E, Kochan K, Majzner K. Podstawy spektroskopii absorpcyjnej w zakresie podczerwieni (FT-IR). W: Spektroskopia oscyklacyjna. Od teorii do praktyki. Pod red. Małek K. PWN. Warszawa, 2016. Str. 11-29.

18. Chophi R, Sharma S, Jossan JK, Singh R. Rapid and non-destructive analysis of eye-cosmetics using ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics. Forensic Sci Int. (2021) 329:111062.

19. Yang X, Wei X, Yu K, Wan C, Wang Y, Huang S, Sun Q, Huang J. Identification of myocardial fibrosis by ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. (2022) 264:120238.

20. Dodo K, Fujita K, Sodeoka M. Raman Spectroscopy for Chemical Biology Research. J Am Chem Soc. (2022) 144(43):19651-19667.

21. Qu C, Li Y, Du S, Geng Y, Su M, Liu H. Raman spectroscopy for rapid fingerprint analysis of meat quality and security: Principles, progress and prospects. Food Res Int. (2022) 161:111805.

22. Ślósarek G. Biofizyka molekularna. Zjawiska. Instrumenty, Modelowanie. PWN. Warszawa, 2011.Str. 437.

23. Hashimoto K, Badarla VR, Kawai A, Ideguchi T. Complementary vibrational spectroscopy. Nat Commun. (2019) 10(1):4411.

24. Quintás G, Wood BR, Byrne HJ, Perez-Guaita D. Multiplexed Fourier Transform Infrared and Raman Imaging. Methods Mol Biol. (2021) 2350:299-312.

25. Marzec KM, Rygula A, Gasior-Glogowska M, Kochan K, Czamara K, Bulat K, Malek K, Kaczor A, Baranska M. Vascular diseases investigated ex vivo by using Raman, FT-IR and complementary methods. Pharmacol Rep. (2015) 67(4):744-50.

26. McEachron TA, Helman LJ. Recent Advances in Pediatric Cancer Research. Cancer Res. (2021) 81(23):5783-5799.

27. Pelland-Marcotte MC, Xie L, Barber R, Elkhalifa S, Frechette M, Kaur J, Onysko J, Bouffet E, Fernandez CV, Mitchell D, Rayar M, Randall A, Stammers D, Larouche V, Airhart A, Fidler-Benaoudia M, Cohen-Gogo S, Sung L, Gibson P. Incidence of childhood cancer in Canada during the COVID-19 pandemic. CMAJ. (2021) 193(47):E1798-E1806.

28. Bartlett F, Kortmann R, Saran F. Medulloblastoma. Clin Oncol (R Coll Radiol). (2013) 25(1):36-45.

29. Krajowy Rejestr Nowotworów. http://onkologia.org.pl/nowotwory-dzieci-nowotwory-osrodkowego-ukladu-nerwowego/

30. Archer TC, Mahoney EL, Pomeroy SL. Medulloblastoma: Molecular Classification-Based Personal Therapeutics. Neurotherapeutics. (2017) 14(2):265-273.

31. Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, Rutkowski S, Ellison DW, Malkin D, Taylor MD, Gajjar A, Pfister SM. Medulloblastoma. Nat Rev Dis Primers. (2019) 5(1):11.

32. Kanemura Y. Medulloblastoma. No Shinkei Geka. (2022) 50(1):73-90.

33. Quinlan A, Rizzolo D. Understanding medulloblastoma. JAAPA. (2017) 30(10):30-36.

34. Menyhárt O, Győrffy B. Molecular stratifications, biomarker candidates and new therapeutic options in current medulloblastoma treatment approaches. Cancer Metastasis Rev. (2020) 39(1):211-233.

35. Chen J, Wu SZ, Tan J, Zhang QY, Qin BQ, Wang Y, Zhang H. Primary Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors in the cranial bone and mobile spine: what is the difference? BMC Surg. (2022) 22(1):4.

36. Spector LG, Hubbard AK, Diessner BJ, Machiela MJ, Webber BR, Schiffman JD. Comparative international incidence of Ewing sarcoma 1988 to 2012. Int J Cancer. (2021) 149(5):1054-1066.

37. Weber MA, Papakonstantinou O, Nikodinovska VV, Vanhoenacker FM. Ewing's Sarcoma and Primary Osseous Lymphoma: Spectrum of Imaging Appearances. Semin Musculoskelet Radiol. (2019) 23(1):36-57.

38. Toretsky JA, Kim A. Medscape, Ewing Sarcoma Epidemiology. http://emedicine.medscape.com/article/990378-overview#a6

39. Chaber R, Łach K, Depciuch J, Szmuc K, Michalak E, Raciborska A, Koziorowska A, Cebulski J. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy of paraffin and deparafinnized bone tissue samples as a diagnostic tool for Ewing sarcoma of bones. Infrared Phys Technol. (2017) 85:364-371.

40. Sneppen O, Hansen LM. Presenting symptoms and treatment delay in osteosarcoma and Ewing's sarcoma. Acta Radiol Oncol. (1984) 23(2-3):159-62.

41. Chaber R, Arthur CJ, Depciuch J, Łach K, Raciborska A, Michalak E, Cebulski J. Distinguishing Ewing sarcoma and osteomyelitis using FTIR spectroscopy. Sci Rep. (2018) 8(1):15081.

42. Durer S, Shaikh H. Ewing Sarcoma. 2022 Mar 7. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. (2023) PMID: 32644609.

43. Kazanowska B, Chybicka A. Nowotwory tkanek miękkich. https://www.sarcoma.pl/pliki/Zasady_leczenia/Miesakitkanekmiekkichmlodzi.pdf

44. Morales E, Olson M, Iglesias F, Luetkens T, Atanackovic D. Targeting the tumor microenvironment of Ewing sarcoma. Immunotherapy. (2021) 13(17):1439-1451.

45. Eaton BR, Claude L, Indelicato DJ, Vatner R, Yeh B, Schwarz R, Laack N. Ewing sarcoma. Pediatr Blood Cancer. (2021) 68 Suppl 2:e28355.

46. Gartrell J, Rodriguez-Galindo C. Ewing sarcoma: investigational mono- and combination therapies in clinical trials. Expert Opin Investig Drugs. (2021) 30(6):653-663.

47. Lee ACW, Nathan SS, Chui CH, Lee KS. Treatment of Ewing sarcoma in children: Results from a single centre. Ann Acad Med Singap. (2021) 50(10):785-787.

48. Krumbholz M, Eiblwieser J, Ranft A, Zierk J, Schmidkonz C, Stütz AM, Peneder P, Tomazou EM, Agaimy A, Bäuerle T, Hartmann W, Dirksen U, Metzler M. Quantification of Translocation-Specific ctDNA Provides an Integrating Parameter for Early Assessment of Treatment Response and Risk Stratification in Ewing Sarcoma. Clin Cancer Res. (2021) 27(21):5922-5930.

49. Program leczenia guzów opracowany przez zespół Kliniki Onkologii Instytutu Centrum Zdrowia Dziecka. https://www.czd.pl/strony/dzialalnosc-kliniczna/kliniki/klinika-onkologii

50. Protokół lecznia Euro-EWING 2008 https://www.gpoh.de/kinderkrebsinfo/content/fachinformationen/studienportal/abgeschlossene_studien_register/ewing_2008/index_ger.html

51. Naumann D. FT-Infrared and FT-Raman Spectroscopy in Biomedical Research: Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials. Appl Spectrosc Rev. (2001) 36(2):239-298.

52. Abdi H, Williams LJ. Principal component analysis. WIREs Comp Stat. (2010) 2:433-459.

53. Hands JR, Dorling KM, Abel P, Ashton KM, Brodbelt A, Davis C, Dawson T, Jenkinson MD, Lea RW, Walker C, Baker MJ. Attenuated total reflection fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectral discrimination of brain tumour severity from serum samples. J Biophotonics. (2014) 7(3-4):189-99.

54. Depciuch J, Tołpa B, Witek P, Szmuc K, Kaznowska E, Osuchowski M, Król P, Cebulski J. Raman and FTIR spectroscopy in determining the chemical changes in healthy brain tissues and glioblastoma tumor tissues. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. (2020) 225:117526.

55. Ali TH, Alhasan A. Detection of human brain tumours via evaluation of their biochemical composition using ATR-FTIR spectroscopy. Biomed Phys Eng Express. (2019) 6(1):015014.

56. Hands JR, Clemens G, Stables R, Ashton K, Brodbelt A, Davis C, Dawson TP, Jenkinson MD, Lea RW, Walker C, Baker MJ. Brain tumour differentiation: rapid stratified serum diagnostics via attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. J Neurooncol. (2016) 127(3):463-72.

57. Polis B, Imiela A, Polis L, Abramczyk H. Raman spectroscopy for medulloblastoma. Childs Nerv Syst. (2018) 34(12):2425-2430.

58. Ganim Z, Chung HS, Smith AW, Deflores LP, Jones KC, Tokmakoff A. Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of proteins. Acc Chem Res. (2008) 41(3):432-41.

59. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). (2007) 39(8):549-59.

60. De Meutter J, Goormaghtigh E. Searching for a Better Match between Protein Secondary Structure Definitions and Protein FTIR Spectra. Anal Chem. (2021) 93(3):1561-1568.

61. Miller LM, Bourassa MW, Smith RJ. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. Biochim Biophys Acta. (2013) 1828(10):2339-46.

62. Sukumaran S. Protein secondary structure elucidation using FTIR spectroscopy. Thermo Fisher Scientific, USA. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/AN52985-protein-secondary-structure-elucidation-using-ftir-spectroscopy.pdf

63. Łach K, Cebulski J, Chaber R, Kocan B, Wojnarowska-Nowak R, Banaś-Ząbczyk A. First Identification of the Effects of Low Frequency Electromagnetic Field on the Micromolecular Changes in Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. J Med Phys. (2021) 46(4):253-262.

64. Usoltsev D, Sitnikova V, Kajava A, Uspenskaya M. Systematic FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin under Various Denaturation Conditions. Biomolecules. (2019) 12;9(8):359.

65. Wang Y, Boysen RI, Wood BR, Kansiz M, McNaughton D, Hearn MT. Determination of the secondary structure of proteins in different environments by FTIR-ATR spectroscopy and PLS regression. Biopolymers. (2008) 89(11):895-905.

66. Cameron JM, Rinaldi C, Butler HJ, Hegarty MG, Brennan PM, Jenkinson MD, Syed K, Ashton KM, Dawson TP, Palmer DS, Baker MJ. Stratifying Brain Tumour Histological Sub-Types: The Application of ATR-FTIR Serum Spectroscopy in Secondary Care. Cancers (Basel). (2020) 12(7):1710.

67. 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) 26(4):1174.

68. Guleken Z, Jakubczyk P, Wiesław P, Krzysztof P, Bulut H, Öten E, Depciuch J, Tarhan N. Characterization of Covid-19 infected pregnant women sera using laboratory indexes, vibrational spectroscopy, and machine learning classifications. Talanta. (2022) 237:122916.

69. Tyagi G, Jangir DK, Singh P, Mehrotra R. DNA interaction studies of an anticancer plant alkaloid, vincristine, using Fourier transform infrared spectroscopy. DNA Cell Biol. (2010) 29(11):693-9.

70. Kaczor A. Obrazowanie ramanowskie. W: Spektroskopia oscyklacyjna. Od teorii do praktyki. Pod red. Małek K. PWN. Warszawa, 2016. Str. 68-74.

71. Majzner K. Charakterystyka organelli komórkowych na podstawie analizy pasm charakterystycznych oraz analizy skupień. W: Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki. Pod red. Małek K. PWN. Warszawa, 2016. Str. 223-232.

72. Byrne HJ, Bonnier F, Casey A, Maher M, McIntyre J, Efeoglu E, Farhane Z. Advancing Raman microspectroscopy for cellular and subcellular analysis: towards in vitro high-content spectralomic analysis. Appl Opt. (2018) 57(22):E11-E19.

73. Makki AA, Bonnier F, Respaud R, Chtara F, Tfayli A, Tauber C, Bertrand D, Byrne HJ, Mohammed E, Chourpa I. Qualitative and quantitative analysis of therapeutic solutions using Raman and infrared spectroscopy. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. (2019) 218:97-108.

74. Byrne HJ, Lyng FM, Maguire A.Improved protocols for pre-processing Raman spectra of formalin fixed paraffin preserved tissue sections. Anal. Methods. (2017) 9:4709-4717.

75. Gargotti M, Efeoglu E, Byrne HJ, Casey A. Raman spectroscopy detects biochemical changes due to different cell culture environments in live cells in vitro. Anal Bioanal Chem. (2018) 410(28):7537-7550.

76. Krafft C, Codrich D, Pelizzo G, Sergo V. Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study. J Biophotonics. (2008) 1(2):154-69.

77. Delogne C, Lawford PV, Habesch SM, Carolan VA. Characterization of the calcification of cardiac valve bioprostheses by environmental scanning electron microscopy and vibrational spectroscopy. J Microsc. (2007) 228(Pt 1):62-77.

78. Sivakumar S, Khatiwada CP, Sivasubramanian J. Studies the alterations of biochemical and mineral contents in bone tissue of mus musculus due to aluminum toxicity and the protective action of desferrioxamine and deferiprone by FTIR, ICP-OES, SEM and XRD techniques. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. (2014) 126:59-67.

79. Fung MFK, Senterman MK, Mikhael NZ, Lacelle S, Wong PTT. Pressure-tuning fourier transform infrared spectroscopic study of carcinogenesis in human endometrium. Biospectroscopy. (1996) 2: 155-165.

80. Andrus PG, Strickland RD. Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy. Biospectroscopy. (1998) 4(1):37-46.

81. Fujioka N, Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M. Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. Cancer Detect Prev. (2004) 28(1):32-6.

82. Gazi E, Dwyer J, Gardner P, Ghanbari-Siahkali A, Wade AP, Miyan J, Lockyer NP, Vickerman JC, Clarke NW, Shanks JH, Scott LJ, Hart CA, Brown M. Applications of Fourier transform infrared microspectroscopy in studies of benign prostate and prostate cancer. A pilot study. J Pathol. (2003) 201(1):99-108.

83. Wang HP, Wang HC, Huang YJ. Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid. Sci Total Environ. (1997) 204(3):283-7.

84. Mordechai S, Mordechai J, Ramesh J, Levi C, Huleihel M, Erukhimovitch V, Moser A, Kapelushnik, J. Application of FTIR microspectroscopy for the follow-up of childhood leukaemia chemotherapy. Proceedings of SPIE Subsurface and Surface Sensing Technologies and Applications III. (2001) 4491: 243-250.

85. Friess W, Lee G. Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices. Biomaterials. (1996) 17(23):2289-94.

86. Lani A, Kourkoumelis N, Baliouskas G, Tzaphlidou M. The effect of calcium and vitamin D supplementation on osteoporotic rabbit bones studied by vibrational spectroscopy. J Biol Phys. (2014) 40(4):401-12.

87. Neviliappan S, Fang Kan L, Tiang Lee Walter T, Arulkumaran S, Wong PT. Infrared spectral features of exfoliated cervical cells, cervical adenocarcinoma tissue, and an adenocarcinoma cell line (SiSo). Gynecol Oncol. (2002) 85(1):170-4.

88. Andreas J. Determination of Secondary Structure in Proteins by Fourier transforminfrared Spectroscopy. Jena Library of biological macromolecules. http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html

89. Chaber R, Łach K, Szmuc K, Michalak E, Raciborska A, Mazur D, Machaczka M, Cebulski J. Application of Infrared Spectroscopy In the Indentification of Ewing Sarcoma: A preliminary report. Infrared Physics & Technology (2017) 83:200-205.

90. Cakmak G, Togan I, Uğuz C, Severcan F. FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol. Appl Spectrosc. (2003) 57(7):835-41.

91. Li QB, Sun XJ, Xu YZ, Yang LM, Zhang YF, Weng SF, Shi JS, Wu JG. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy to rapidly diagnose gastric endoscopic biopsies. World J Gastroenterol. (2005) 11(25):3842-5.

92. 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) 38:102785.

93. Sahu R, Mordechai S. Fourier transform infrared spectroscopy in cancer detection. Future Oncol. (2005) 1(5):635-47.

94. Puppels GJ, de Mul FF, Otto C, Greve J, Robert-Nicoud M, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. Nature. (1990) 347(6290):301-3.

95. Webb SJ. Proceedings: Effects of microwaves on normal and tumour cells as seen by laser-raman spectroscopy. J Microw Power. (1976) 11(2):138.

96. Cooper MS, Theimer O. Spectroscopic evidence for strong oscillating and static dielectric polarizations in malignant cells. Physiol Chem Phys. (1980) 12(3):249-54.

97. García-Borrón JC, Saura MD, Solano F, Iborra JL, Lozano JA. FT-IR spectroscopy of natural melanins isolated from Harding-Passey mouse melanoma. Physiol Chem Phys Med NMR. (1985) 17(2):211-8.

98. 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(8):1001-8.

99. Theophanides T, Polissiou M. Magnesium-nucleic acid conformational changes and cancer. Magnesium. (1986) 5(5-6):221-33.

100. Faur CI, Falamas A, Chirila M, Roman RC, Rotaru H, Moldovan MA, Albu S, Baciut M, Robu I, Hedesiu M. Raman spectroscopy in oral cavity and oropharyngeal cancer: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg. (2022) 51(11):1373-1381.

101. 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) 126(8):1125-1139.

102. Haroon M, Tahir M, Nawaz H, Majeed MI, Al-Saadi AA. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy for prostate cancer diagnosis: A review. Photodiagnosis Photodyn Ther. (2022) 37:102690.

103. Kanmalar M, Abdul Sani SF, Kamri NINB, Said NABM, Jamil AHBA, Kuppusamy S, Mun KS, Bradley DA. Raman spectroscopy biochemical characterisation of bladder cancer cisplatin resistance regulated by FDFT1: a review. Cell Mol Biol Lett. (2022) 27(1):9.

104. Cameron D, Talari A, Rehman I, Mitchell P, Parkin E. Detecting colorectal cancer using infrared spectroscopy. Br J Surg. (2022) 109(4):e61-e62.

105. Ke ZY, Ning YJ, Jiang ZF, Zhu YY, Guo J, Fan XY, Zhang YB. The efficacy of Raman spectroscopy in lung cancer diagnosis: the first diagnostic meta-analysis. Lasers Med Sci. (2022) 37(1):425-434.

106. David S, Plante A, Dallaire F, Tremblay JP, Sheehy G, Macdonald E, Forrest L, Daneshmand M, Trudel D, Wilson BC, Hopkins L, Murugkar S, Vanderhyden B, Leblond F. Multispectral label-free Raman spectroscopy can detect ovarian and endometrial cancer with high accuracy. J Biophotonics. (2022) 15(2):e202100198.

107. Shen ZW, Zhang LJ, Shen ZY, Zhang ZF, Xu F, Zhang X, Li R, Xiao Z. Efficacy of Raman Spectroscopy in the Diagnosis of Uterine Cervical Neoplasms: A Meta-Analysis. Front Med (Lausanne). (2022) 9:828346.

108. Liu K, Zhao Q, Li B, Zhao X. Raman Spectroscopy: A Novel Technology for Gastric Cancer Diagnosis. Front Bioeng Biotechnol. (2022) 10:856591.

109. Tiwari S, Falahkheirkhah K, Cheng G, Bhargava R. Colon Cancer Grading Using Infrared Spectroscopic Imaging-Based Deep Learning. Appl Spectrosc. (2022) 76(4):475-484.

110. Liu Z, Parida S, Prasad R, Pandey R, Sharma D, Barman I. Vibrational spectroscopy for decoding cancer microbiota interactions: Current evidence and future perspective. Semin Cancer Biol. (2022) 86(Pt 3):743-752.

111. Tian P, Zhang W, Zhao H, Lei Y, Cui L, Zhang Y, Xu Z. Intraoperative detection of sentinel lymph node metastases in breast carcinoma by Fourier transform infrared spectroscopy. Br J Surg. (2015) 102(11):1372-9.

112. Tian P, Zhang W, Zhao H, Lei Y, Cui L, Wang W, Li Q, Zhu Q, Zhang Y, Xu Z. Intraoperative diagnosis of benign and malignant breast tissues by fourier transform infrared spectroscopy and support vector machine classification. Int J Clin Exp Med. (2015) 8(1):972-81.

113. Gajjar K, Heppenstall LD, Pang W, Ashton KM, Trevisan J, Patel II, Llabjani V, Stringfellow HF, Martin-Hirsch PL, Dawson T, Martin FL. Diagnostic segregation of human brain tumours using Fourier-transform infrared and/or Raman spectroscopy coupled with discriminant analysis. Anal Methods. (2012) 5:89-102.

114. Kołodziej M, Chrabąszcz K, Pięta E, Piergies N, Rudnicka-Czerwiec J, Bartosik-Psujek H, Paluszkiewicz C, Cholewa M, Kwiatek WM. Spectral signature of multiple sclerosis. Preliminary studies of blood fraction by ATR FTIR technique. Biochem Biophys Res Commun. (2022) 593:40-45.

115. Rivero-Hinojosa S, Lau LS, Stampar M, Staal J, Zhang H, Gordish-Dressman H, Northcott PA, Pfister SM, Taylor MD, Brown KJ, Rood BR. Proteomic analysis of Medulloblastoma reveals functional biology with translational potential. Acta Neuropathol Commun. (2018) 6(1):48.

116. Iwamoto FM, Hottinger AF, Karimi S, Riedel E, Dantis J, Jahdi M, Panageas KS, Lassman AB, Abrey LE, Fleisher M, DeAngelis LM, Holland EC, Hormigo A. Serum YKL-40 is a marker of prognosis and disease status in high-grade gliomas. Neuro Oncol. (2011) 13(11):1244-51.

117. Popescu ID, Codrici E, Albulescu L, Mihai S, Enciu AM, Albulescu R, Tanase CP. Potential serum biomarkers for glioblastoma diagnostic assessed by proteomic approaches. Proteome Sci. (2014) 12(1):47.

118. Hormigo A, Gu B, Karimi S, Riedel E, Panageas KS, Edgar MA, Tanwar MK, Rao JS, Fleisher M, DeAngelis LM, Holland EC. YKL-40 and matrix metalloproteinase-9 as potential serum biomarkers for patients with high-grade gliomas. Clin Cancer Res. (2006) 12(19):5698-704.

119. Argov S, Sahu RK, Bernshtain E, Salman A, Shohat G, Zelig U, Mordechai S. Inflammatory bowel diseases as an intermediate stage between normal and cancer: a FTIR-microspectroscopy approach. Biopolymers. (2004) 75(5):384-92.

120. Le Reste PJ, Pilalis E, Aubry M, McMahon M, Cano L, Etcheverry A, Chatziioannou A, Chevet E, Fautrel A. Integration of Raman spectra with transcriptome data in glioblastoma multiforme defines tumour subtypes and predicts patient outcome. J Cell Mol Med. (2021) 25(23):10846-10856.

121. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. Applied Spectroscopy Reviews. (2008) 43(2):134-179.

122. Dovbeshko GI, Gridina NY, Kruglova EB, Pashchuk OP. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. Talanta. 2000 Oct 2;53(1):233-46.

123. Aguiar RP, Silveira L Jr, Falcão ET, Pacheco MT, Zângaro RA, Pasqualucci CA. Discriminating neoplastic and normal brain tissues in vitro through Raman spectroscopy: a principal components analysis classification model. Photomed Laser Surg. (2013) 31(12):595-604.

124. Cillo AR, Mukherjee E, Bailey NG, Onkar S, Daley J, Salgado C, Li X, Liu D, Ranganathan S, Burgess M, Sembrat J, Weiss K, Watters R, Bruno TC, Vignali DAA, Bailey KM. Ewing Sarcoma and Osteosarcoma Have Distinct Immune Signatures and Intercellular Communication Networks. Clin Cancer Res. (2022) 28(22):4968-4982.

125. Gaspar N, Hawkins DS, Dirksen U, Lewis IJ, Ferrari S, Le Deley MC, Kovar H, Grimer R, Whelan J, Claude L, Delattre O, Paulussen M, Picci P, Sundby Hall K, van den Berg H, Ladenstein R, Michon J, Hjorth L, Judson I, Luksch R, Bernstein ML, Marec-Bérard P, Brennan B, Craft AW, Womer RB, Juergens H, Oberlin O. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. J Clin Oncol. (2015) 33(27):3036-46.

126. Specht K, Hartmann W. Ewing sarcomas and Ewing-like sarcomas : New aspects. Pathologe. (2018) 39(2):154-163.

127. Chaber R, Łach K, Arthur CJ, Raciborska A, Michalak E, Ciebiera K, Bilska K, Drabko K, Cebulski J. Prediction of Ewing Sarcoma treatment outcome using attenuated tissue reflection FTIR tissue spectroscopy. Sci Rep. (2018) 8(1):12299.

128. Wald N, Le Corre Y, Martin L, Mathieu V, Goormaghtigh E. Infrared spectra of primary melanomas can predict response to chemotherapy: The example of dacarbazine. Biochim Biophys Acta. (2016) 1862(2):174-81.

129. Zawlik I, Kaznowska E, Cebulski J, Kolodziej M, Depciuch J, Vongsvivut J, Cholewa M. FPA-FTIR Microspectroscopy for Monitoring Chemotherapy Efficacy in Triple-Negative Breast Cancer. Sci Rep. (2016) 6:37333.

130. Tolstorozhev GB, Bel'kov MV, Skornyakov IV, Butra VA. Infrared Spectroscopy in Cancer Diagnosis and Chemotherapy Monitoring. J Appl Spectrosc. (2014) 81(3):463-469.

131. Wong PT, Goldstein SM, Grekin RC, Godwin TA, Pivik C, Rigas B. Distinct infrared spectroscopic patterns of human basal cell carcinoma of the skin. Cancer Res. (1993) 53(4): 762-5.

132. Gok S, Aydin OZ, Sural YS, Zorlu F, Bayol U, Severcan F. Bladder cancer diagnosis from bladder wash by Fourier transform infrared spectroscopy as a novel test for tumor recurrence. J Biophotonics. (2016) 9(9):967-75.

133. Popa CL, Albu M, Barth C, Costescu A, Luculescu C, Trusca R, Anthoe S. Structural Characterization and Optical Properties of Hydroxyapatite/Collagen Matrix. Rom Rep Phys. (2016) 68(3):1149-1158.

134. Yano K, Ohoshima S, Shimizu Y, Moriguchi T, Katayama H. Evaluation of glycogen level in human lung carcinoma tissues by an infrared spectroscopic method. Cancer Lett. (1996) 110(1-2):29-34.

135. Lewis PD, Lewis KE, Ghosal R, Bayliss S, Lloyd AJ, Wills J, Godfrey R, Kloer P, Mur LA. Evaluation of FTIR spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. BMC Cancer. (2010) 10:640.

136. Maziak DE, Do MT, Shamji FM, Sundaresan SR, Perkins DG, Wong PT. Fourier-transform infrared spectroscopic study of characteristic molecular structure in cancer cells of esophagus: an exploratory study. Cancer Detect Prev. (2007) 31(3):244-53.

137. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. Nat Med. (2004) 10 Suppl:S10-7.

138. Pedot G, Marques JG, Ambühl PP, Wachtel M, Kasper S, Ngo QA, Niggli FK, Schäfer BW. Inhibition of HDACs reduces Ewing sarcoma tumor growth through EWS-FLI1 protein destabilization. Neoplasia. (2022) 27:100784.

139. Li M, Chen C. Regulation of Metastasis in Ewing Sarcoma. Cancers (Basel). (2022) 14(19):4902.

140. Weiss KR, Bailey KM. A Druggable Rheostat for Ewing Sarcoma? Clin Cancer Res. (2022) 28(20):4360-4362.

141. Showpnil IA, Selich-Anderson J, Taslim C, Boone MA, Crow JC, Theisen ER, Lessnick SL. EWS/FLI mediated reprogramming of 3D chromatin promotes an altered transcriptional state in Ewing sarcoma. Nucleic Acids Res. (2022) 50(17):9814-9837.

142. Apfelbaum AA, Wrenn ED, Lawlor ER. The importance of fusion protein activity in Ewing sarcoma and the cell intrinsic and extrinsic factors that regulate it: A review. Front Oncol. (2022) 12:1044707.

143. Meksiarun P, Ishigaki M, Huck-Pezzei VA, Huck CW, Wongravee K, Sato H, Ozaki Y. Comparison of multivariate analysis methods for extracting the paraffin component from the paraffin-embedded cancer tissue spectra for Raman imaging. Sci Rep. (2017) 7:44890.

144. Faoláin EO, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, Lambkin HA, Byrne HJ, Lyng FM. Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents. J Histochem Cytochem. (2005) 53(1):121-9.

145. Theophilou G, Lima KM, Martin-Hirsch PL, Stringfellow HF, Martin FL. ATR-FTIR spectroscopy coupled with chemometric analysis discriminates normal, borderline and malignant ovarian tissue: classifying subtypes of human cancer. Analyst. (2016) 141(2):585-94.

146. Lyng F, Gazi E, Gardner P. Preparation of Tissues and Cells for Infrared and Raman Spectroscopy and Imaging in D. Moss (ed) Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy. RSC Analytical Spectroscopy Monographs. Royal Society of Chemistry. (2011) 11:147-185.

147. Ghasemi M, Shirazi FH. Evaluation of Pre-Fixed Biological Tissues Preparation Methods for ATR-FTIR Biospectroscopy. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. (2014) 10(3):69-80.

148. Hughes C, Gaunt L, Brown M, Clarkebde NW, Gardner P. Assessment of paraffin removal from prostate FFPE sections using transmission mode FTIR-FPA imaging. Anal. Methods. (2014) 6:1028-1035.

149. Sua LF, Bolaños JE, Maya J, Sánchez A, Medina G, Zúñiga-Restrepo V, Fernández-Trujillo L. Detection of mycobacteria in paraffin-embedded Ziehl-Neelsen-Stained tissues using digital pathology. Tuberculosis (Edinb). (2021) 126:102025.

150. Verdonck M, Wald N, Janssis J, Yan P, Meyer C, Legat A, Speiser DE, Desmedt C, Larsimont D, Sotiriou C, Goormaghtigh E. Breast cancer and melanoma cell line identification by FTIR imaging after formalin-fixation and paraffin-embedding. Analyst. (2013) 138(14):4083-91.

151. Augustyniak K, Chrabaszcz K, Smeda M, Stojak M, Marzec KM, Malek K. High-Resolution Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopic Imaging for Detection of Lung Structures and Cancer-Related Abnormalities in a Murine Model. Appl Spectrosc. (2022) 76(4):439-450.

152. Yao J, Li Q, Zhou B, Wang D, Wu R. Advantages of infrared transflection micro spectroscopy and paraffin-embedded sample preparation for biological studies. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. (2018) 195:25-30.

153. Rehman S, Movasaghi Z, DarrJA, Rehman IU. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Breast Cancer Tissues; Identifying Differences between Normal Breast, Invasive Ductal Carcinoma, and Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. Applied Spectroscopy Reviews. (2010) 45(5):355-368.

154. Moreau J, Bouzy P, Guillard J, Untereiner V, Garnotel R, Marchal A, Gobinet C, Terryn C, Sockalingum GD, Thiéfin G. Analysis of Hepatic Fibrosis Characteristics in Cirrhotic Patients with and without Hepatocellular Carcinoma by FTIR Spectral Imaging. Molecules. (2020) 25(18):4092.

Wykaz publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej w których zostały przedstawione częściowe rezultaty zawarte w powyższej pracy:

1. Chaber R, **Łach K,** Szmuc K, Michalak E, Raciborska A, Mazur D, Machaczka M, Cebulski J. *Application of Infrared Spectroscopy In the Indentification of Ewing Sarcoma: A preliminary report*. Infrared Physics & Technology (2017) 83:200-205. (IF:1.851).

2. Chaber R, **Łach K**, Depciuch J, Szmuc K, Michalak E, Raciborska A, Koziorowska A, Cebulski J. *Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy of paraffin and deparafinnized bone tissue samples as a diagnostic tool for Ewing sarcoma of bones*. Infrared Physics & Technology (2017) 85:364-371. (IF: 1.851).

3. Chaber R, **Łach K,** Arthur CJ, Raciborska A, Michalak E, Ciebiera K, Bilska K, Drabko K, Cebulski J. *Prediction of Ewing Sarcoma treatment outcome using attenuated tissue reflection FTIR tissue spectroscopy*. Sci Rep. (2018) 8(1):12299. (IF: 4.011).

4. Chaber R, Arthur CJ, Depciuch J, **Łach K,** Raciborska A, Michalak E, Cebulski J. *Distinguishing Ewing sarcoma and osteomyelitis using FTIR spectroscopy*. Sci Rep. (2018) 8(1):15081 (IF: 4.011).

5. **Łach K**, Kowal A, Perek-Polnik M, Jakubczyk P, Arthur C, Bal W, Drogosiewicz M, Dembowska-Bagińska B, Grajkowska W, Cebulski J, Chaber R. *Infrared spectroscopy as a potential tool for medulloblastoma*. Molecules (2023) 28:2390. (IF: 4.927).

6. **Łach K**, Jakubczyk P, Paja W, Kowal A, Depciuch J, Perek -Polnik M, Arthur CJ, Bal W, Drogosiewicz M, Dembowska-Bagińska B, Grajkowska W, Cebulski J, Chaber R. *Physicochemical properties in the context of clinical course of medulloblastoma in children using FTIR and Raman spectroscopy.* (obecnie w recenzji)