

**OPTYKA LINIOWA  
I NIELINIOWA W BADANIACH  
NOWOTWORÓW.  
PRZYSZŁOŚĆ DIAGNOSTYKI  
MEDYCZNEJ**

**Prof. dr hab. Halina Abramczyk**

**POLITECHNIKA ŁÓDZKA**

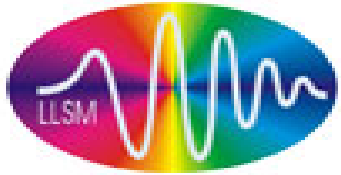
**LABORATORIUM LASEROWEJ SPEKTROSKOPII**

**MOLEKULARNEJ**

**<http://mitr.p.lodz.pl/raman/>**

**Fundacja im. Wiktora Abramczyka**

**[abramm.ogicom.pl](http://abramm.ogicom.pl)**



# POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ CHEMICZNY, LABORATORIUM LASEROWEJ SPEKTROSKOPII MOLEKULARNEJ

[mitr.p.lodz.pl/raman](http://mitr.p.lodz.pl/raman)

Jacek Musiał<sup>2</sup> Radziszlaw Kordek<sup>2</sup>  
Alina Morawiec-Sztandera<sup>2</sup> Krystyna Fabianowska<sup>2</sup>  
Eric Freysz<sup>3</sup> Lech Polis<sup>4</sup> Bartosz Polis<sup>4</sup>

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

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

<sup>4</sup> Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Oddział  
Neurochirurgii i Neurotraumatologii, 3-338 Łódź,  
Polska



**prof. dr hab. Halina Abramczyk**  
head of Laboratory of Laser  
Molecular Spectroscopy

[abramczy@mitr.p.lodz.pl](mailto:abramczy@mitr.p.lodz.pl)  
pok. 233  
website



**dr hab. inż. Beata Brożek-Pluska**

[brozek@mitr.p.lodz.pl](mailto:brozek@mitr.p.lodz.pl)  
pok. 303  
website



**dr inż. Jakub Surmacki**

[jsurmacki@mitr.p.lodz.pl](mailto:jsurmacki@mitr.p.lodz.pl)  
pok. 303  
website



**dr inż. Arkadiusz Jarota**

[ajarota@mitr.p.lodz.pl](mailto:ajarota@mitr.p.lodz.pl)  
pok. 309  
website



**dr inż. Monika Kopeć**

[mkopec@mitr.p.lodz.pl](mailto:mkopec@mitr.p.lodz.pl)  
pok. 303  
website



**mgr Anna Imiela**

[anna.imiela@p.lodz.pl](mailto:anna.imiela@p.lodz.pl)  
pok. 309  
website

**POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ CHEMICZNY,  
LABORATORIUM LASEROWEJ SPEKTROSKOPII MOLEKULARNEJ**

**WSPÓŁPRACA Z OŚRODKAMI MEDYCZNYMI**

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Katedra Onkologii**

Prof. dr hab. n. med. Radziław Kordek

Dr n. med. Jacek Musiał

WSS i M. Kopernika w Łodzi

Prof. dr hab. n. med. Z. Morawiec

Lekarz med. Marek Tazbir



**[mitr.p.lodz.pl/raman](http://mitr.p.lodz.pl/raman)**

Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. WAM –  
Centralny Szpital Weteranów

Prof. dr hab. n. med. Adam Dziki

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Klinika Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi**

Oddział Laryngologii Onkologicznej –

Regionalny Ośrodek Onkologiczny

Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego i

m. Kopernika

Prof. dr hab. n. med. Alina Morawiec-Sztandera

Dr n. med. Izabela Niedźwiecka

Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Prof. dr hab. n. med. Lech Polis

Dr n. med. Bartosz Polis

# LABORATORIUM LASEROWEJ SPEKTROSKOPII MOLEKULARNEJ

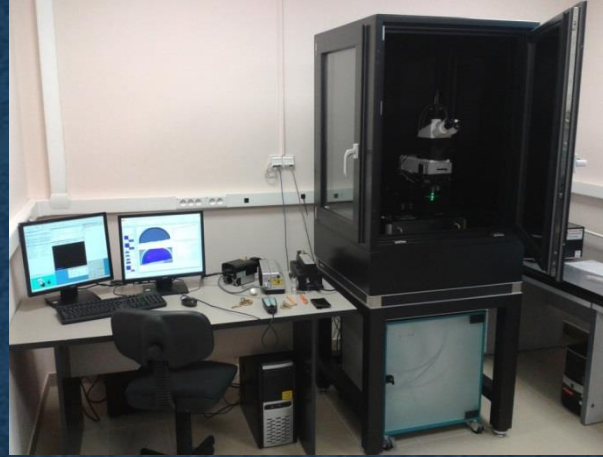
[www.mitr.p.lodz.pl/raman](http://www.mitr.p.lodz.pl/raman)



## Laboratorium spektroskopii Ramana

*Ramanor U 1000 (Jobin Yvon), 488-514nm*

*Konfokalny mikroskop Raman  
(Renishaw)*



## Laboratorium obrazowania Ramana

*Microscope Raman/AFM/SNOM/TERS*



## Laboratorium spektroskopii femtosekundowej

*Millennia, Tsunami, Empower30, Spitfire Ace, Topas  
(Spectra Physics)*

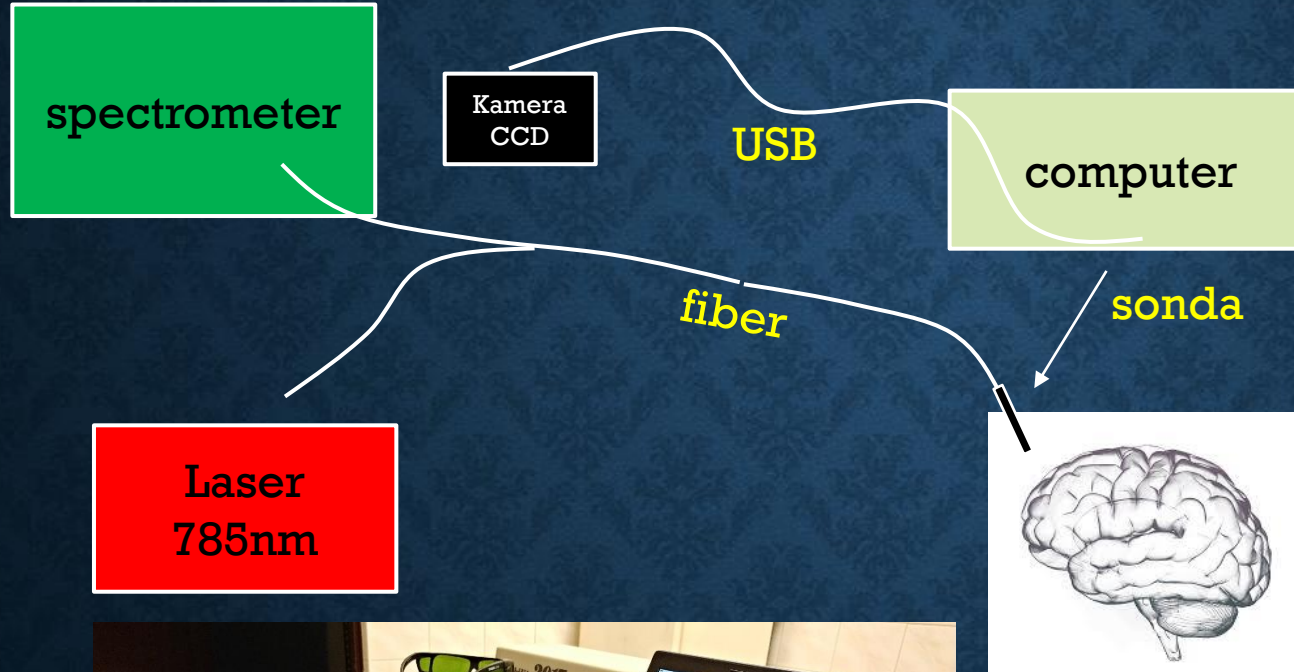


## Laboratorium obrazowania IR

*Mikroskop FTIR (Agilent Technologies  
Cary 600 Series)*



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



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

MRI

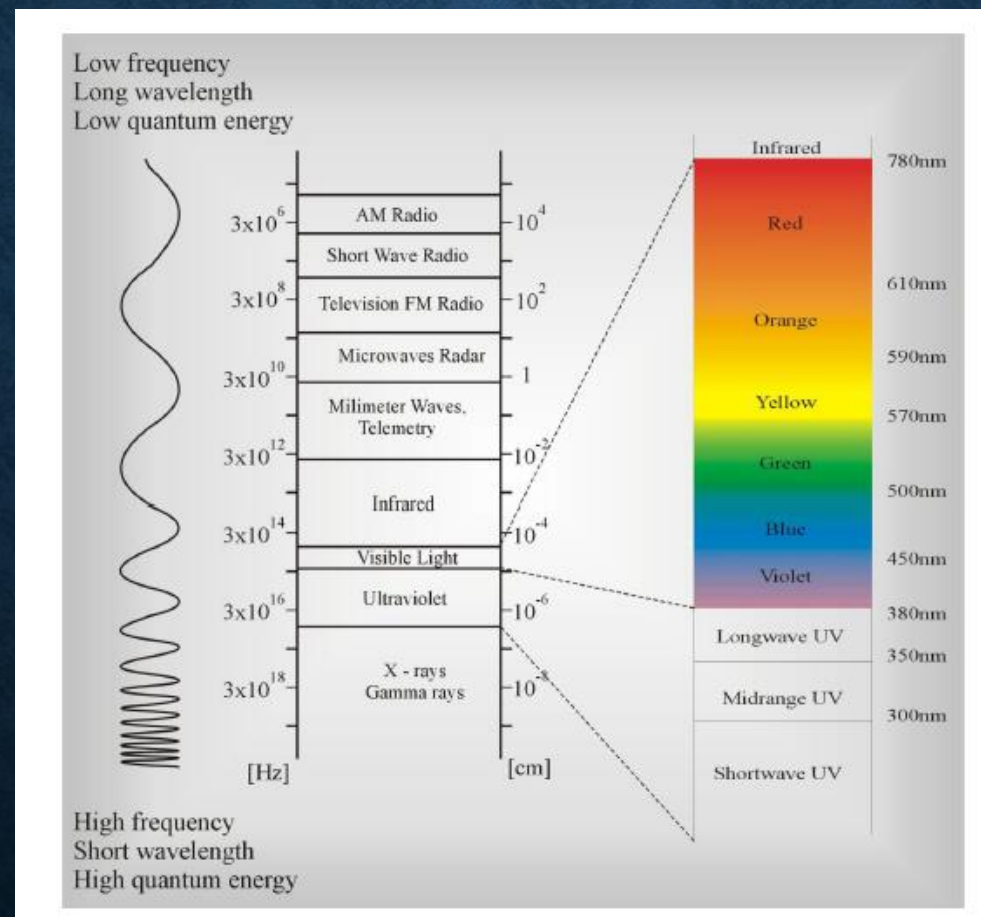
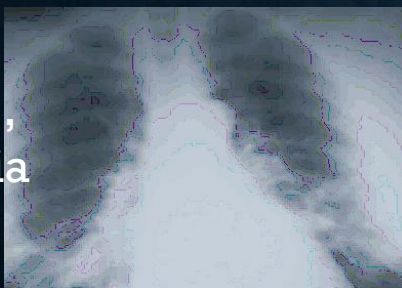


TECHNOLOGIA 5G

Raman



Roentgen, Tomografia



Frequency SPECTRUM

0 Hertz	Steady direct current
50-60 Hertz (5000Km)	AC power
-----USA-----	
16-16.000 kHz	Audio frequencies
10-30 kHz 30-10Km	v.l.f -very low frequency
30-30000 KHz	Radio Frequencies
30-300 kHz 10-1Km	l.f. low frequency
30-35 kHz	Marine com & navigation, aero nav.
300-3000 kHz 1000-100m	m.f medium frequencies
535-1635 kHz	AM broadcast bands
1800-2000 kHz	160 meter band
-----Football Field-----	
3-30 MHz 100-10m	h.f. - high frequencies
3.5-4 MHz	80 meterband
7-7.3 MHz	40 band
14-14.35 MHz	20 meter band
21-21.45 MHz	15meterband
26.85-27.54 MHz	Industrial, Scientific, medical
28-29.7 MHz	10 meterband
26.86-27.455 MHz	Citizens Band Class D
-----Human-----	
30-300 MHz 10-1m	very high frequencies
44-49 Mhz	Analog cordless phone
30-50 MHz	Police, fire, highway, railroad
50-54 MHz	6 meter band
54-72 MHz	TV channels 2 to 4
72-76 MHz	Government, Aero, Marker 75MHz
76-88 MHz	TV channels 5 and 6
88-108 MHz	FM broadcast band
108-118 MHz	Aeronautical navigation
118-136 MHz	Civil Communication Band
148-174 MHz	Government
144-148 MHz	2 meter band
174-216 MHz	TV channels 7 to 13
216-470 MHz	Amateur, government. CB Bend
	non-gov ,fixed or mobile ,aero navigate
220-225 MHz	Amateur band. 1-1/4 meter
225-400 MHz	Military

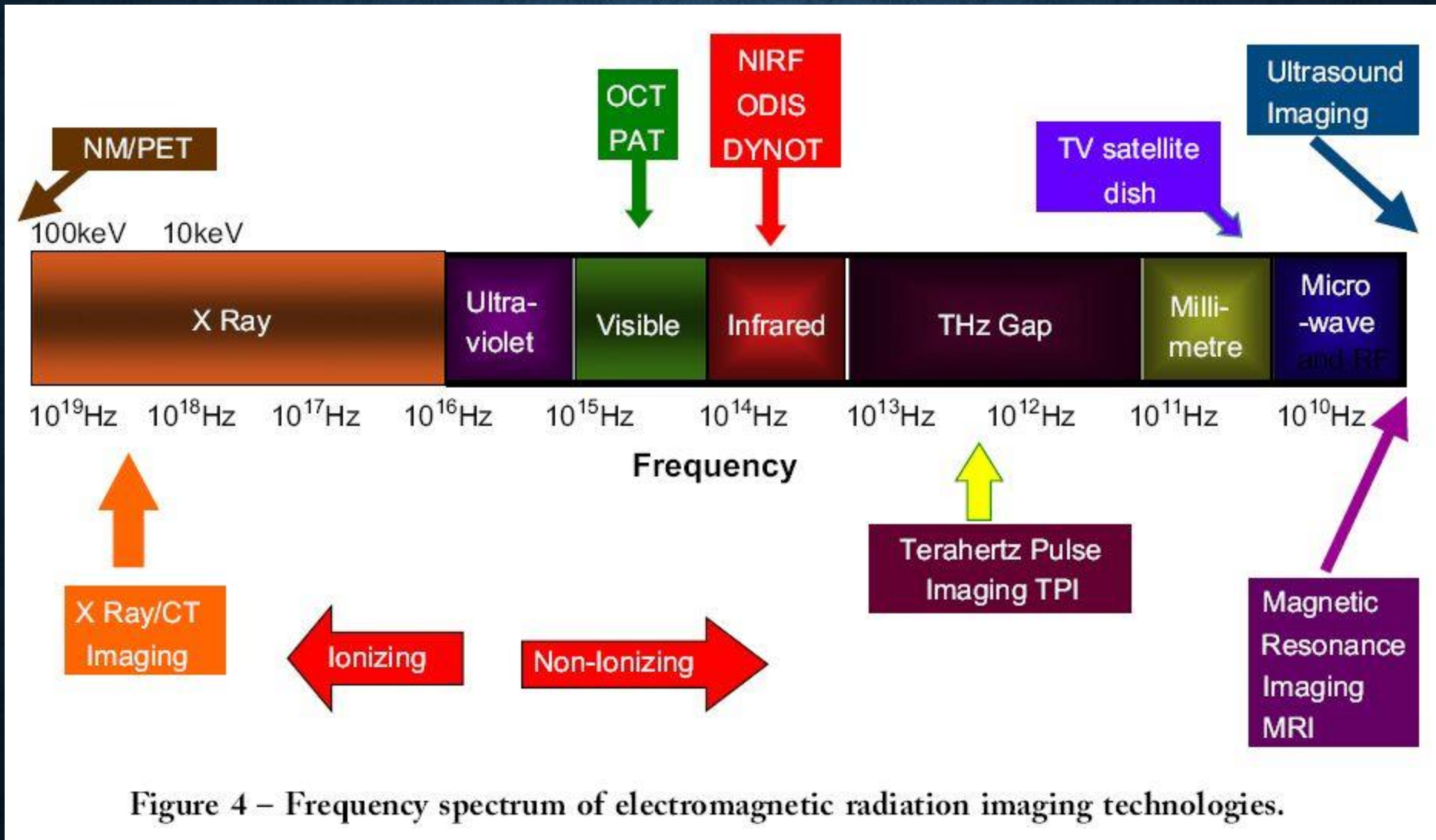
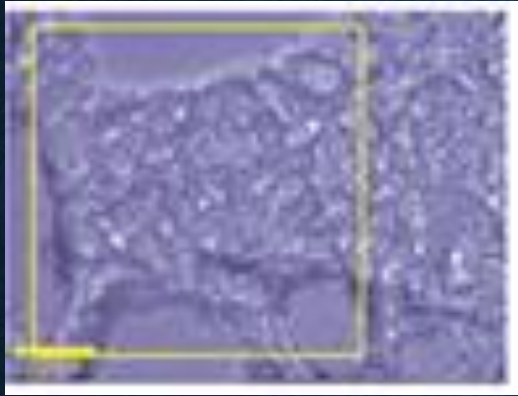
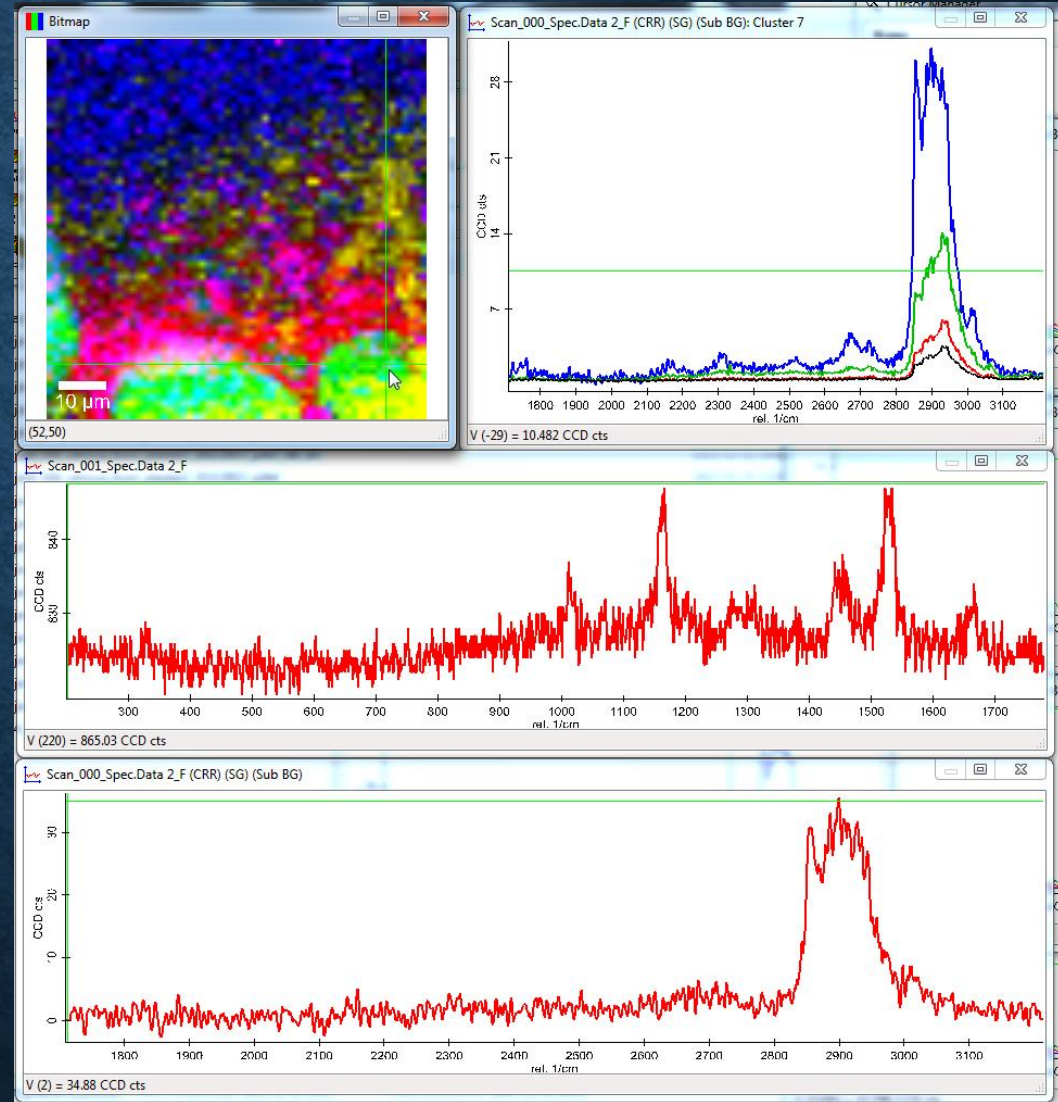


Figure 4 – Frequency spectrum of electromagnetic radiation imaging technologies.

# OBRAZOWANIE RAMANA



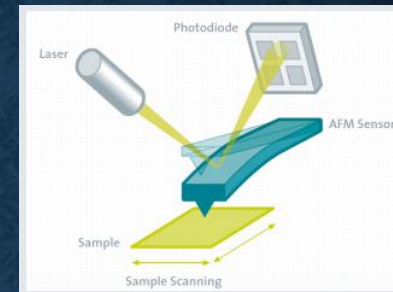
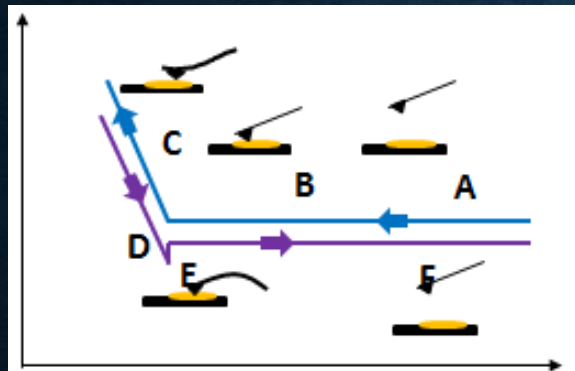
Spektroskopia i obrazowanie Ramana mogą identyfikować składniki tkanki, takie jak komórki nabłonkowe i macierz zewnątrzkomórkowa, która tworzy środowisko, w którym proliferują komórki nowotworowe. Dlatego obrazowanie Ramana jest doskonałą metodą badania składu biochemicznego, w tym zmian, które prowadzą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



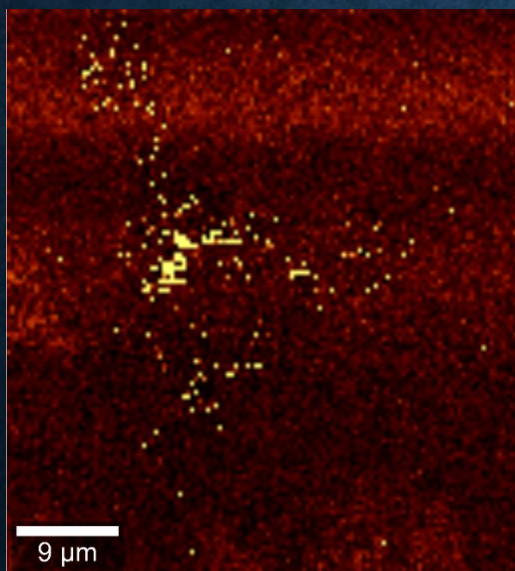




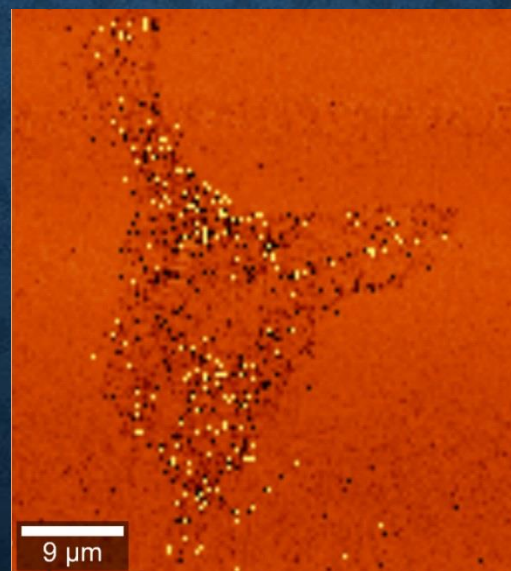
# AFM I SNOM



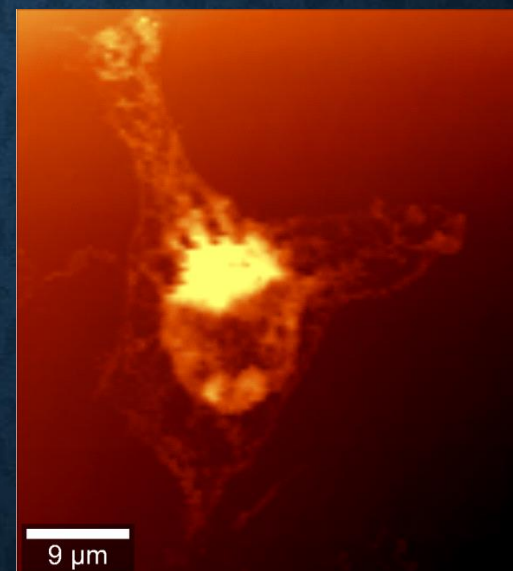
mitr.p.lodz.pl/raman



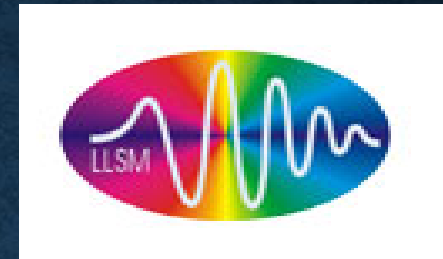
adhezja



szttywność



topografia



**CHEMICAL  
REVIEWS**

2013

IF = 41,298

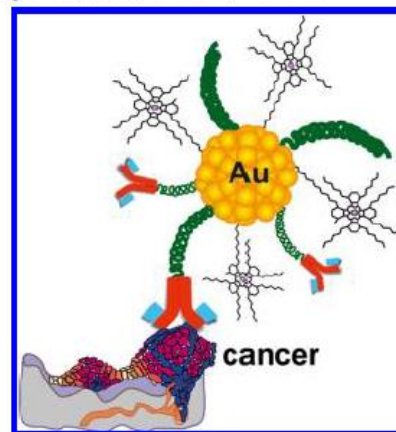
Review

pubs.acs.org/CR

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

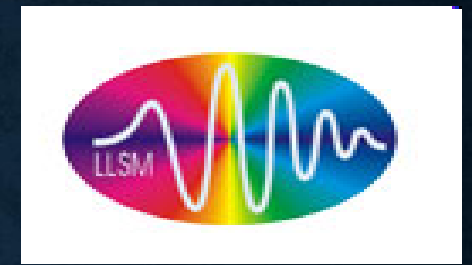
Halina Abramczyk\* and Beata Brozek-Pluska

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



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

# MOTYWACJA - DLACZEGO?



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

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

**Modele zwierzęce in-vivo (mózg)**

**Leki ( temodal,erlotinib) i fotouczulacze w terapii antynowotworowej**

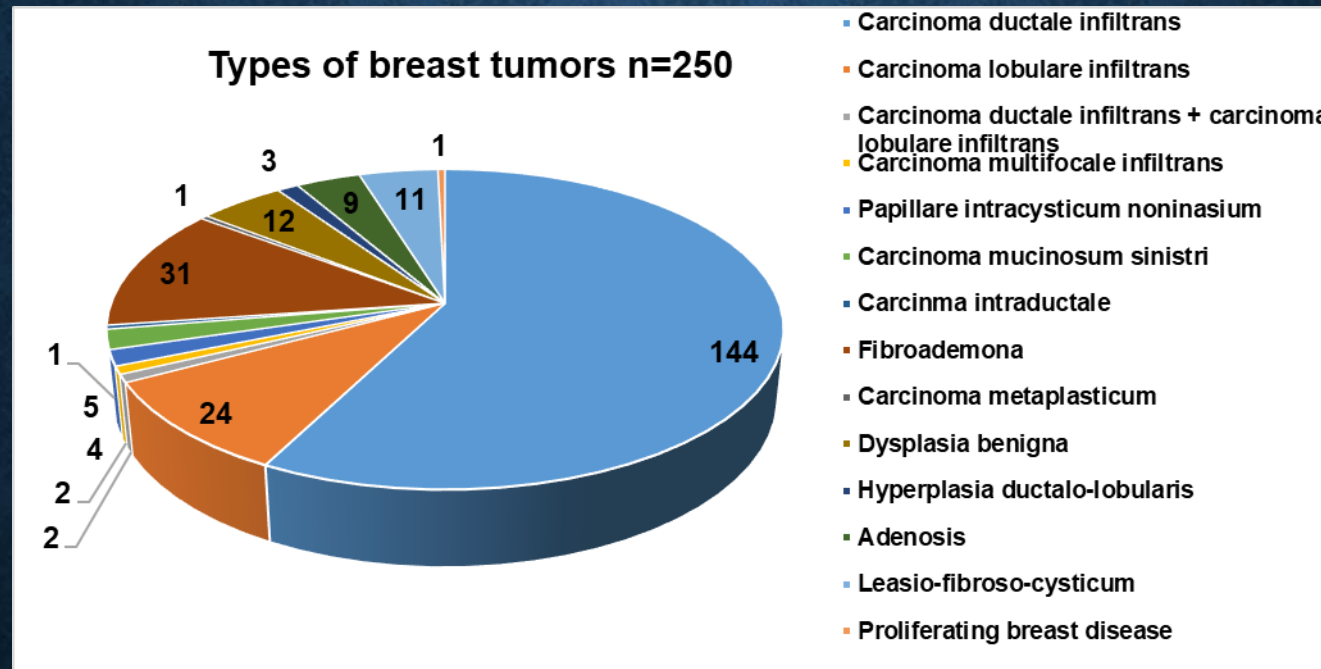
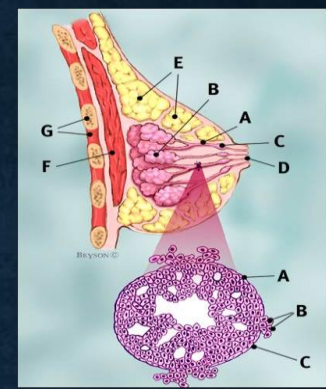
# ZASTOSOWANIA BIOMEDYCZNE



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

# STATYSTYKA PACJENTÓW-GRUCZOŁ PIERSIOWY

❖ 250 pacjentów

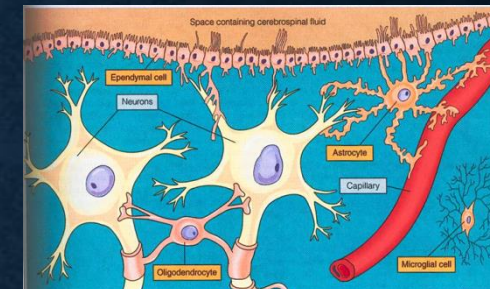
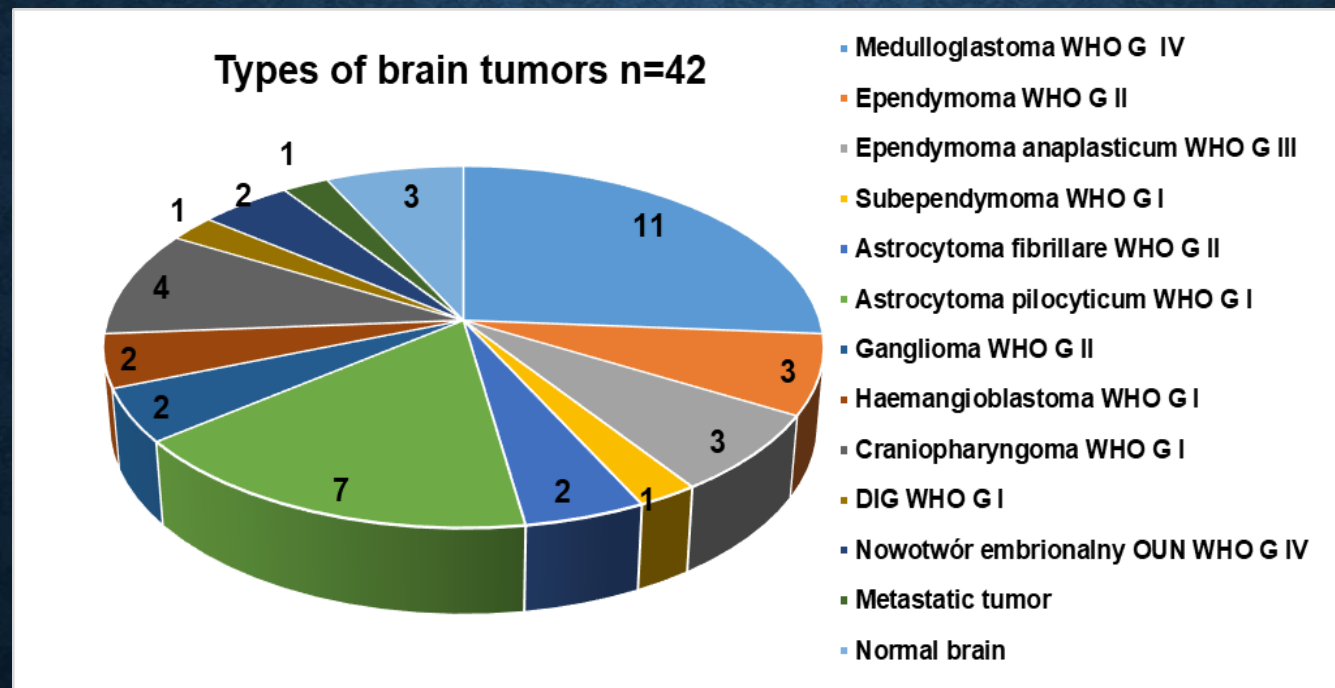


Raporty patologiczne wskazują, że 70% próbek raka to raki przewodowe; pozostałe próbki to raki zrazikowe lub nietypowe raki sutka, przerzuty stwierdzono u 60% chorych

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

# STATYSTYKA PACJENTÓW-MÓZG

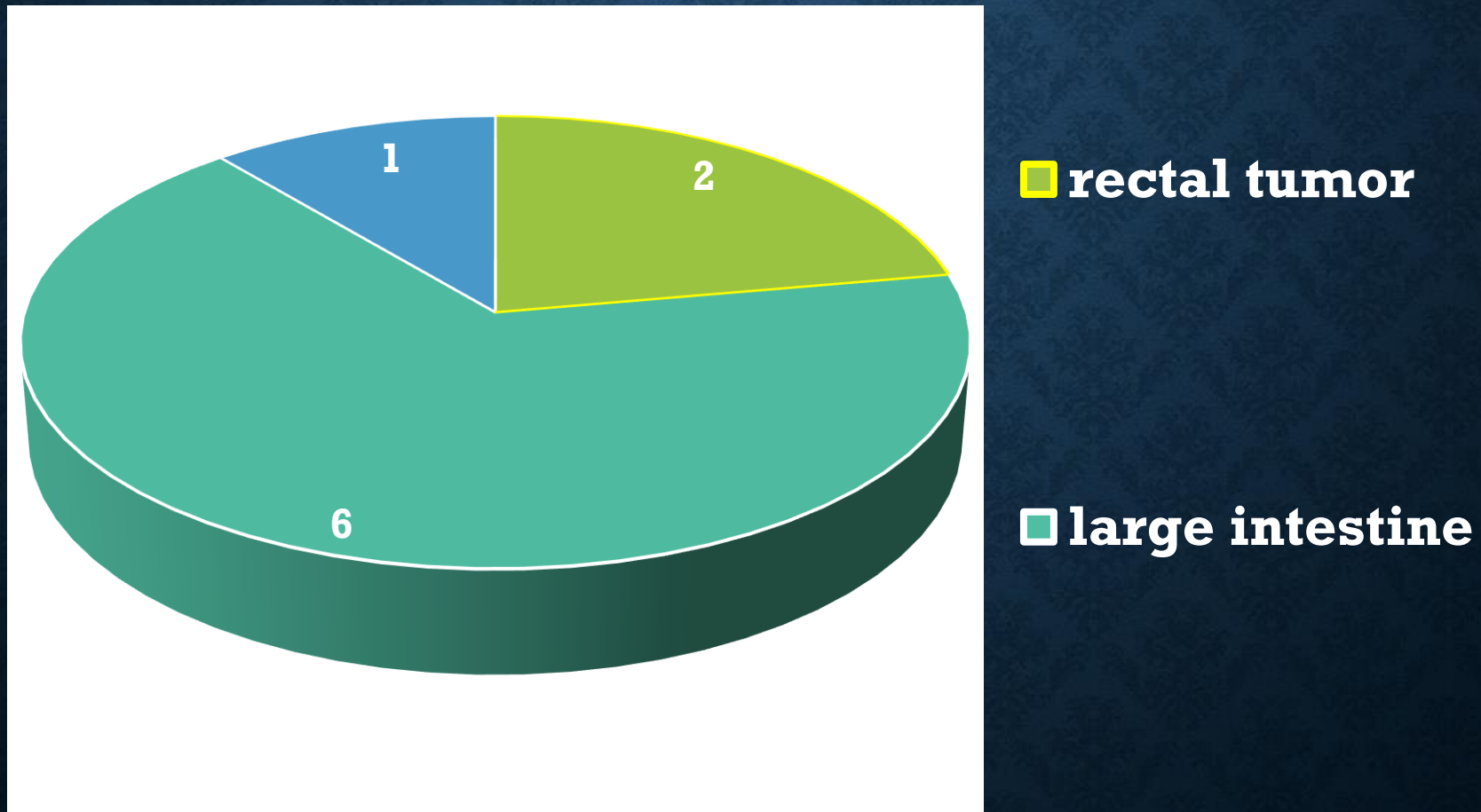
42 pacjentów



Komórki nabłonka pokrywają ciało i większości narządów, takich jak przewody mleczone w gruczole piersiowym czy przewodzie pokarmowym i biorą udział w wchłanianiu pokarmu, chociaż jest to tylko jedna z wielu cech nabłonka<sup>37</sup>. Komórki wyściełające mózg, zwane ependymocytami, to rodzaj komórek glijowych pokrywających ściany układu komorowego mózgu: komory mózgowe i rdzeń kręgowy. Są zaangażowane w wymianę materiału między płynem mózgowo-rdzeniowym a tkanką nerwową i w przeciwieństwie do komórek nabłonka, nie mają błony podstawnej. Pomimo tych różnic, dla uproszczenia obie grupy będą nazywane epitelialnymi.

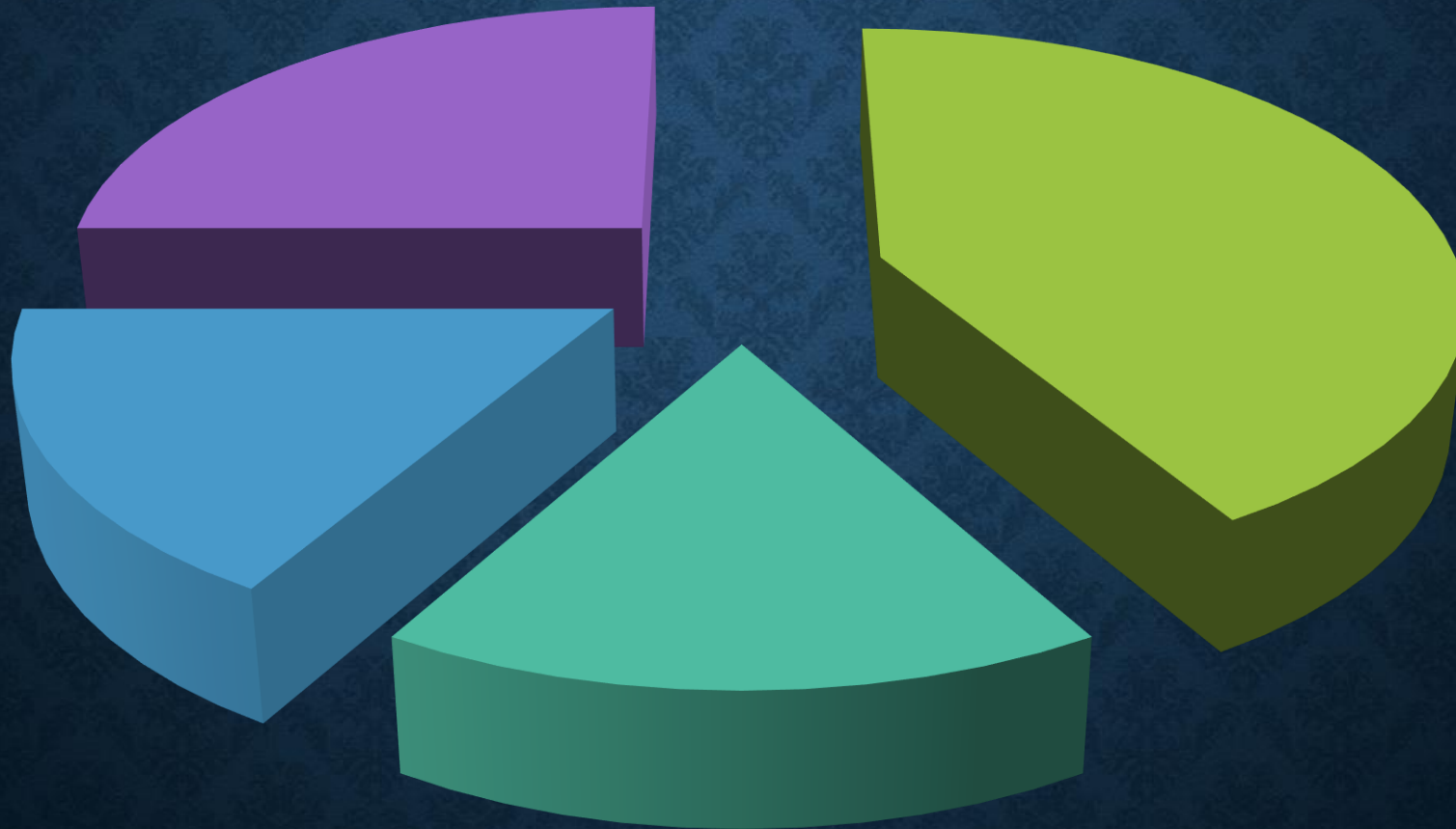
# STATYSTYKA PACJENTÓW-JELITO

40 pacjentów



# STATYSTYKA PACJENTÓW- GŁOWA - SZYJA

14 pacjentów



Komórki nabłonka pokrywają ciało i większości narządów, takich jak przewody mleczne w gruczole piersiowym czy przewodzie pokarmowym i biorą udział w wchłanianiu pokarmu, chociaż jest to tylko jedna z wielu cech nabłonka<sup>37</sup>. Komórki wyściełające mózg, zwane ependymocytami, to rodzaj komórek glejowych pokrywających ściany układu komorowego mózgu: komory mózgowe i rdzeń kręgowy. Są zaangażowane w wymianę materiału między płynem mózgowo-rdzeniowym a tkanką nerwową i, w przeciwieństwie do komórek nabłonka, nie mają błony podstawnej. Pomimo tych różnic, dla uproszczenia obie grupy będą nazywane epitelialnymi.



# ZJAWISKA LINIOWE I NIELINIOWE

$$P_i = \chi_{ij}^{(1)} E_j + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l$$

**KONFOKALNA  
MIKROSPEKTROSKOPIA  
RAMANA**

**GENEROWANIE DRUGIEJ  
HARMONICZNEJ (SHG)**

**WYMUSZONE ROZPRASZANIE  
RAMANA**

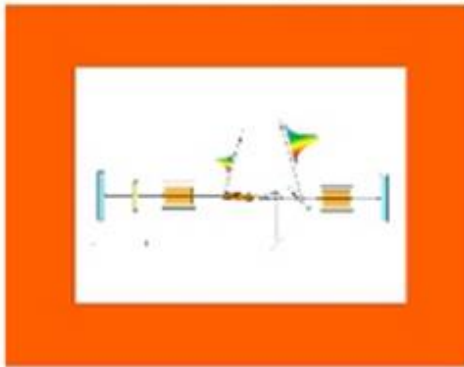
**Absorpcja przejściowa pump-probe,  
spektroskopia femtosekundowa, CARS**

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



Introduction to Laser  
Spectroscopy

Halina Abramczyk



# Introduction to Laser Spectroscopy

## 1st Edition

☆☆☆☆☆ [Write a review](#)

**Authors:** Halina Abramczyk

**eBook ISBN:** 9780080455259

**Hardcover ISBN:** 9780444516626

**Imprint:** Elsevier Science

**Published Date:** 6th May 2005

**Page Count:** 384

[View on ScienceDirect](#) ↗

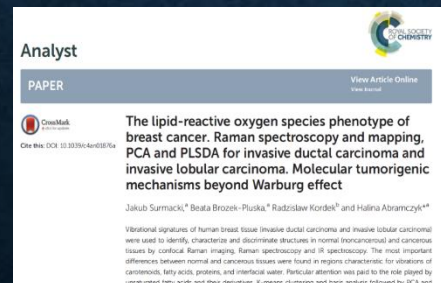


Technika	Rozdzielczość przestrzenna	Penetracja w głąb	Czułość w detekcji markerów molekularnych	Gęstość danych na piksel	Szybkość akwizycji danych	Zjawisko badane
CLSM/RLSM	✓✓✓	✓	✓	✓	✓✓✓	Rozpraszanie, fluorescencja
OCT	✓✓	✓✓	✓	✓	✓✓✓	Rozpraszanie, polaryzacja
PAI	✓✓	✓✓✓	✓	✓	✓✓	Absorpcja
TPEF <sup>f</sup>	✓✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	Fluorescencja
SHG <sup>f</sup>	✓✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	Niecentrosymetryczność zespołów molekularnych
FLIM <sup>f</sup>	✓✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	Czasy życia fluorescencji
Raman	✓✓✓	✓	✓✓✓	✓✓✓	✓	Drgania cząsteczek
SRS	✓✓✓	✓✓	✓✓	✓✓✓	✓✓	Drgania cząsteczek
CARS	✓✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	Drgania cząsteczek

“chemiczny odcisk palca „Fingerprint”

# JAK SPEKTROSKOPIA I OBRAZOWANIE RAMANA WSPOMAGAJĄ BADANIA NAD RAKIEM?

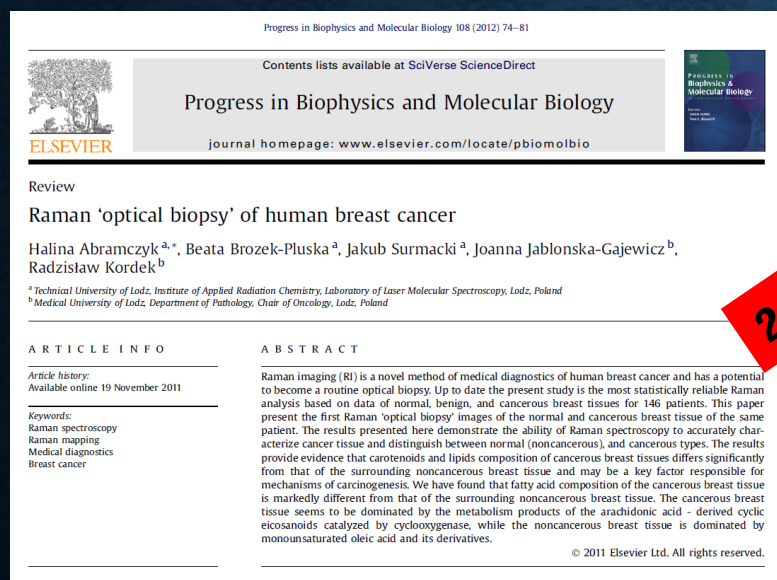
## • BIOMARKERY RAMANA ZMIAN NOWOTWOROWYCH



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

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

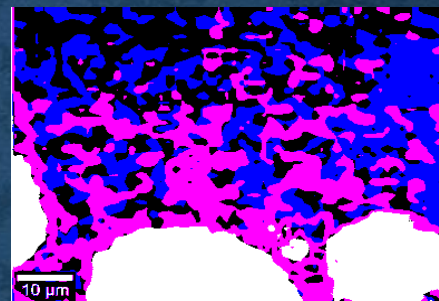
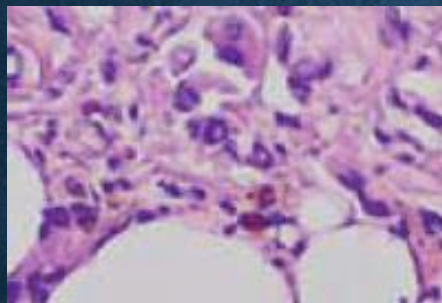
## • OPTYCZNA BIOPSJA RAMANA



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

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

# WIRTUALNA HISTOPATOLOGIA RAMANA



Abramczyk H et al.,  
patent application

STANDARDOWA HISTOPATOLOGIA H&E

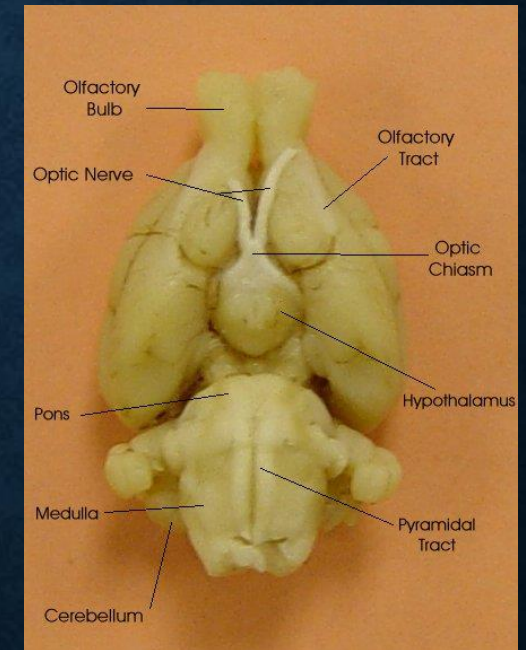
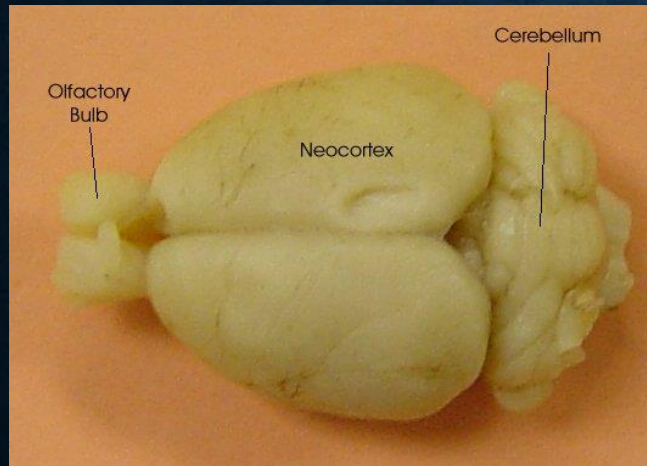
OBRAZ HISTOPATOLOGII RAMANOWSKIEJ

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

# **SPEKTROSKOPIA RAMANA JAKO NARZĘDZIE NAWIGUJĄCE W BIOPSI OPTYCZNEJ MÓZGU *IN-VIVO***



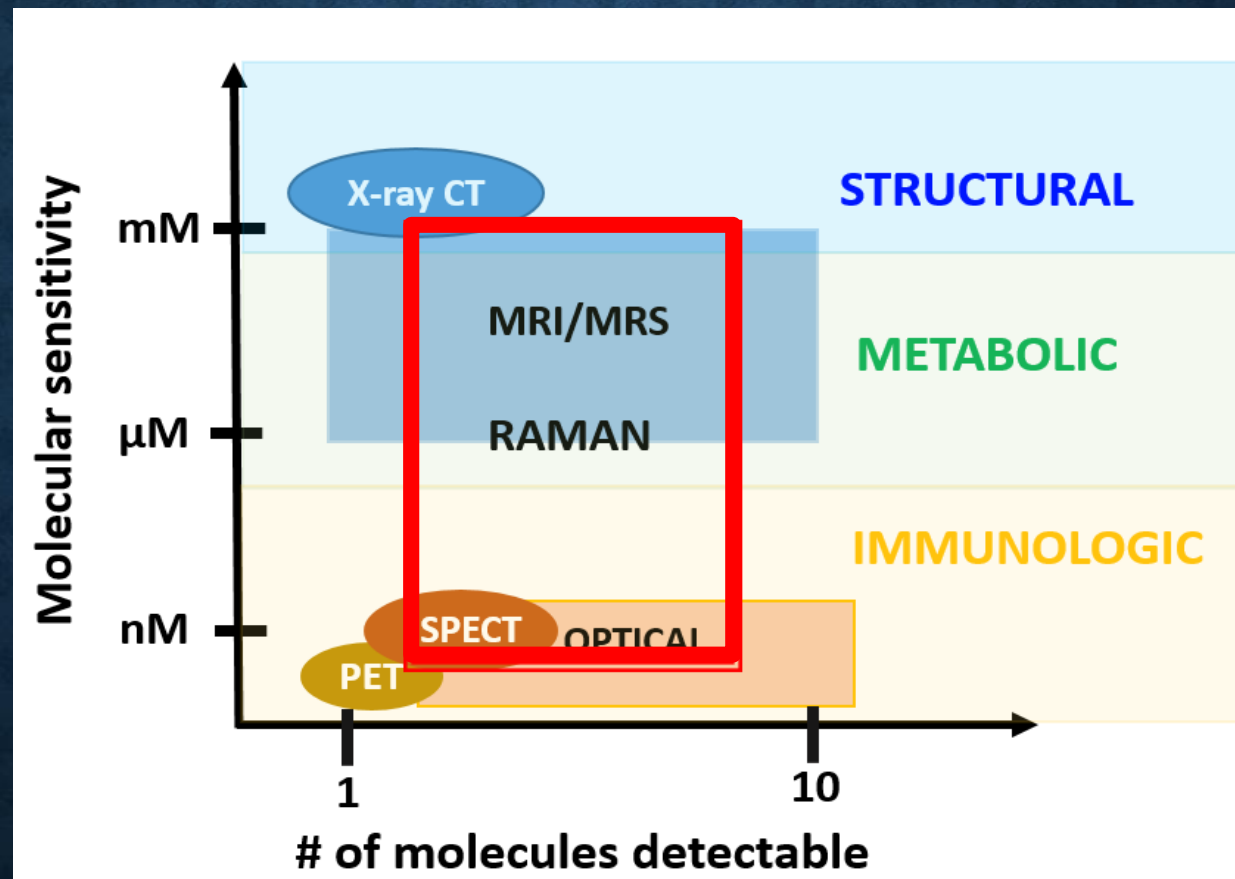
# OPTYCZNA BIOPSJA RAMANA MÓZGU SZCZURA W LLSM





# CZUŁOŚĆ MOLEKULARNA RÓŻNYCH METOD OBRAZOWANIA

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



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

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

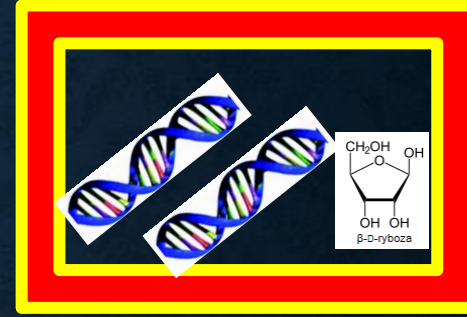
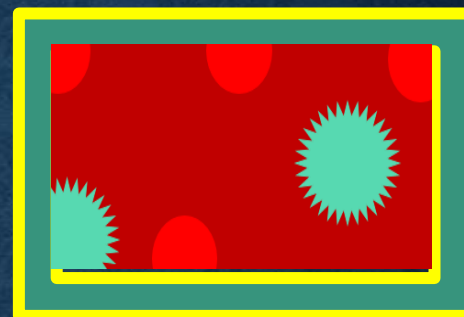
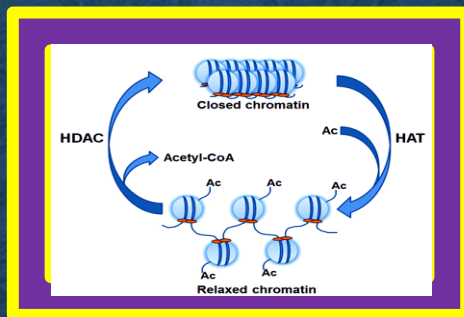
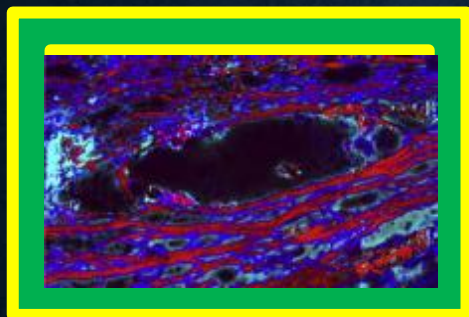
# Stężenie (molowe)

mM

μM

nM

pM



## STRUKTURALNE METABOLICZNE EPIGENETYCZNE IMMUNOLOGICZNE GENETYCZNE

- epitelium
- tkanka łączna
- nerwy
- mięśnie

- lipidy
- białka
- węglowodany
- minerały
- enzymy

- metylacja DNA
- metylacja histonów
- acetylacja histonów

- receptory
- czynniki wzrostu
- cytokiny
- hormony

- DNA
- mRNA

ŁATWOŚĆ WYKRYWALNOŚCI

POTENCJALNY WZROST SPECYFICZNOŚĆ

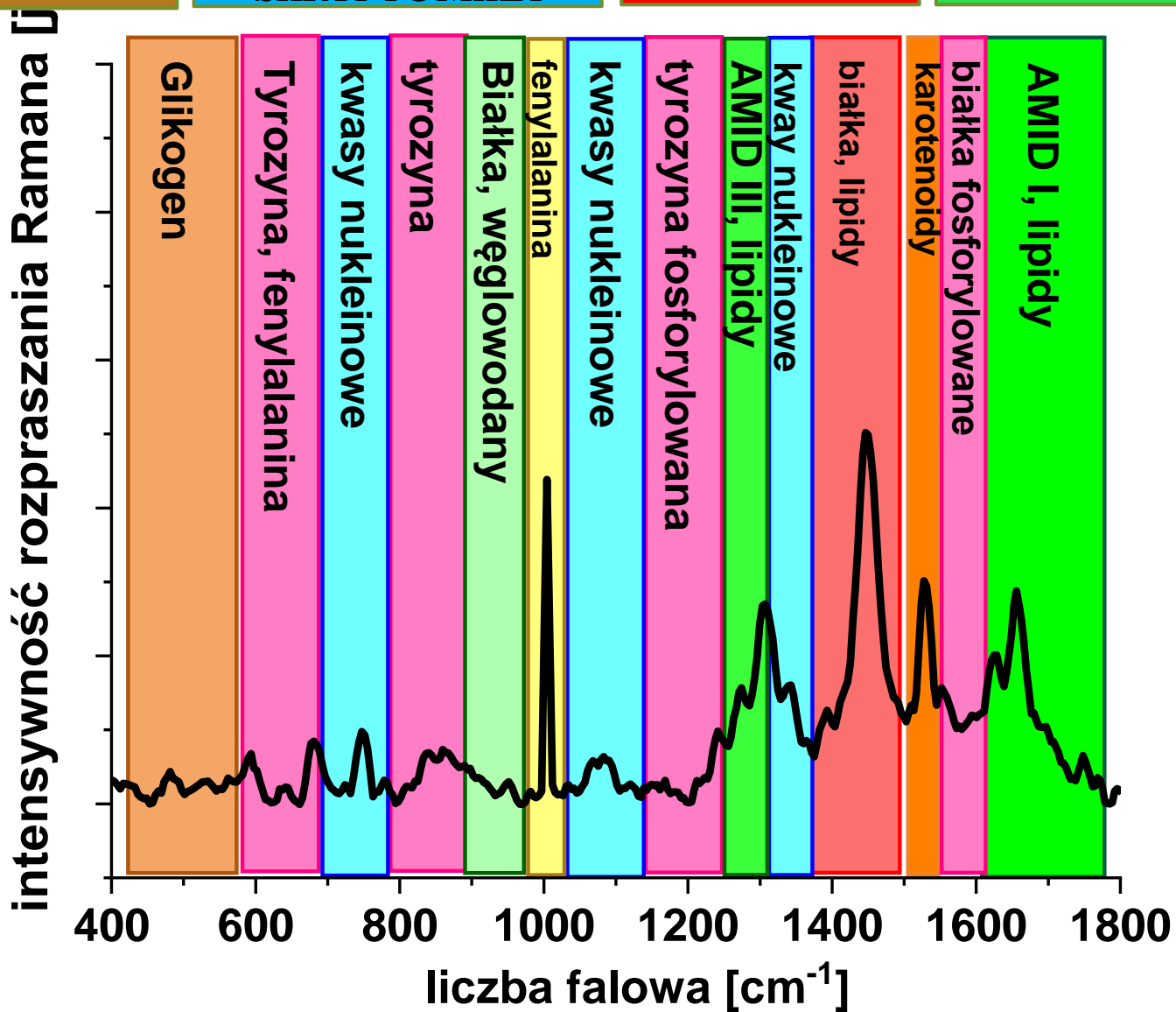
Wykrywalne cechy molekularne w tkance można podzielić na pięć kategorii fizjologicznych: strukturalne, metaboliczne, epigenetyczne, immunologiczne i genetyczne. Kluczowym czynnikiem ograniczającym większość metod obrazowania jest stosunek sygnału do szumu związany ze stężeniem „obrazowanej cechy”. Ryc.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

METABOLOMIKA

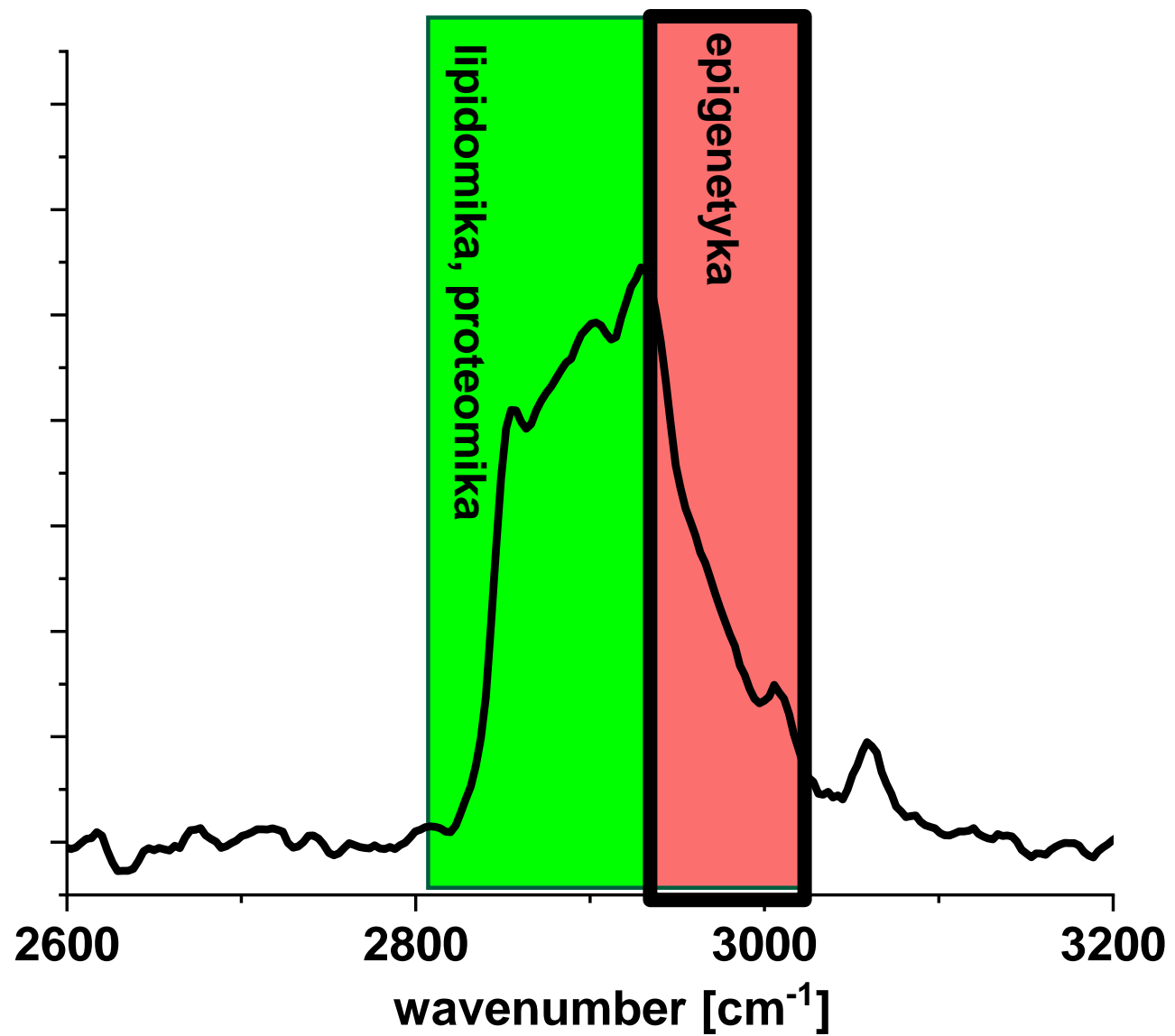
GENOMIKA/TRAN  
SKRYPTOMIKA

LIPIDOMIKA

PROTEOMIKA



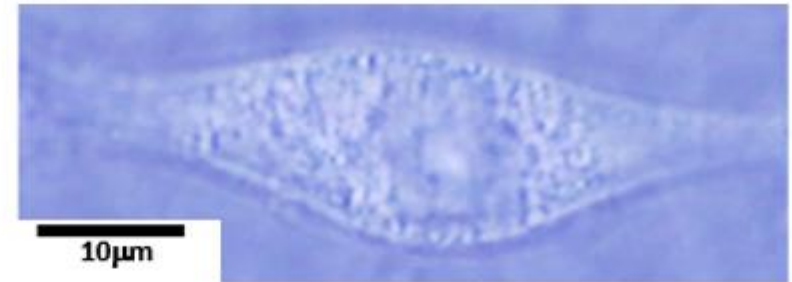
Intensywność rozpraszania Raman [j.u.]



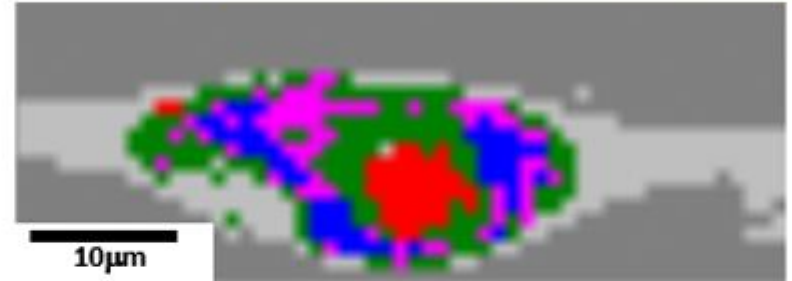
# Glejak o wysokim stopniu złośliwości, komórki U-87 MG

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

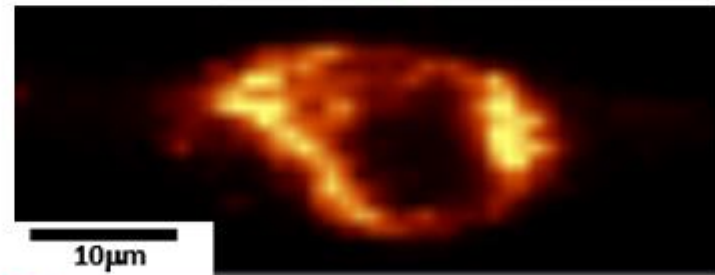
**Bright field**



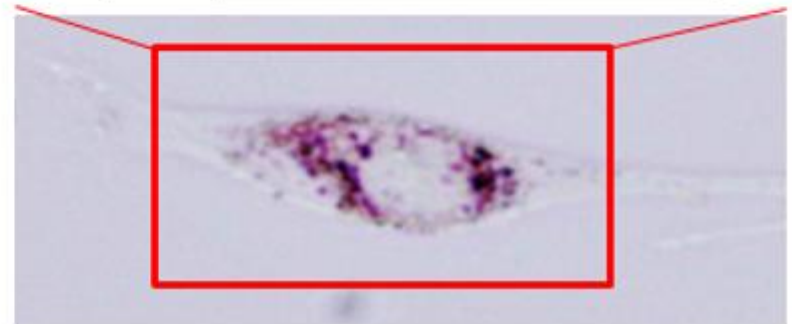
**Raman imaging**



**Fluorescence imaging of Oil Red O**



**Bright field after lipid staining with Oil Red O**

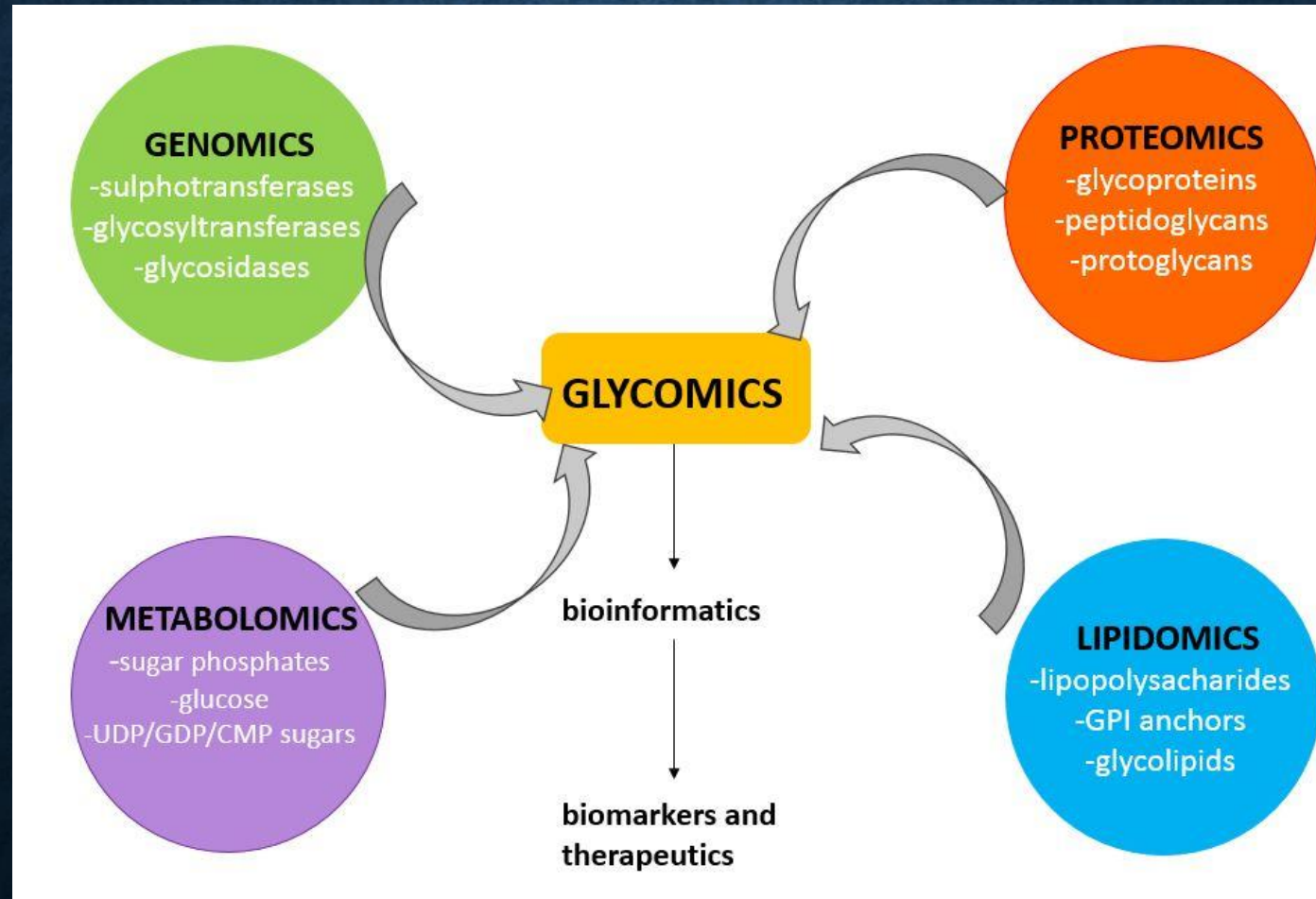


# ANALIZA POJEDYNCZEJ KOMÓRKI TECHNIKĄ RAMANA: NOWA JAKOŚĆ W TECHNIKACH „OMICS”

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

# PRZYSZŁE KIERUNKI W BADANIACH NOWOTWORÓW

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



# Konwencjonalne obrazowanie biologii molekularnej vs obrazowanie Ramana

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



# Konwencjonalne obrazowanie biologii molekularnej vs obrazowanie Ramana

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

# **Konwencjonalne obrazowanie biologii molekularnej vs obrazowanie Ramana (badania omiczne)**

**Techniki konwencjonalne (mikromacierz DNA, sekwencjonowanie, spektrometria mas, PCR, immunoprecypitacja, western blot)**

**Spektroskopia i obrazowanie Ramana**

Destrukcyjne (np. QPCR i spektrometria mas)

**Nieinwazyjne, niedestruktywne**

Wymaga wcześniejszej wiedzy dotyczącej oznaczanych cząsteczek – markerów (np. IHC and qPCR)

**Zapewnia pełen zakres informacji chemicznych w widmie**

Przygotowanie próbki może zająć kilka dni lub tygodni (np. skrawanie i barwienie tkanek, posiewy mikrobiologiczne)

**Wymagane jest minimalne lub żadne przygotowanie próbki, dzięki czemu są szybsze i tańsze w wykonaniu -> szybsza diagnoza pacjenta i mniejsze koszty dla szpitali**

Optymalizacja protokołu - często czasochłonna (np. IHC i qPCR)

**Warunki pomiaru są łatwe i szybkie do optymalizacji**

Utrata informacji przestrzennej (np. QPCR i spektrometria mas)

**Zachowuje informacje przestrzenne  
Wysoka rozdzielczość przestrzenna (poniżej mikrometra)**

Często wymagane jest utrwalanie, nie nadaje się do żywych komórek

**Żywe komórki - można analizować bez powodowania ich uszkodzeń**

Wymagane znakowanie (np. IHC i qPCR)  
możliwość tworzenia artefaktów, kosztowne (czas, odczynniki i pracochłonność)

**Bezznacznikowe**

# ZJWSKA LINIOWE I NIELINIOWE

$$P_i = \chi_{ij}^{(1)} E_j + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l$$

**Konfokalna mikroskopia Ramana**

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

# KONFOKALNA MIKROSKOPIA RAMANA

## 1.5 Confocal Raman Microscopy

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

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

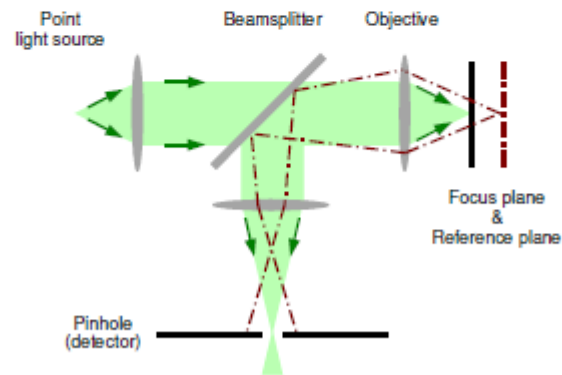


Fig. 3: Principal setup of a confocal microscope

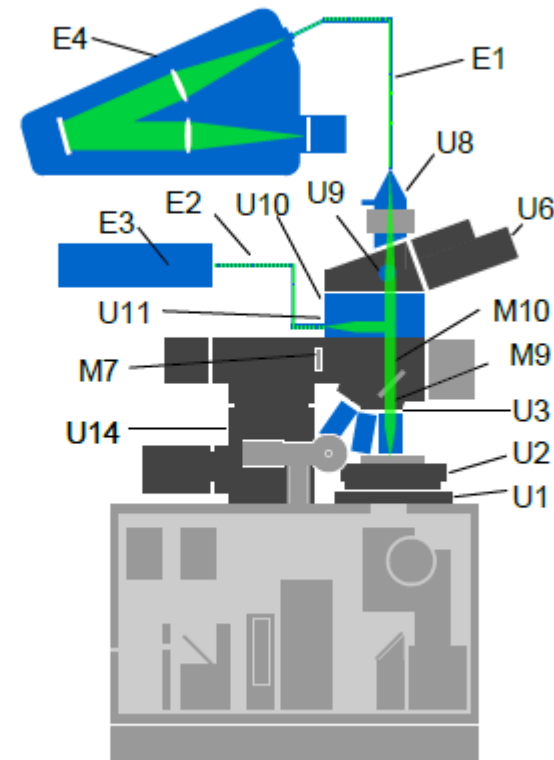


Fig. 8: Schematic illustration of the beam path for confocal Raman microscopy.

# SNOM

## MIKROSKOPIA BLISKIEGO POLA PRZEŁAMUJE LIMIT DYFRAKCYJNY!

### 3.1 SNOM AC in transmission configuration

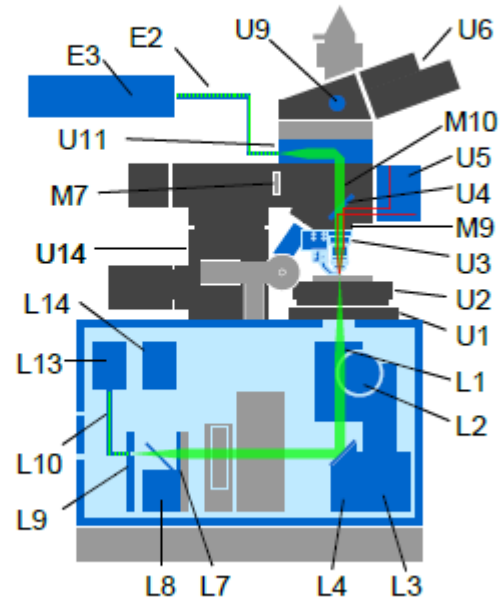
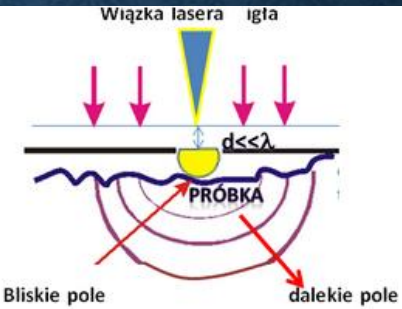
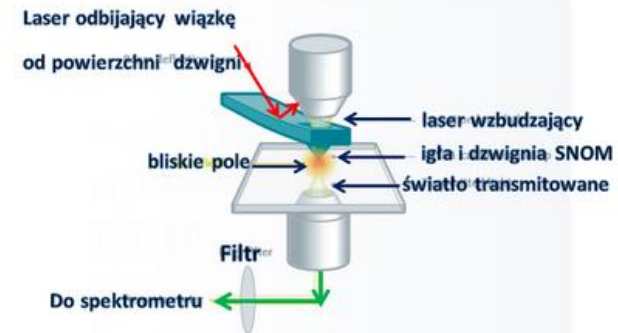


Fig. 5: Schematic illustration of the beam path for Scanning Near-field Optical Microscopy in AC transmission mode.



a)

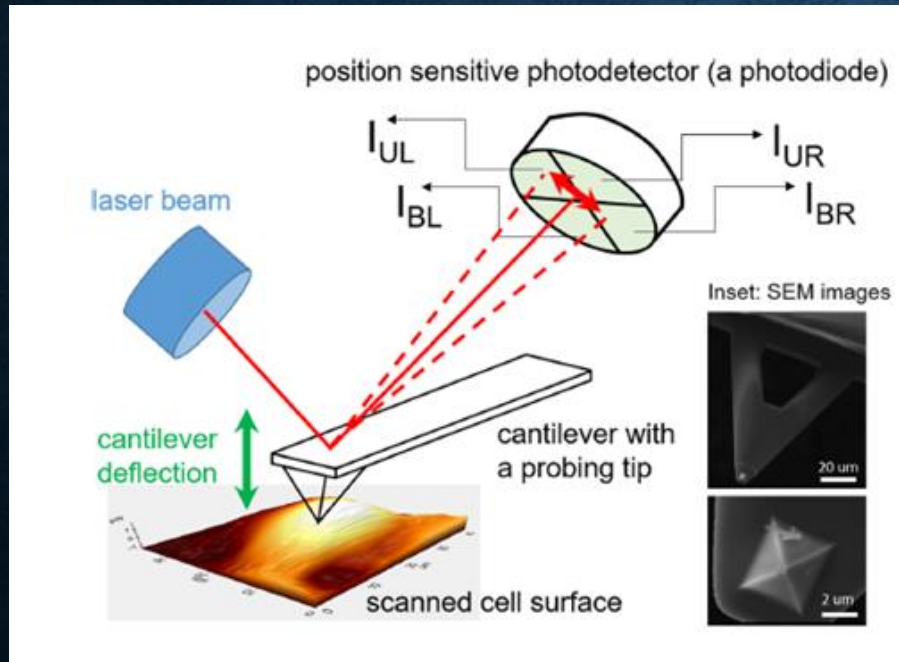


b)

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

# AFM (MIKROSKOPIA SIŁ ATOMOWYCH)

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



Wykrywanie poziomego światła laserowego w oparciu o matrycę fotodiodową

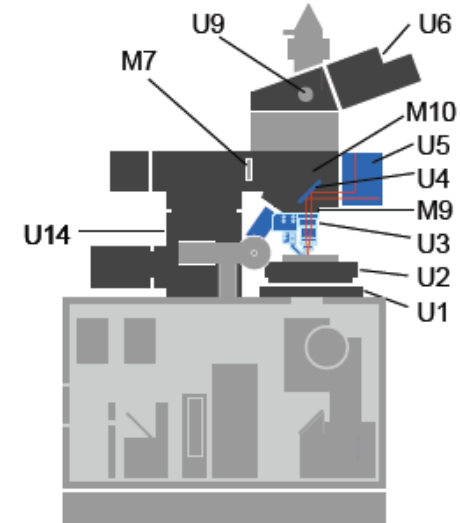


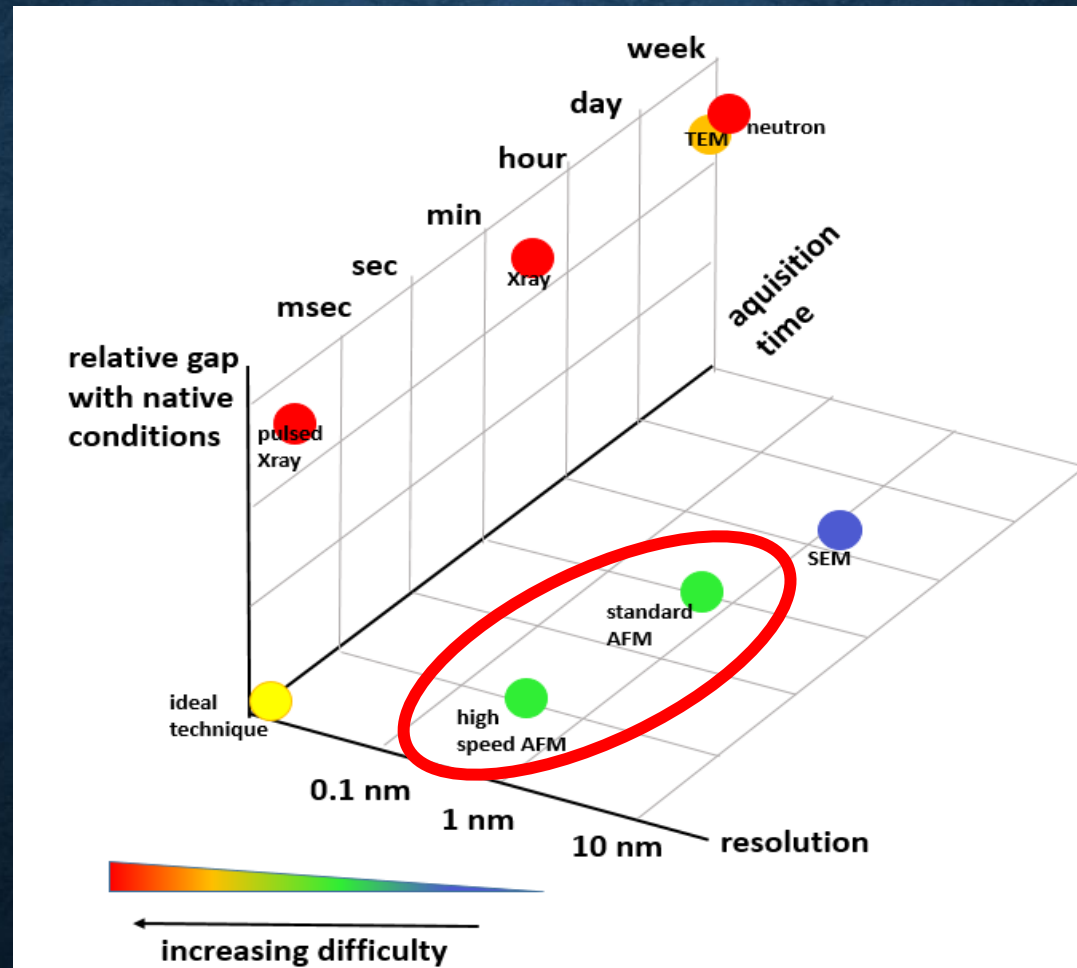
Fig. 5: Schematic illustration of the beam path for AFM AC Mode.

**WITec**  
focus innovations

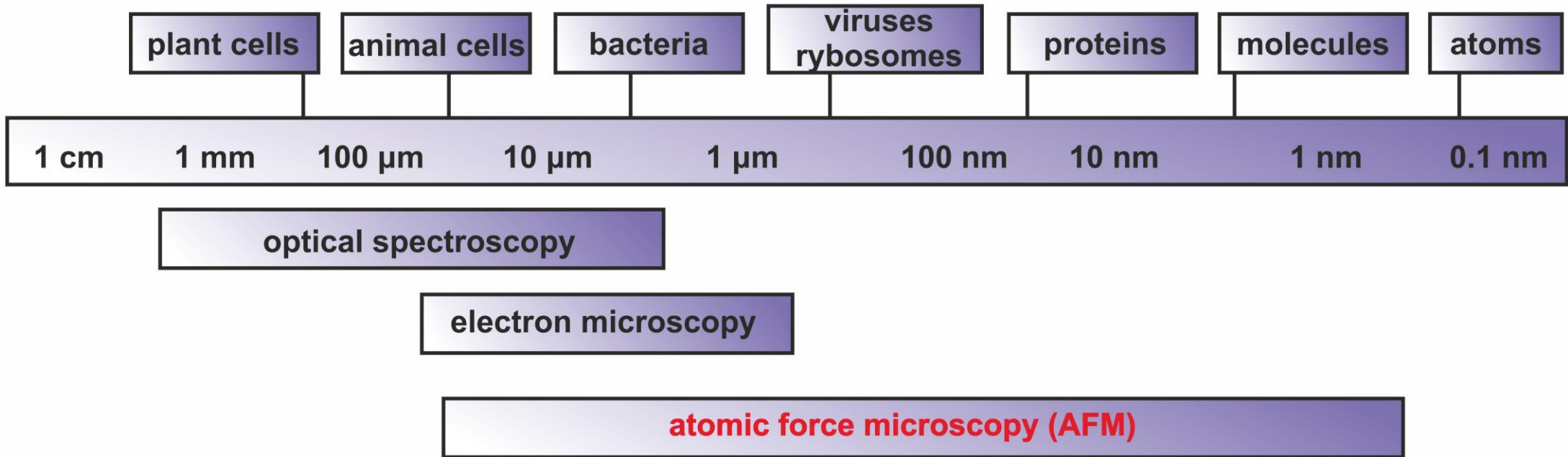
## AFM IN AC MODE

- U1 XY positioner
- U2 Scan stage
- U3 Objective turret with objectives including the inertial drive and the SNOM tip
- U4 Dichroic mirror
- U5 Beam deflection unit
- U6 Binocular tube with ocular camera
- U9 Pushrod
- U14 Microscope Z stage with stepper motor

# ROZDZIELCZOŚĆ PRZESTRZENNA RÓŻNYCH METODY OBRAZOWANIA



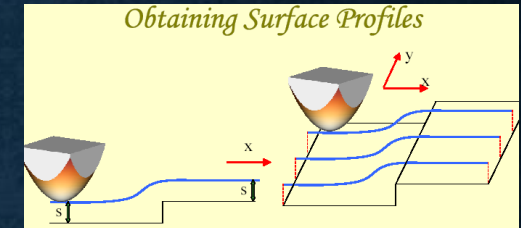
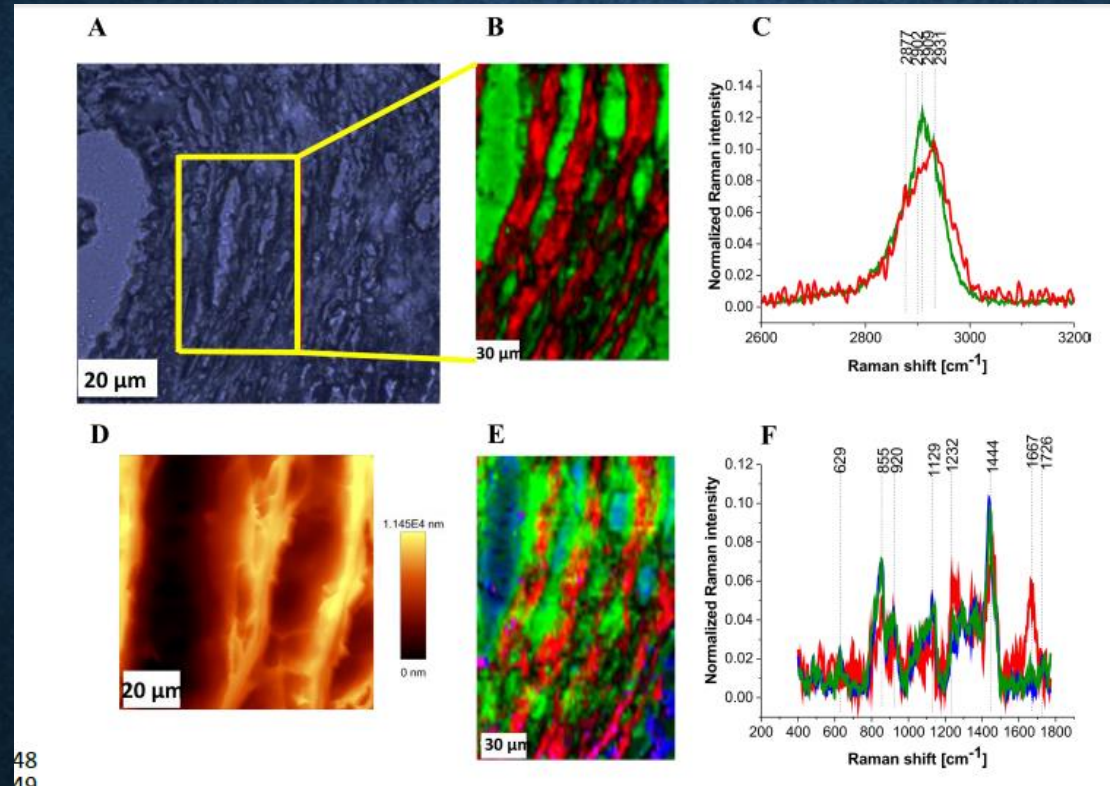
Zatem pomysły obserwacji dynamiki nanostrukturalnej w żywych neuronach mogą w najbliższej przyszłości otworzyć możliwość wizualizacji morfologii plastyczności synaps w rozdzielczości nanometrycznej w czasie rzeczywistym.



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



# TOPOGRAFIA AFM W PROFILOWANIU POWIERZCHNI

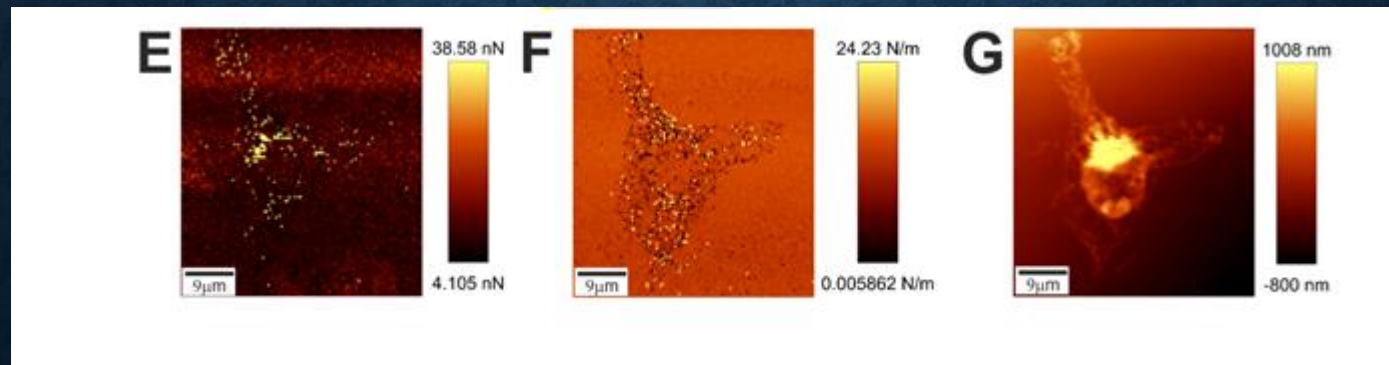


48  
49

Fig. 6 Distribution of the glycans (green), lipids (blue) and protein (red) in the human breast tumor tissue, the white light microscopy image (A), Raman image (150  $\mu\text{m}$  x 230  $\mu\text{m}$ ) obtained from the basis analysis (B) and Raman spectra (C) in the high frequency spectral region. AFM image (D), Raman image obtained from the basis analysis (E) and Raman spectra (F) in the fingerprint region of the tumor breast tissue (Patient P155, Infiltrating adenocarcinoma grade WHO according to Elston and Ellis modification G2 ), integration time for Raman images 0.5 s in the high frequency region and 1 s in the low frequency region, resolution step 0.5  $\mu\text{m}$ , laser excitation power 10 mW. The line colors of the spectra correspond to the colors of the Raman maps.

# SZTYWNOŚĆ

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

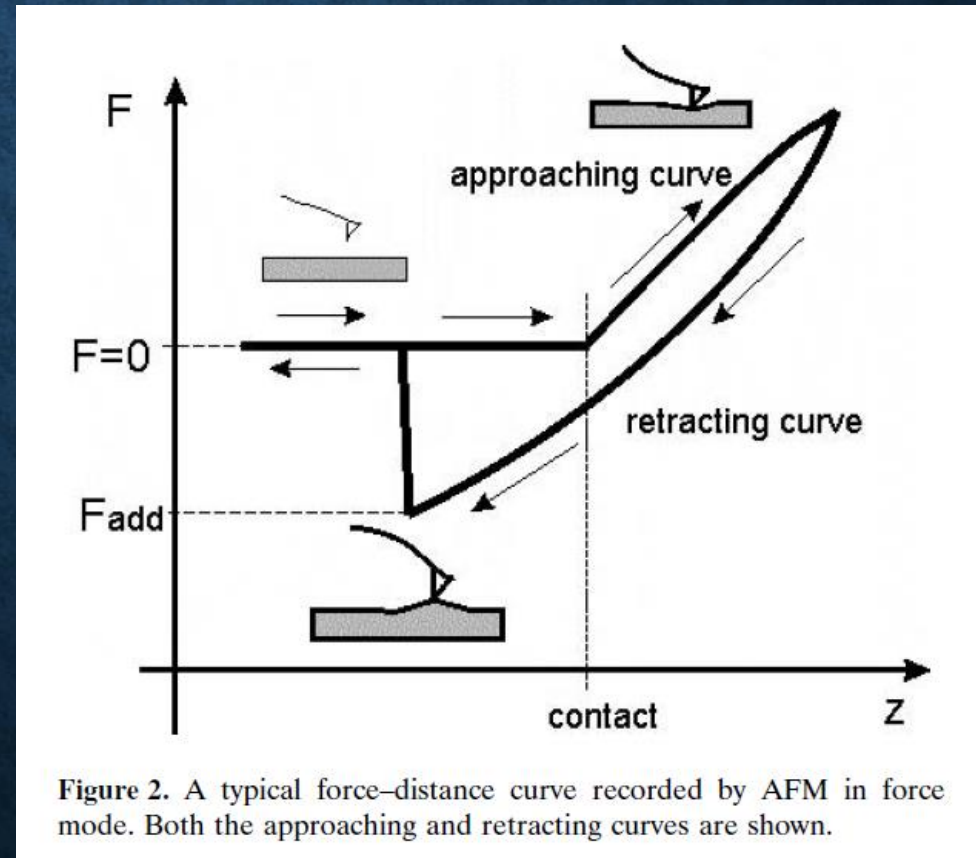
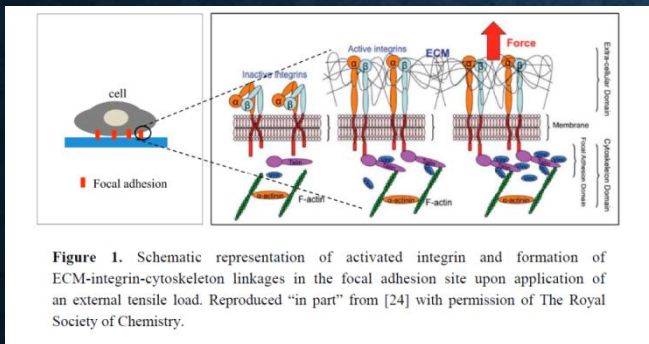


Mapa adhezji (E), mapa sztywności (F) i topografia (G) komórek glejaka ludzkiego U87MG.

# ADHEZJA

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

*Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16



# WARTOŚCI MODUŁU YOUNGA RÓŻNYCH PRÓBEK BIOLOGICZNYCH

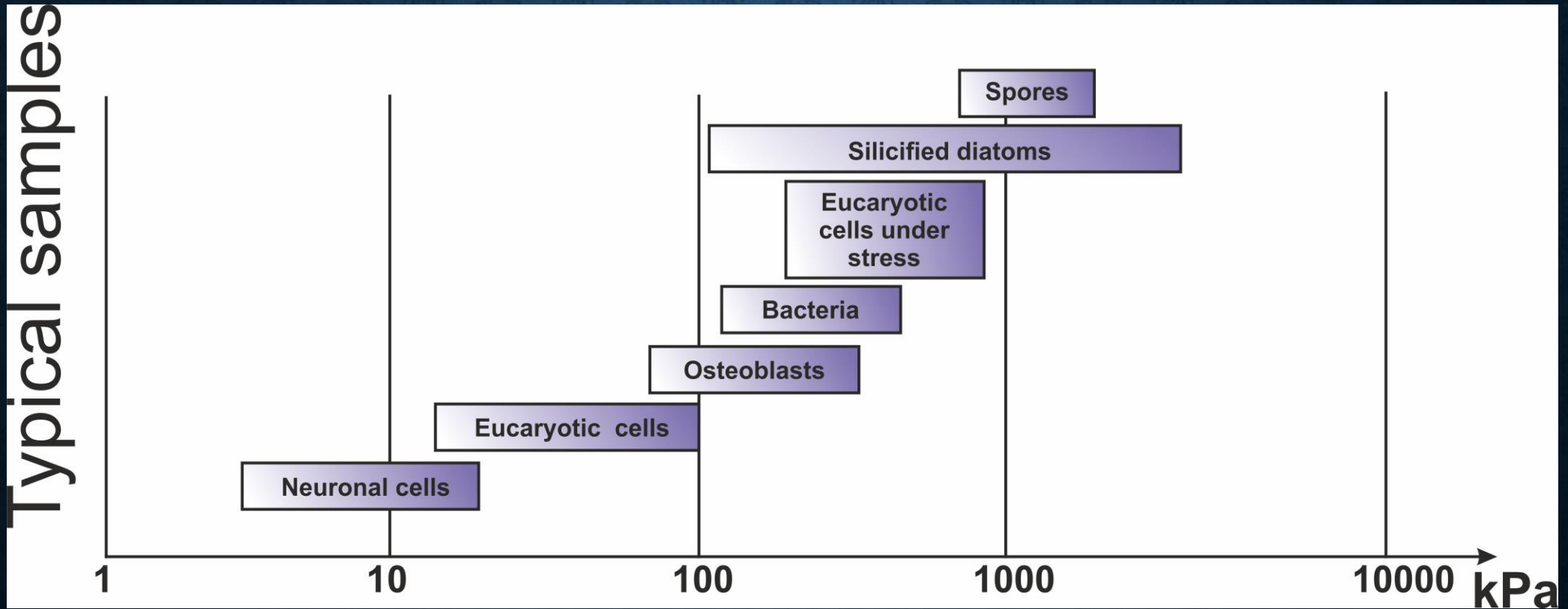


Figure 4. Range of Young's modulus values of various biological samples. Young's modulus is an indicator of a cell's response to stress (force). Depending on their type, eukaryotic cells can exhibit very different mechanical properties. Neurons are extremely soft (down to 1 kPa), whereas bone cells are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

# **ZALETY OPTYKI NIELINIOWEJ W BADANIACH NOWOTWORÓW**

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

## OPTYKA NIELINIOWA

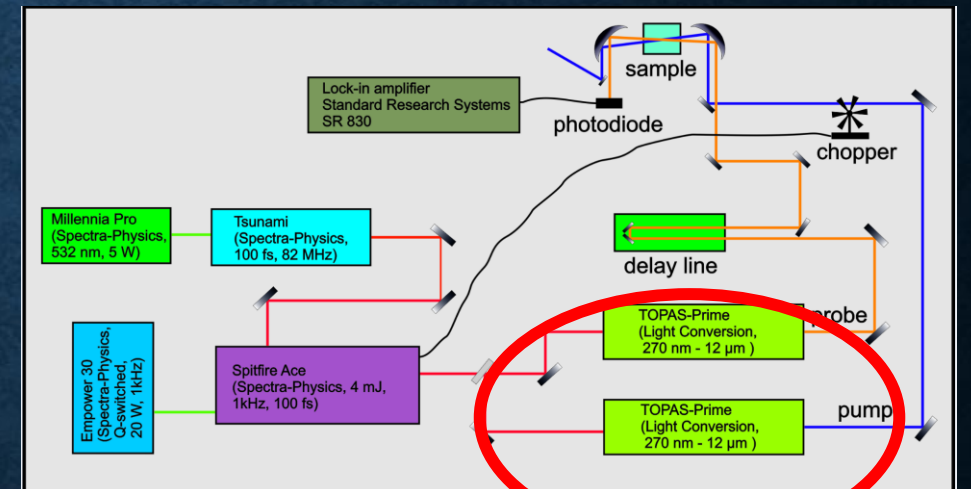
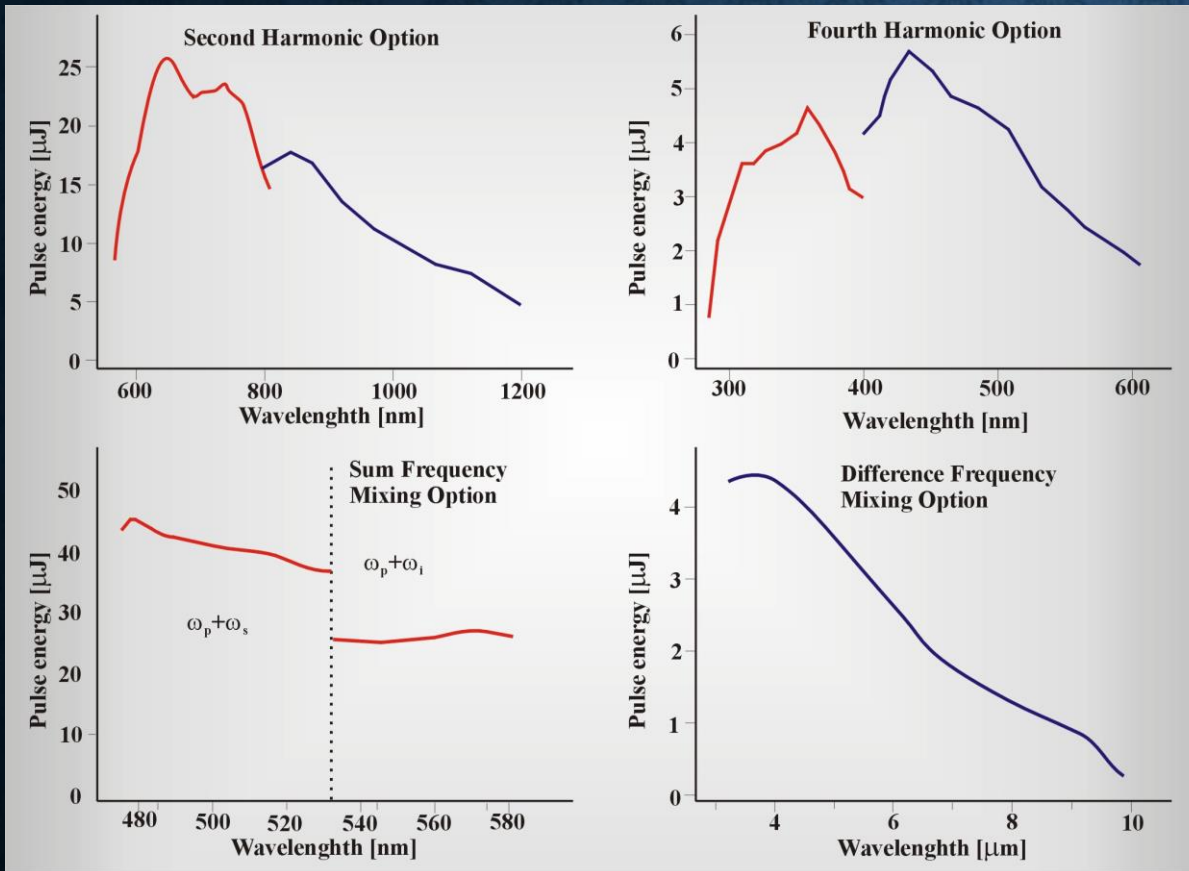
Zastosowanie femtosekundowych impulsów laserowych zamiast szeroko stosowanych impulsów pikosekundowych w kolejnej innowacyjnej funkcji mikroskopu. Dzięki zwiększonej szerokości pasma wzbudzenia krótszych impulsów femtosekundowe impulsy laserowe są w stanie lepiej wzbudzać izolowane rezonanse wibracyjne

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

## OPTYKA LINIOWA

# ZJAWISKA LINIOWE I NIELINIOWE

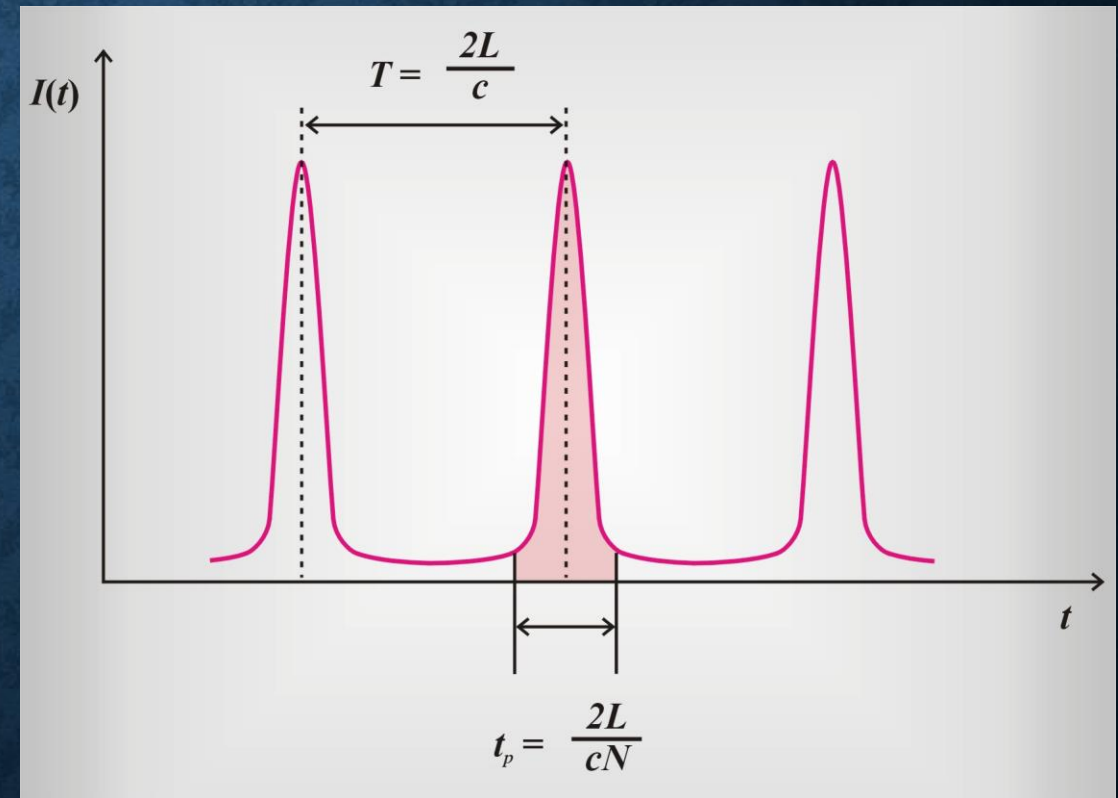
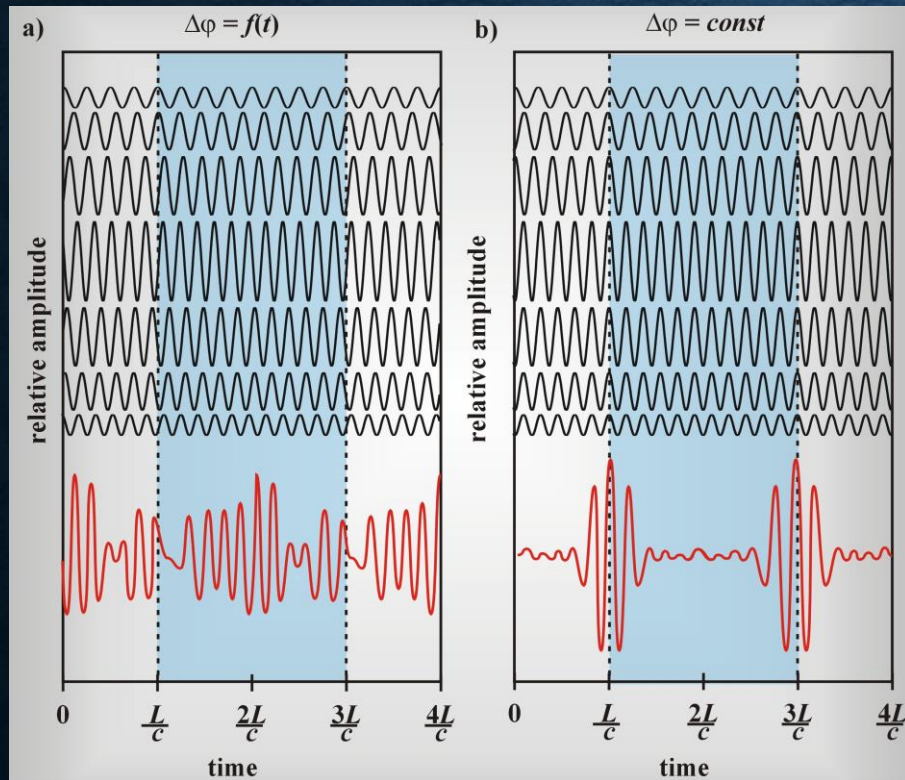
$$P_i = \chi_{ij}^{(1)} E + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l$$



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

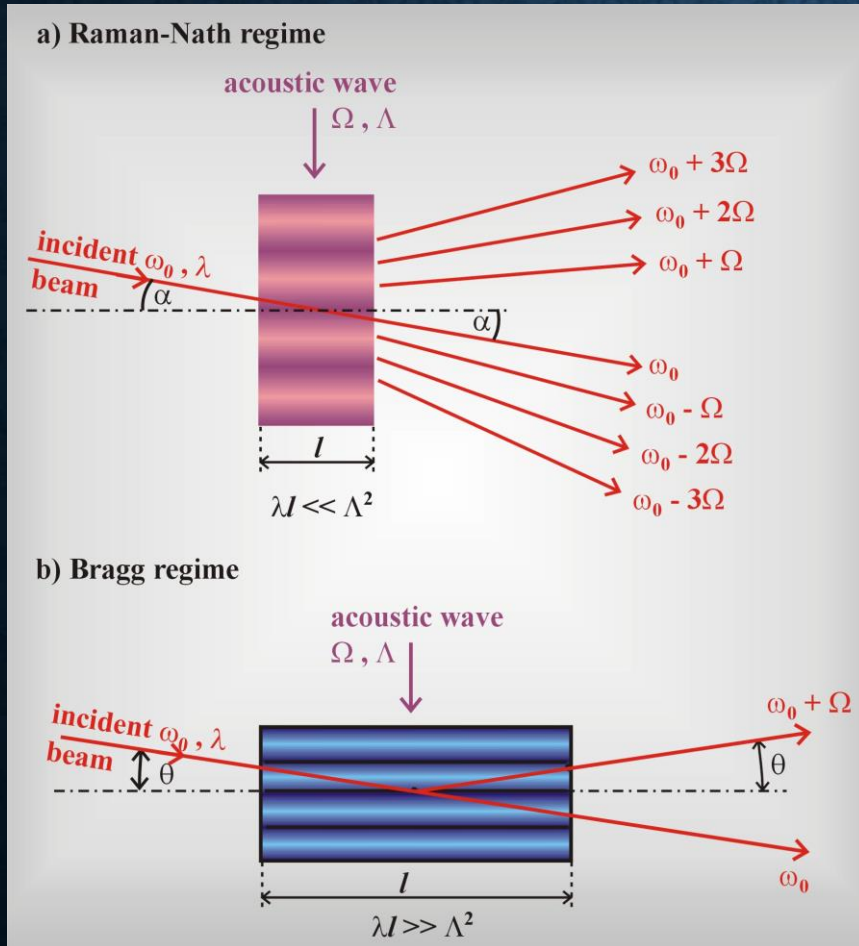


# METODY GENEROWANIA ULTRAKRÓTIKICH IMPULSÓW-SYNCHRONIZACJA MODÓW



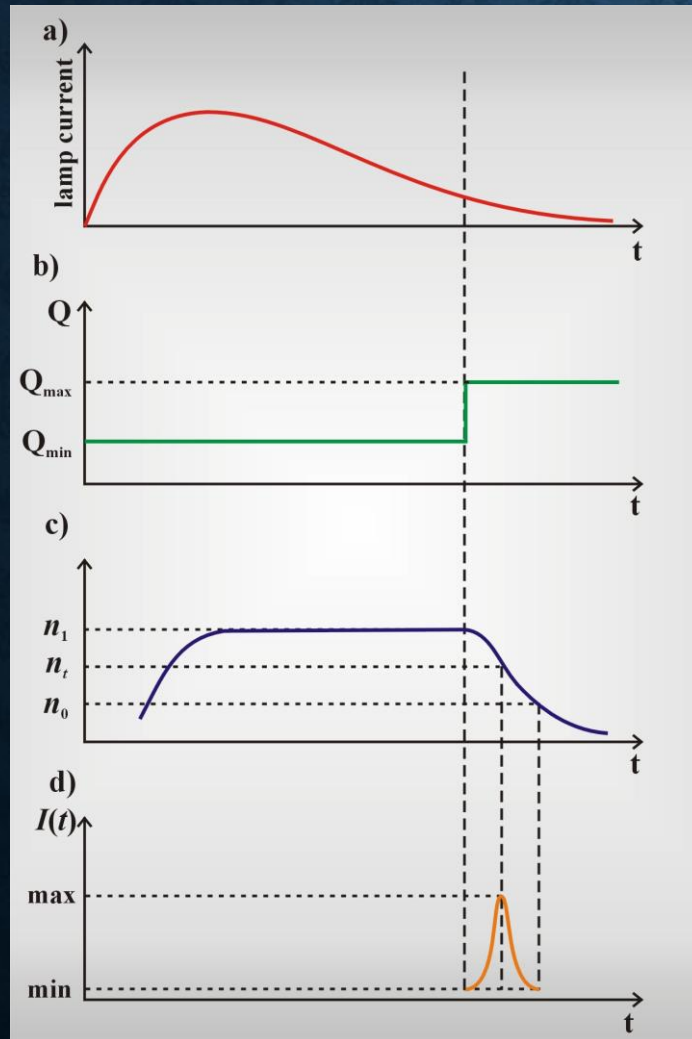
Aby zbadać interakcje nieliniowe, potrzebujemy laserów impulsowych o wysokich mocach szczytowych

# METODY SYNCHRONIZACJI MODÓW



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

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



Mechanizm generowania impulsu  
techniką z przełączaniem dobroci  
(Q-Switch),

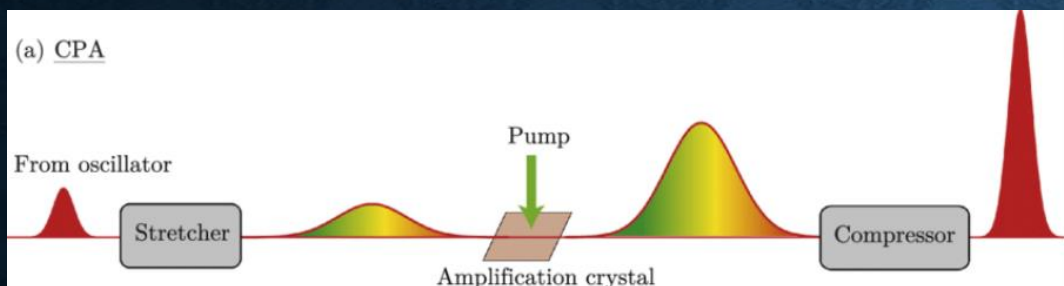
a) pompowanie,

b) przełączanie dobroci,

c) magazynowanie energii,

d) generowanie impulsów

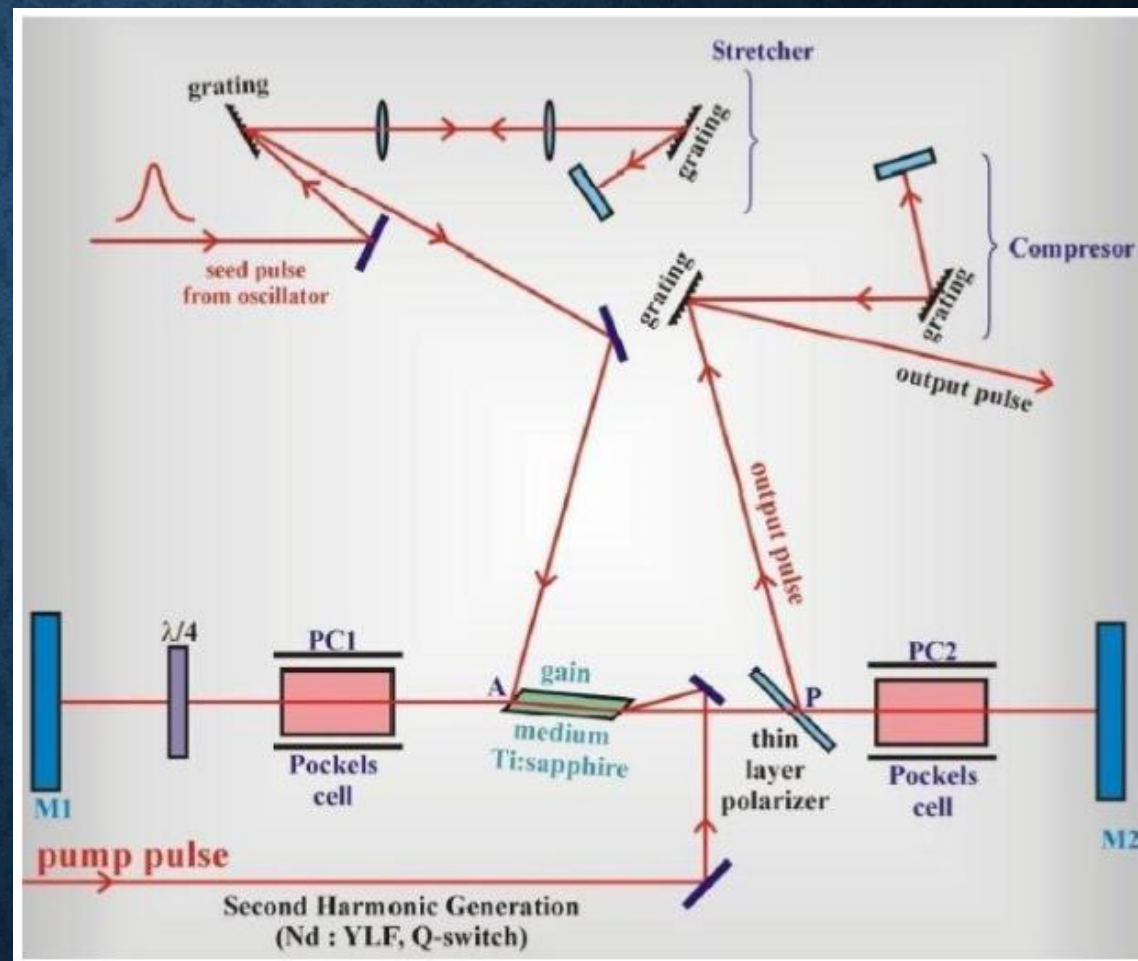
# CHIRPED PULSE AMPLIFICATION (CPA)



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



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

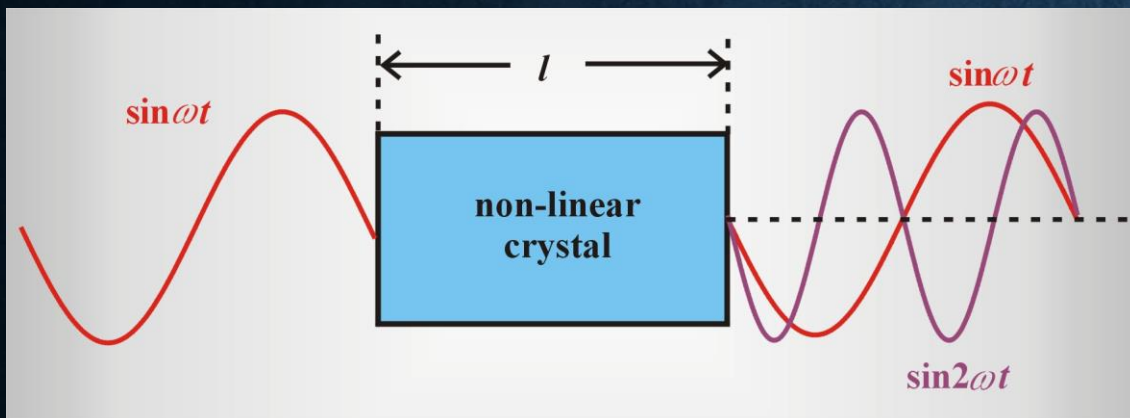


CPA to najnowocześniejsza technika używana przez wszystkie lasery o największej mocy (powyżej 100 TW)

# ZJAWISKA NIELINIOWE DRUGIEGO RZĘDU

$$P_i = \chi_{ij}^{(1)} E + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l$$

**GENERACJA DRUGIEJ  
HARMONICZNEJ (SHG)**



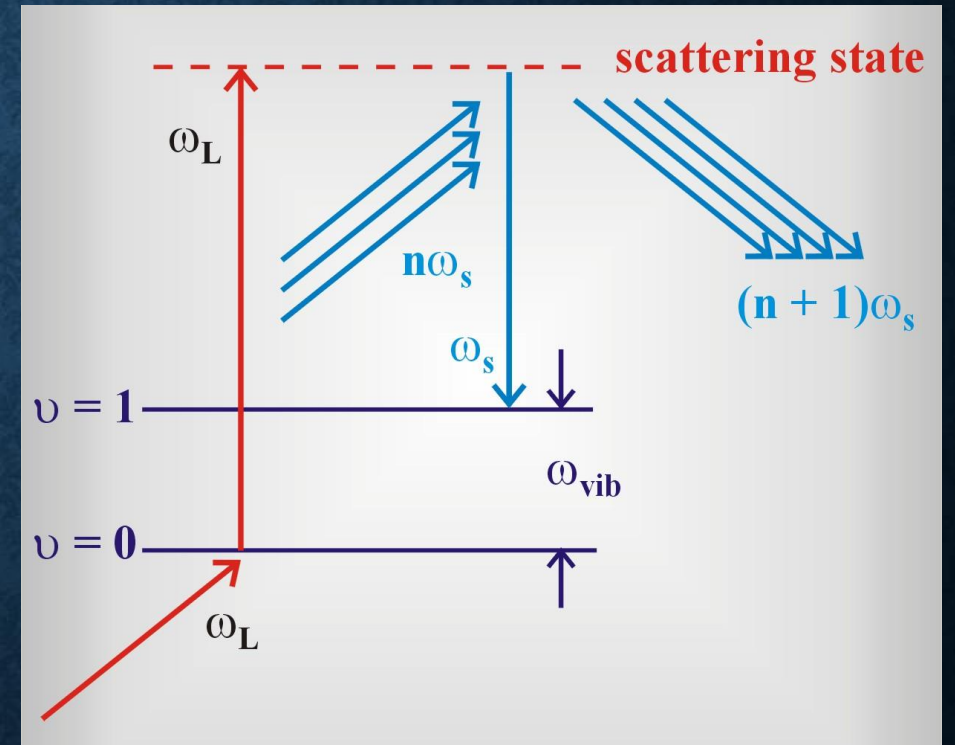
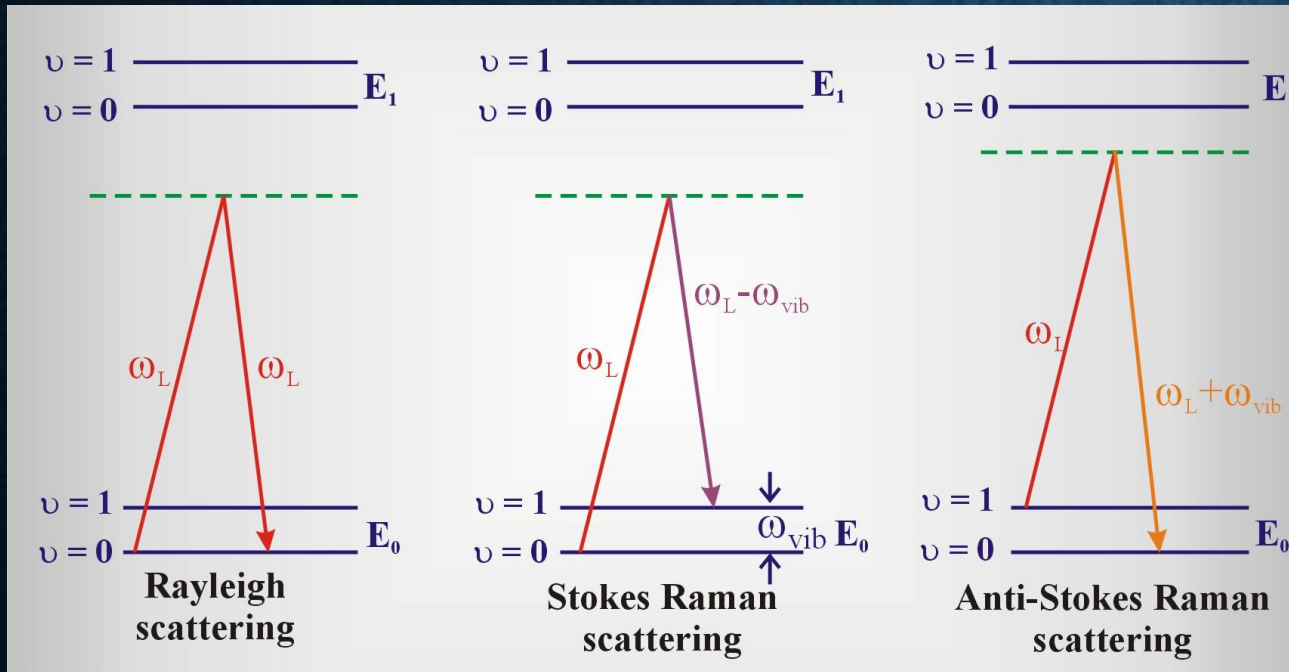
# ZJAWISKA NIELINIOWE TRZECIEGO RZĘDU

$$P_i = \chi_{ij}^{(1)} E + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l$$

**WYMUSZONE ROZPRASZANIE RAMANA**

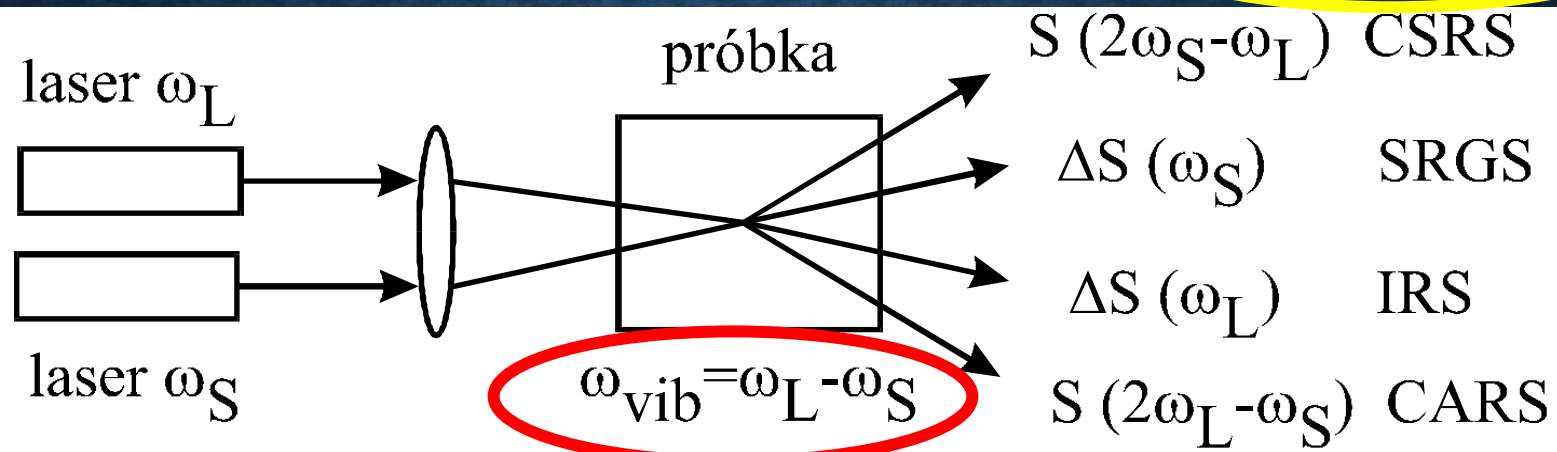
**SPEKTROSKOPIA ABSORPCJI PRZEJŚCIOWEJ  
METODĄ WIĄZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ**

# WYMUSZONE ROZPRASZANIE RAMANA



# ZJAWISKA NIELINIOWE TRZECIEGO RZĘDU

$$P_i = \chi_{ij}^{(1)} E + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l$$

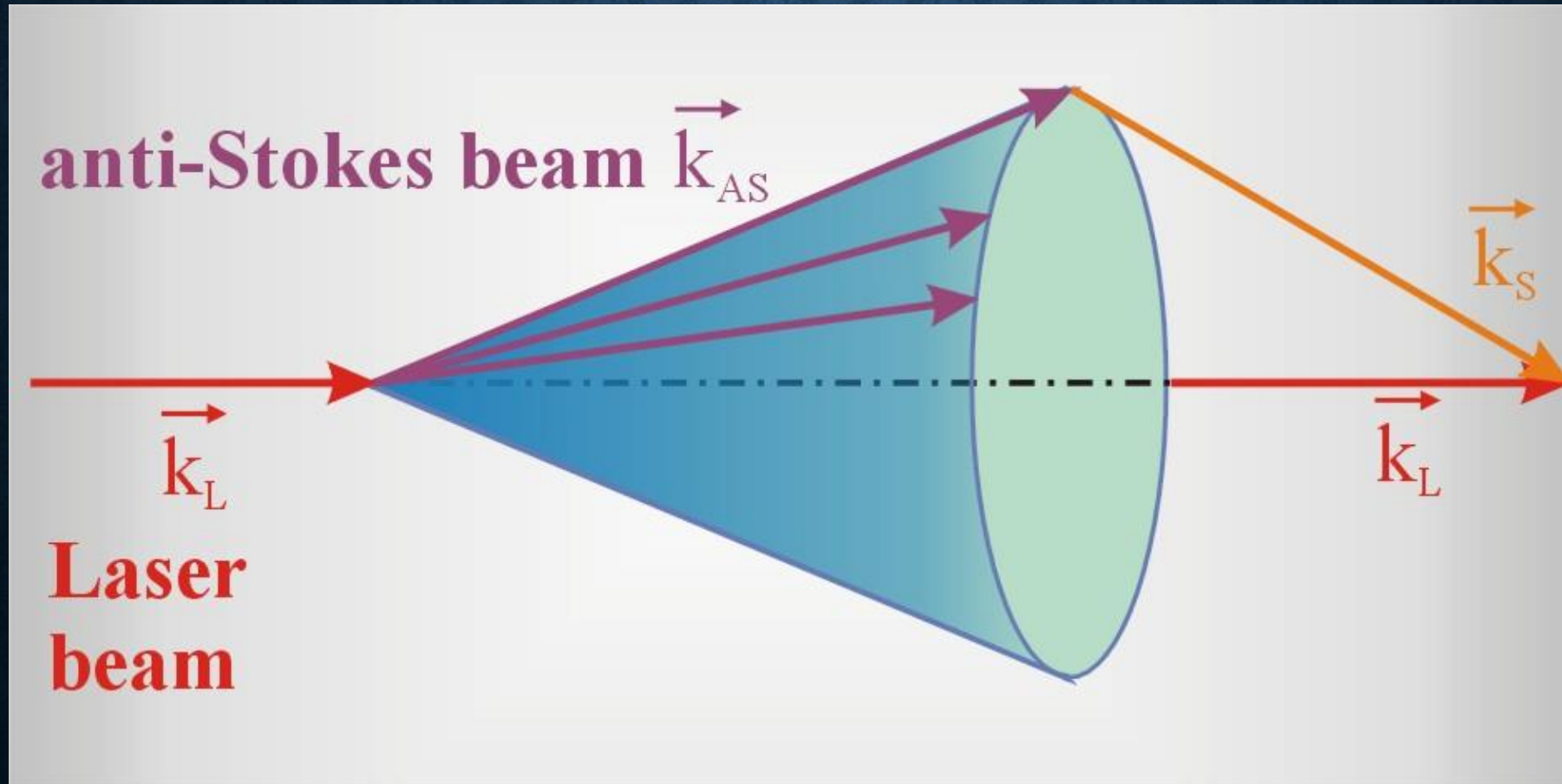


Rys. 6.19. Schematyczny diagram najczęściej stosowanych technik nieliniowego wymuszonego rozpraszania Ramana

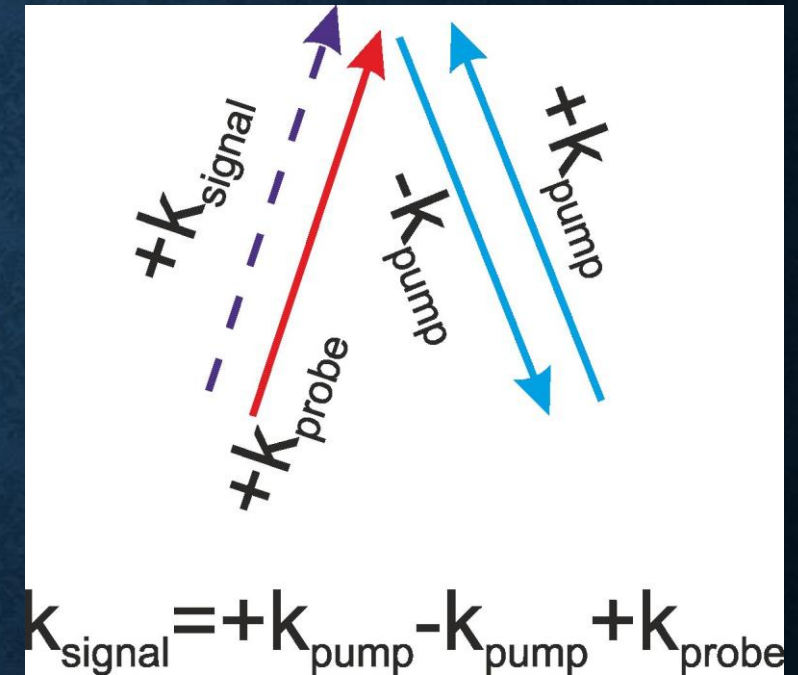
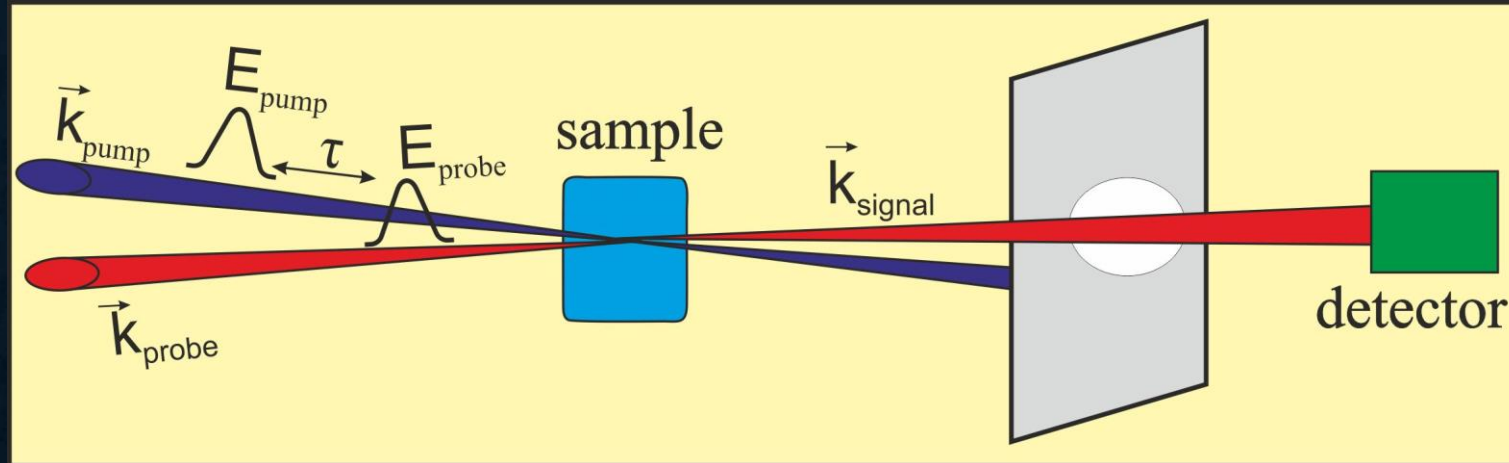


# CARS

KIERUNEK PROPAGACJI STYMULOWANEGO  
ANTYSTOKESOWSKIEGO ROZPRASZANIA RAMANA



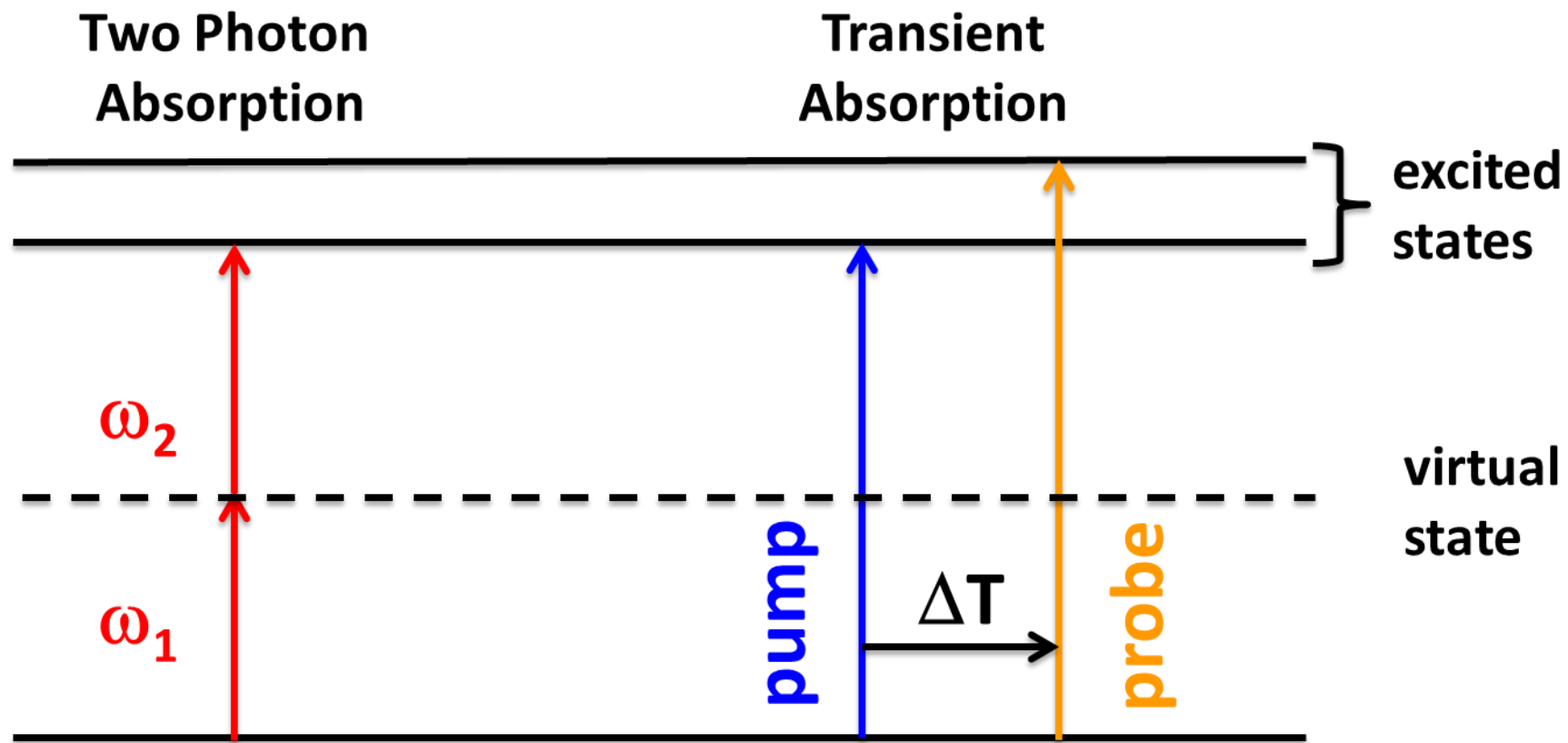
# SPEKTROSKOPIA ABSORPCJI PRZEJŚCIOWEJ METODĄ WIĄZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ



$$\Delta I(\tau) = 2\omega_{\text{sig}} \text{Im} [E_{\text{pr}} P^{(3)}(\tau)]$$

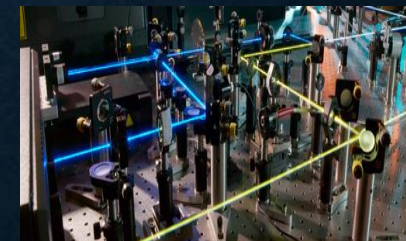
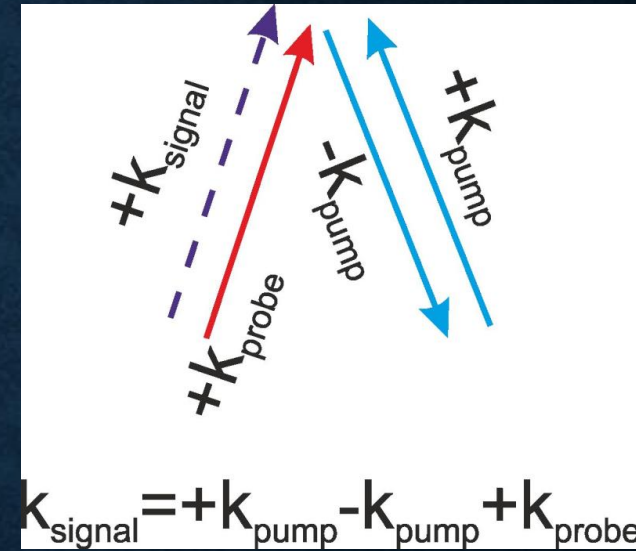
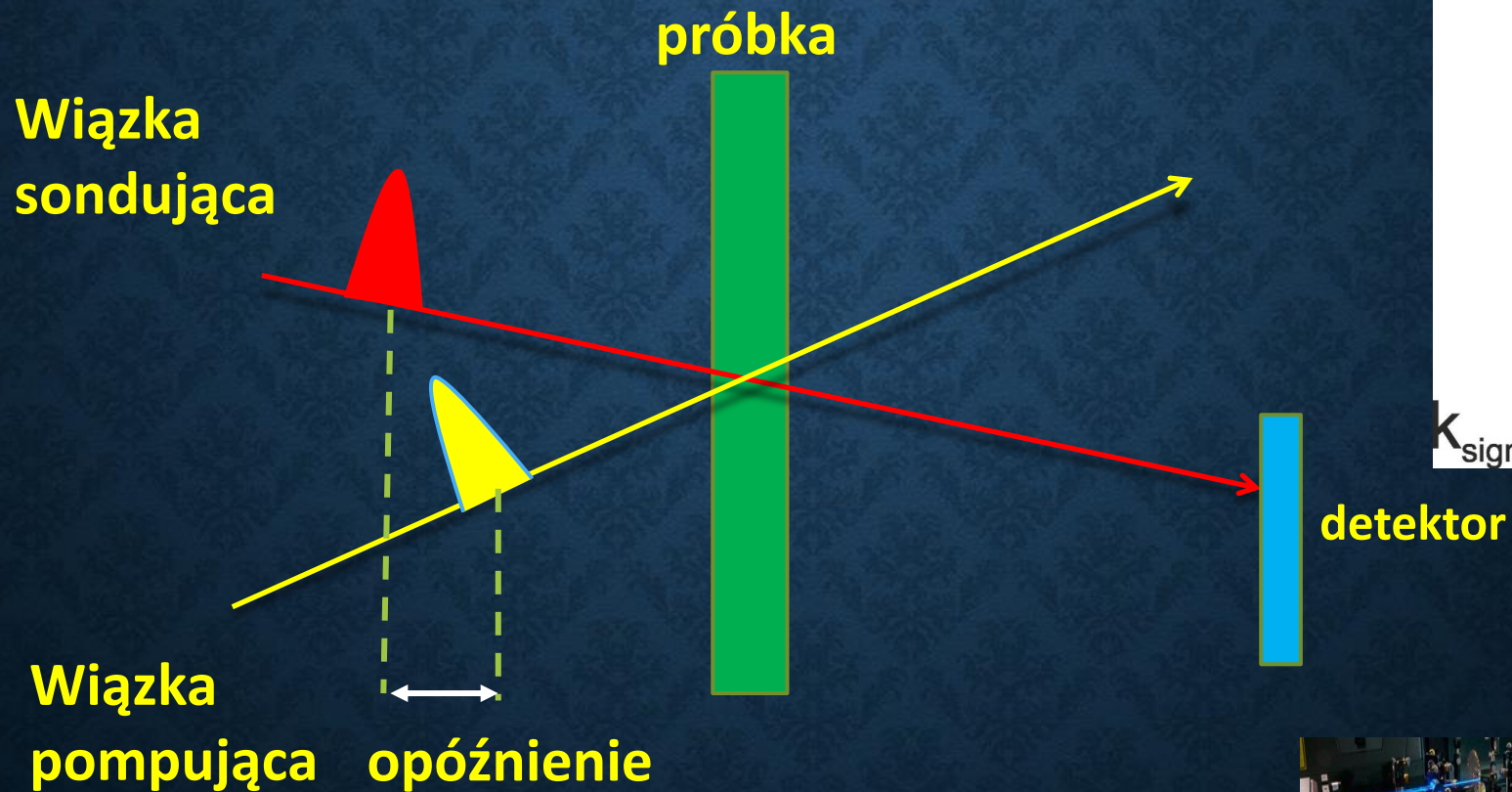
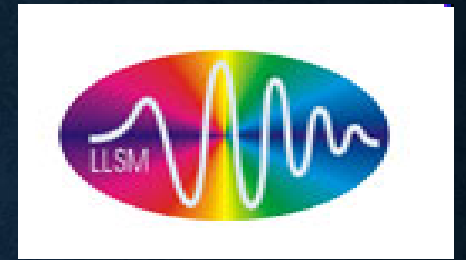
Eksperyment z wykorzystaniem pomiarów absorpcji przejściowej metoda wiązki pompującej i sondującej jest prawdopodobnie najczęściej stosowanym eksperymentem nieliniowym trzeciego rzędu. Może być używany do śledzenia wielu typów procesów relaksacji zależnych od czasu i dynamiki chemicznej i jest najczęściej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

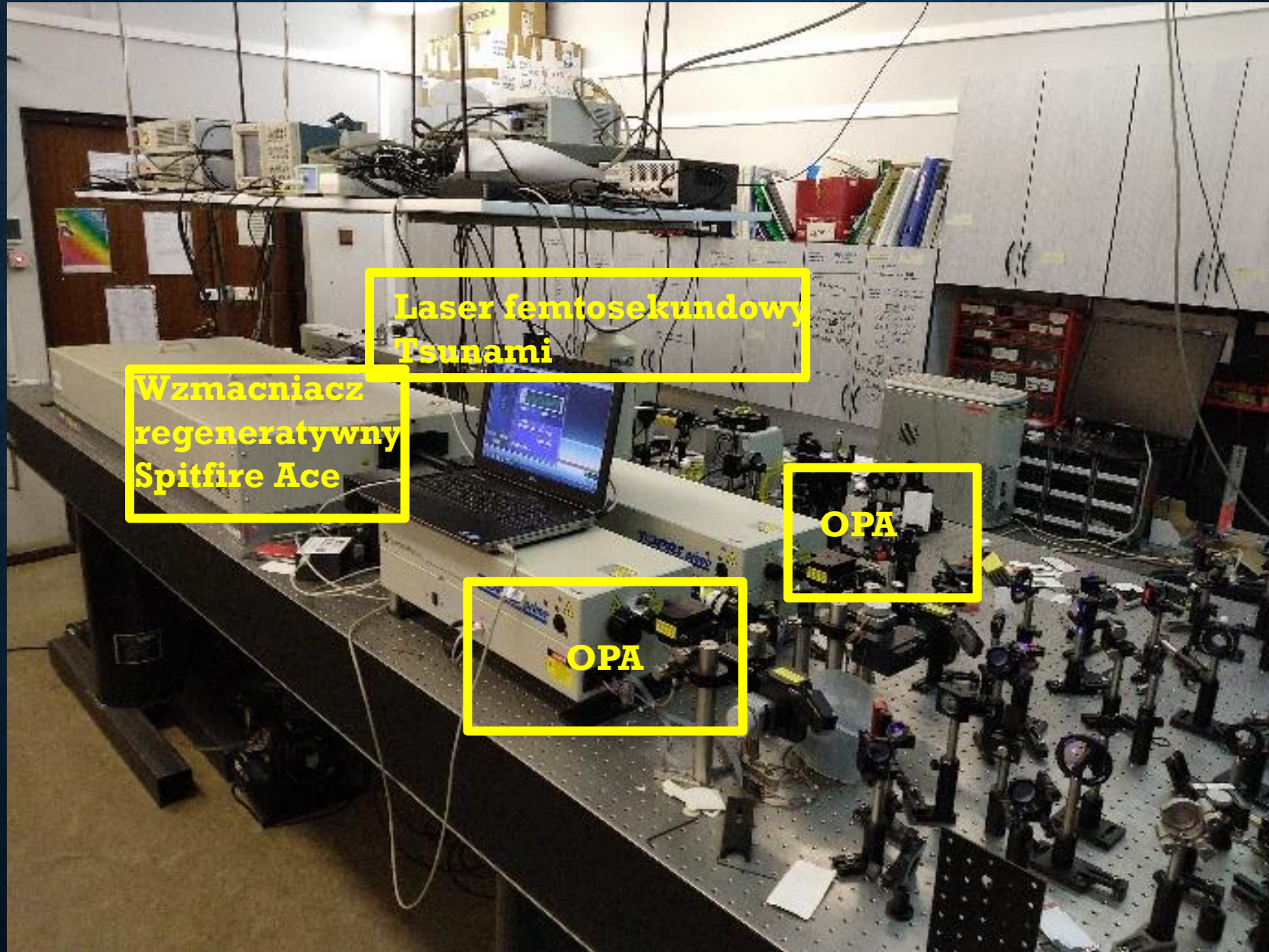
# TRANSIENT ABSORPTION MICROSCOPY



*Examples for nonlinear absorption processes*

# SPEKTROSKOPIA ABSORPCJI PRZEJŚCIOWEJ METODA WIĄZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ





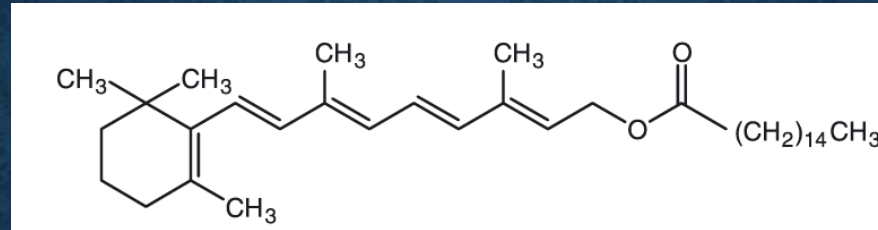
# **ROLA RETINOIDÓW W PRZEWODZENIU SYGNAŁÓW KOMÓRKOWYCH**

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

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

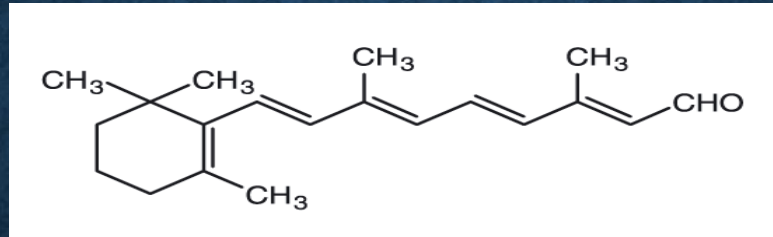
# RETINOIDY

ester



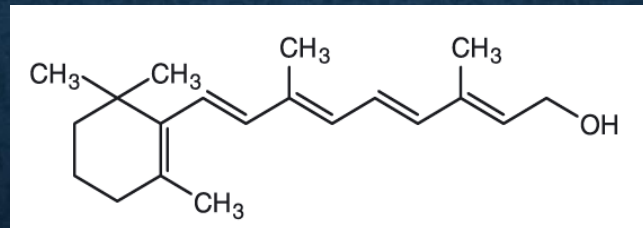
Retinyl palmitate

aldehyd



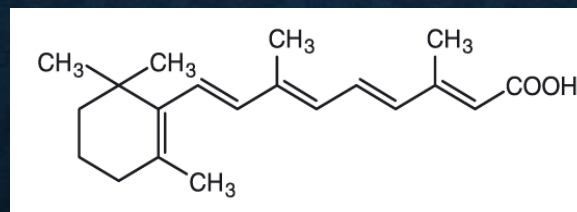
All-trans retinal

alkohol



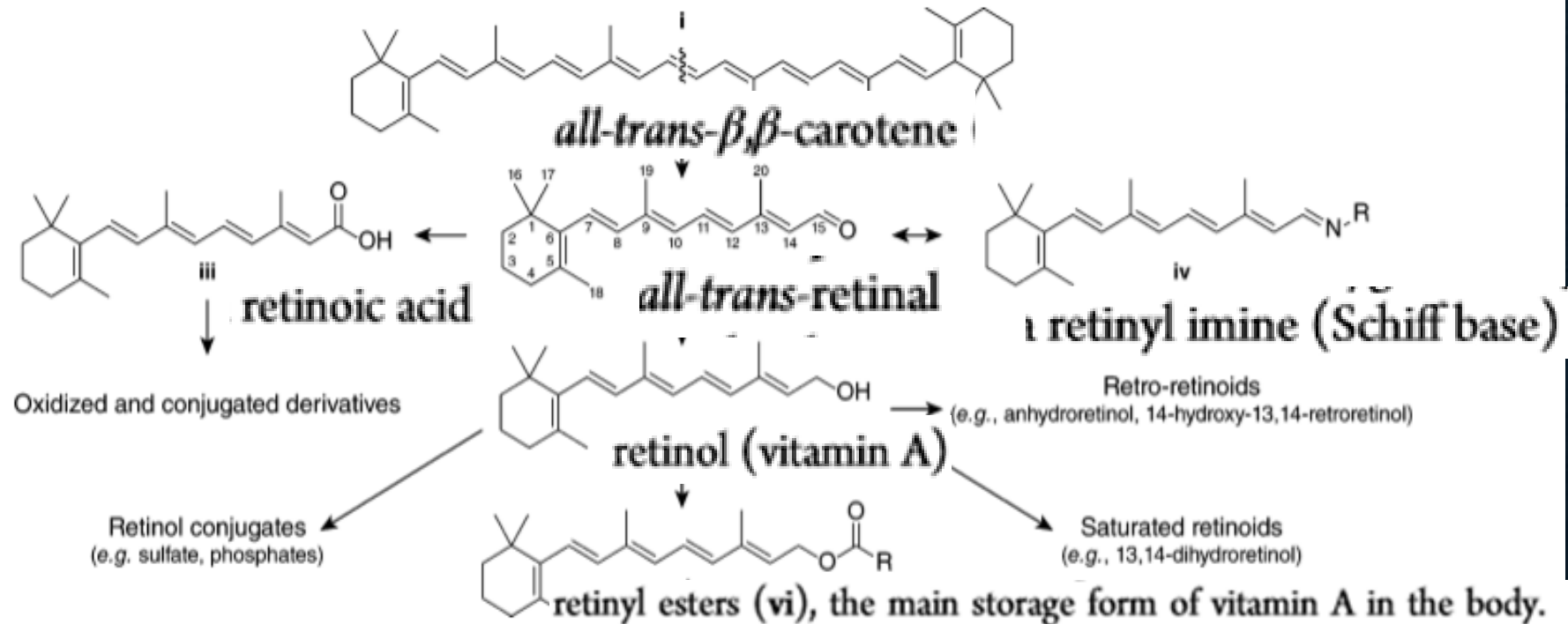
Retinol

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



Retinoic acid

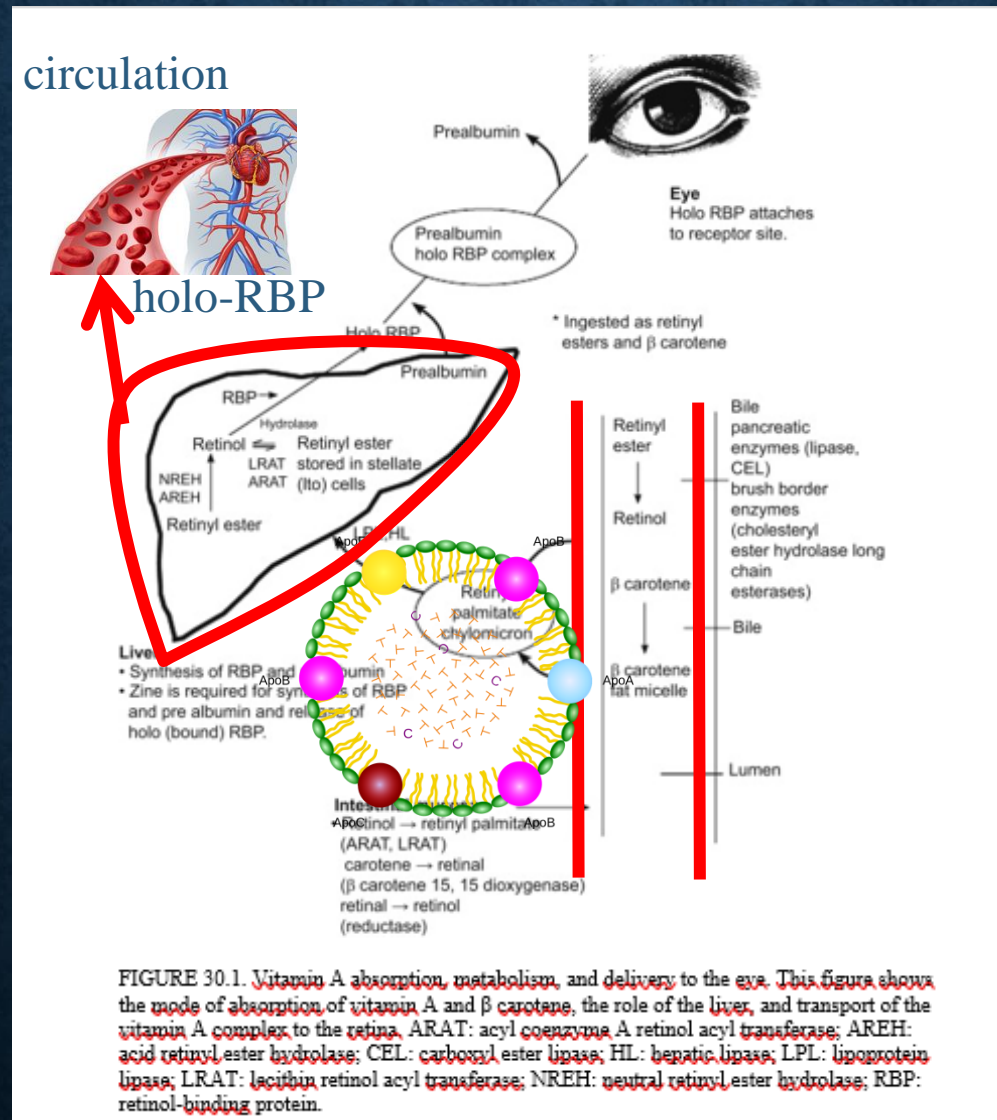
# METABOLIZM RETINOIDÓW U KRĘGOWCÓW



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



# WCHŁANIANIE WITAMINY A, METABOLIZM I DOSTARCZANIE DO OKA



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

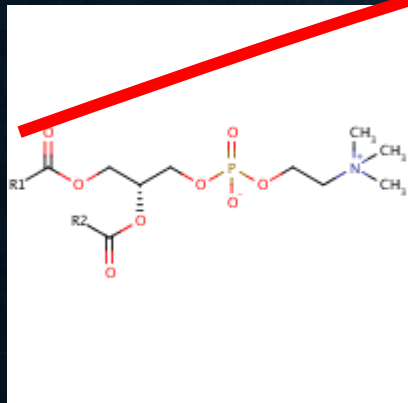
Komórkowe białka wiążące retinoidy (CRBP) (ang. **Cellular retinoid-binding proteins (CRBP)**)

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

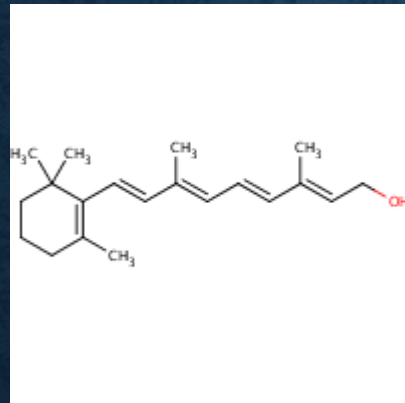
**Komórki gwiaździste wątroby**  
Komórki gwiaździste wątroby znajdują się pomiędzy hepatocytami a małymi naczyniami krwionośnymi w wątrobie. Charakteryzują się obecnością kropelek lipidowych i cienkimi wypustkami rozciągającymi się wokół naczyń krwionośnych. Ich aktywacja w uszkodzonej wątrobie prowadzi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

# LRAT

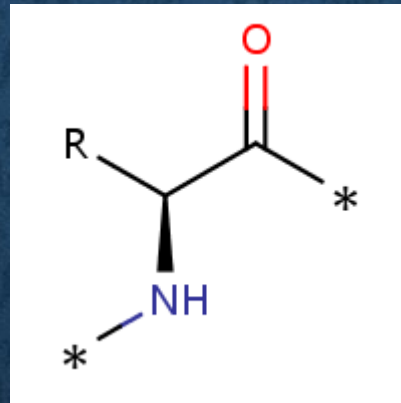
## ACYLOTRANSFERAZA RETINOLOWA LECYTyny



a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

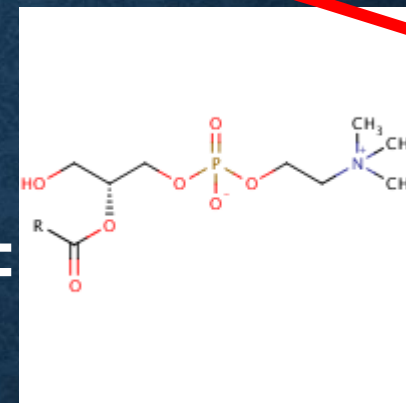


*all-trans*-retinol

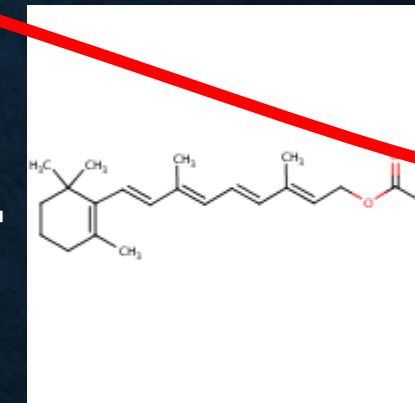


an L- $\alpha$  amino acid residue

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



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



an *all-trans*-retinyl ester

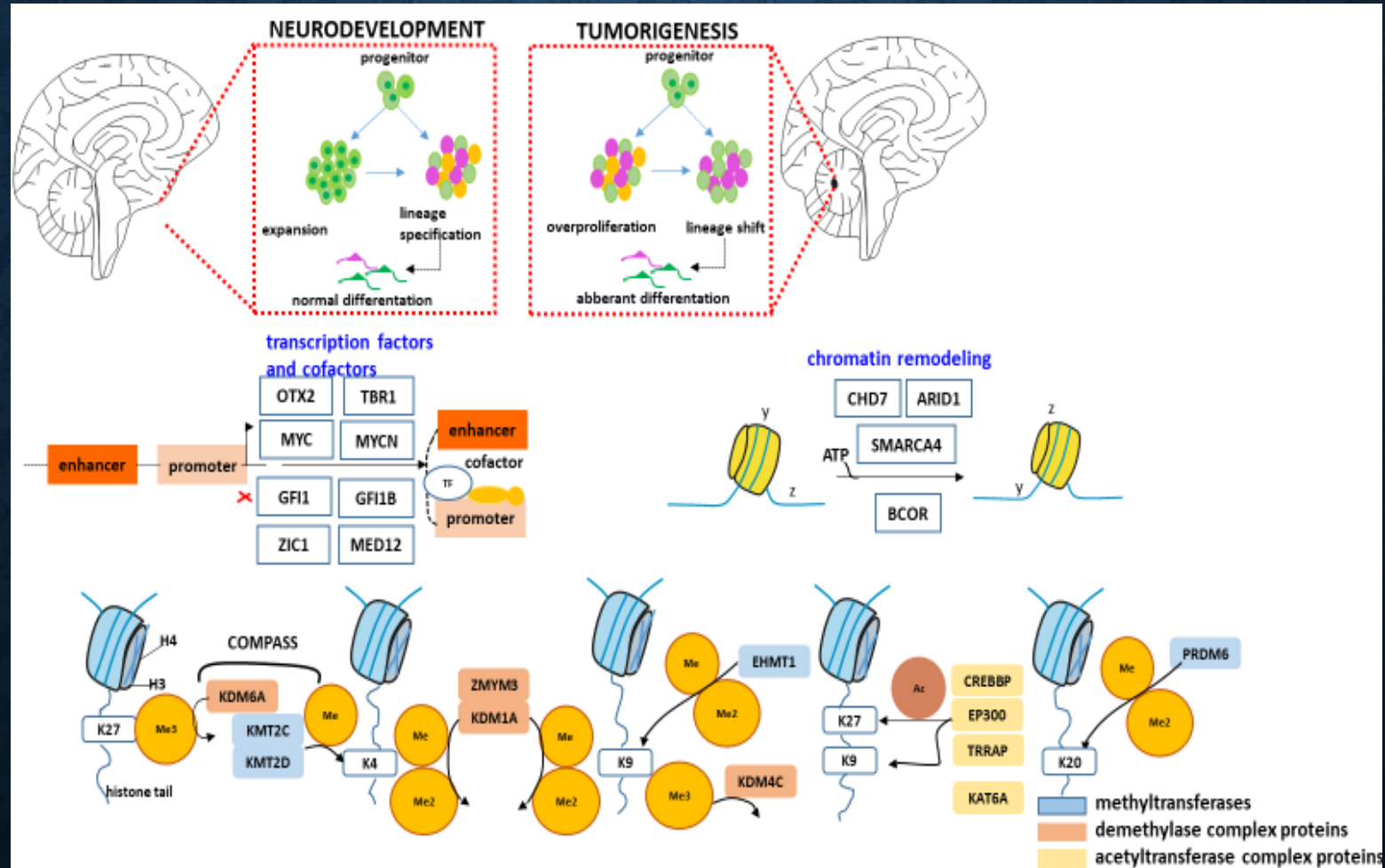
**LRAT przenosi grupę acylową z pozycji sn-1 fosfatydylocholiny na *all-trans* retinol, wytwarzając estry *all-trans*-retinyłowe. Estry retinyłu są magazynami witaminy A.**

# MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE W PATOGENEZIE GUZA MÓZGU

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

Czy glejak wielopostaciowy jest złośliwą zmianą o podłożu epigenetycznym?

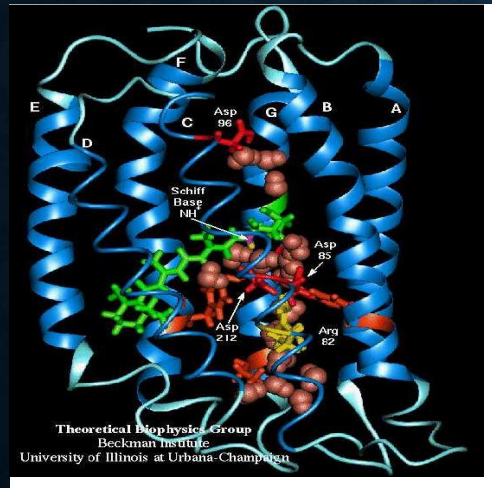
# GENY MODYFIKUJĄCE HISTONY I ZMIANY EPIGENETYCZNE W RDZENIAKU



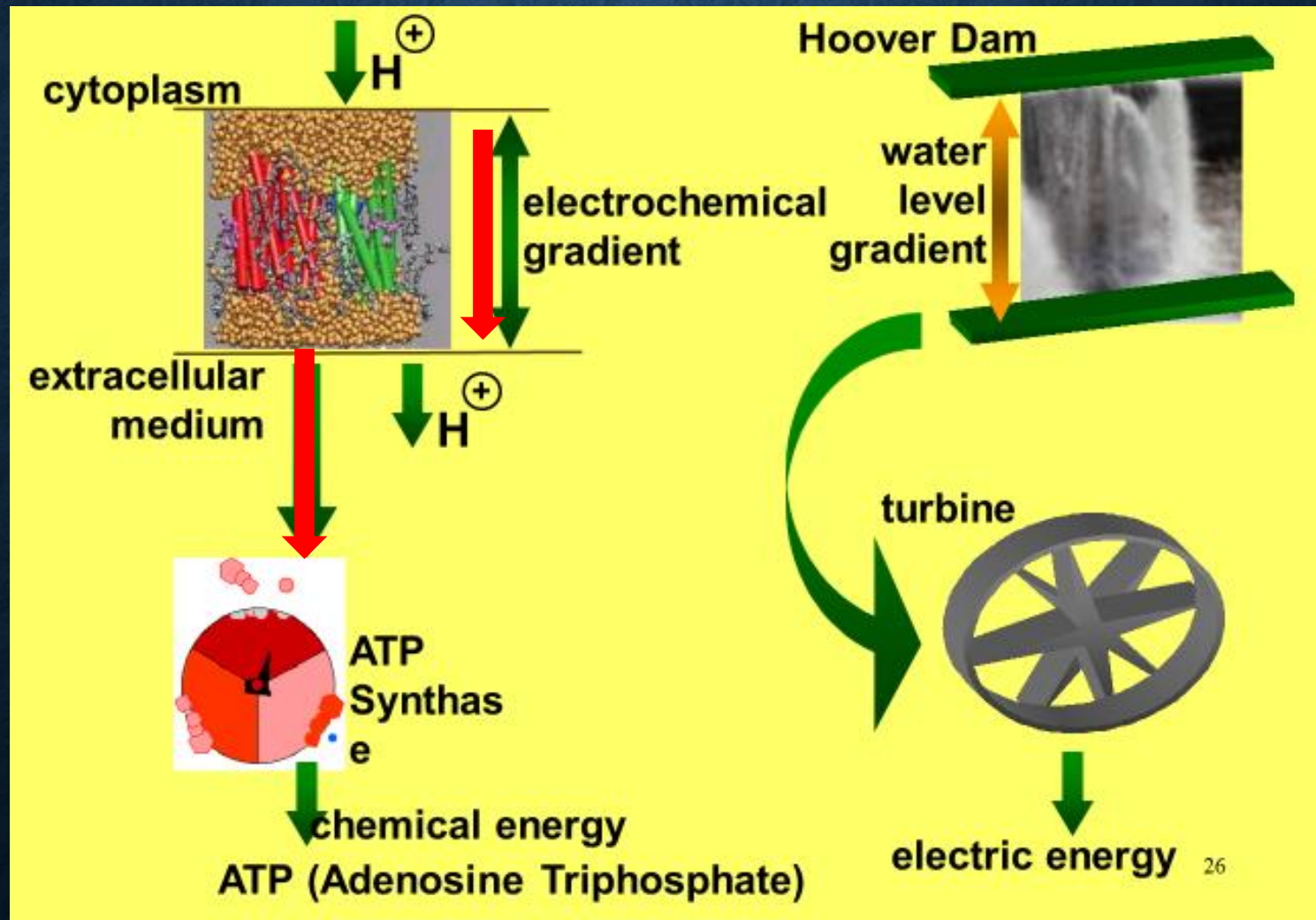
# KOMÓRKOWA TRANSDUKCJA SYGNAŁU

- Witamina A odgrywa ważną rolę w przewodzeniu sygnałów komórkowych w wielu ważnych procesach. Gradient protonowy wywołuje syntezę ATP. Istnieją dwa rodzaje generowania gradientu protonów.
- **mechanizm aktywowany światłem w procesach widzenia (rodzina rodopsyn)**
- 
- **łańcuch transportu elektronów tworzy gradient protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, który napędza syntezę ATP poprzez chemiosmozę.**
-

# Aktywowany światłem mechanizm generowania gradientu protonów



Aktywacja światłem  
wyzwała izomeryzację  
trans do cis  
związanego retinalu



Działa jak pompa protonowa; to znaczy wychwytuje energię świetlną i wykorzystuje ją do przemieszczania protonów przez błonę poza komórkę. Powstały gradient protonów w poprzek błony wywołuje syntezę ATP używaną do metabolizmu i fosforylacji przez syntazę ATP

# ŁAŃCUCH TRANSPORTU ELEKTRONÓW TWORZY GRADIENT PROTONÓW W POPRZEK WEWNĘTRZNEJ BŁONY MITOCHONDRIALNEJ, KTÓRY NAPĘDZA SYNTEZĘ ATP POPRZEZ CHEMIOSMOZĘ.

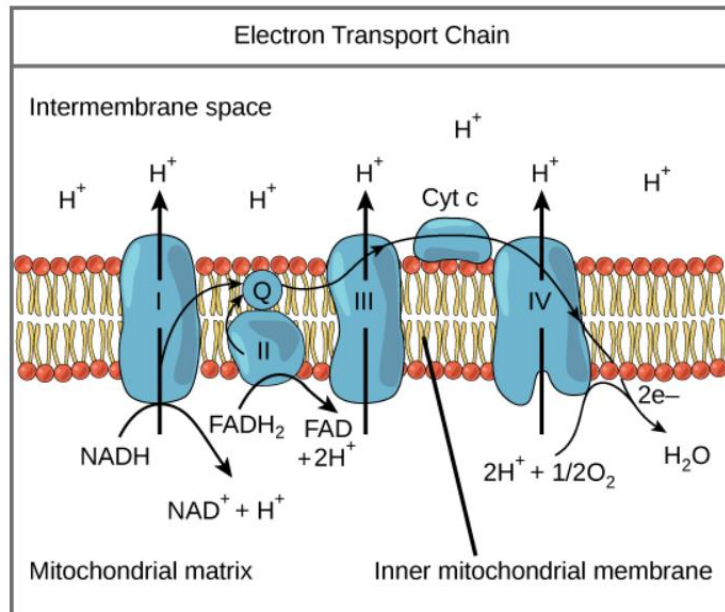
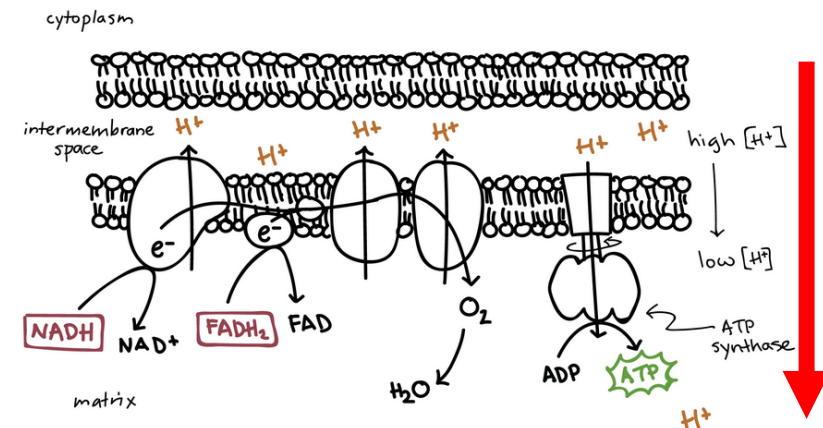


Image modified from "Oxidative phosphorylation: Figure 1", by OpenStax College, Biology (CC BY 3.0).

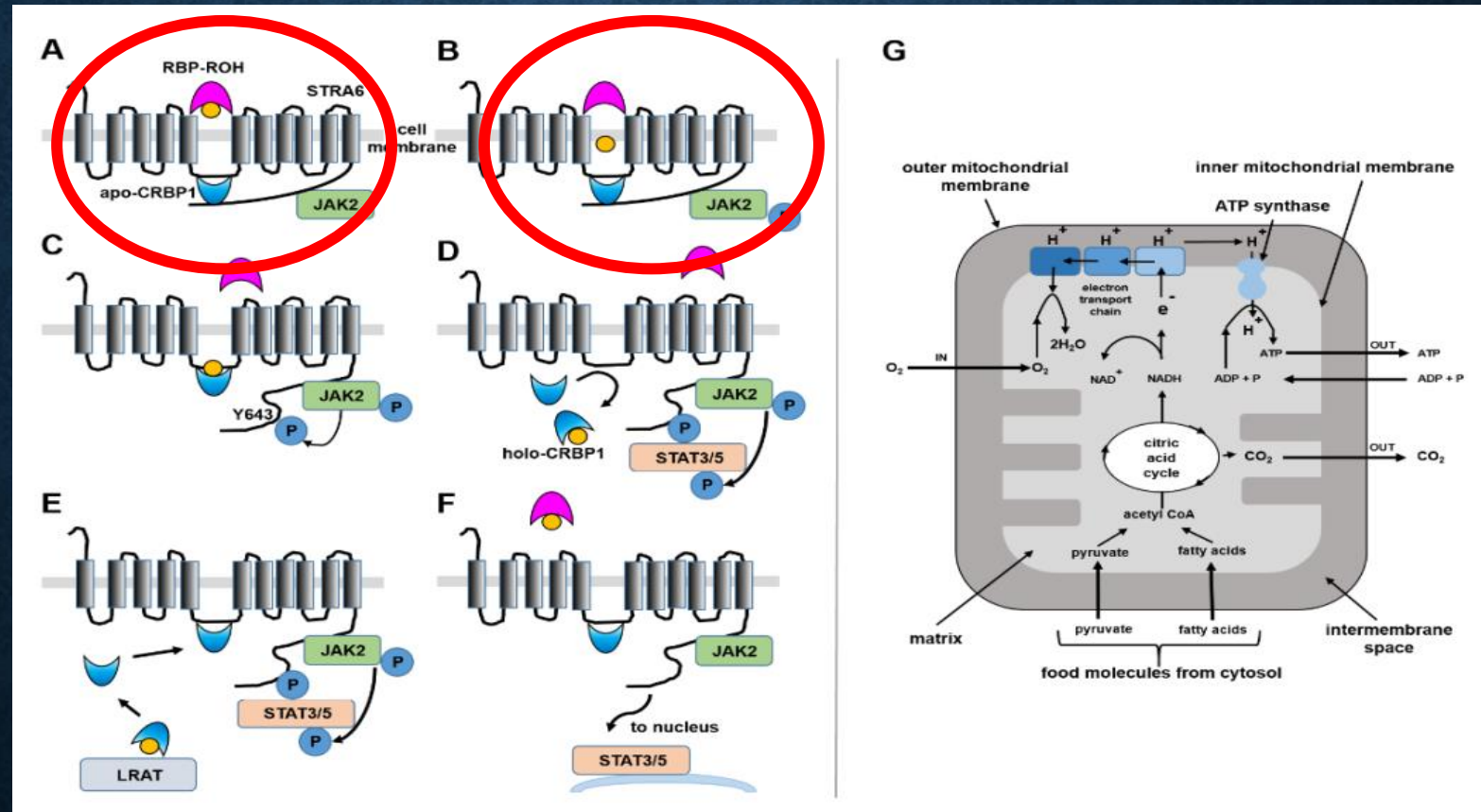
## Overview: oxidative phosphorylation



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

# RETINOIDY ZWIĄZANE Z BIAŁKAMI

## „WOLNE” RETINOIDY

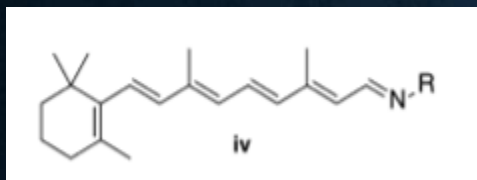
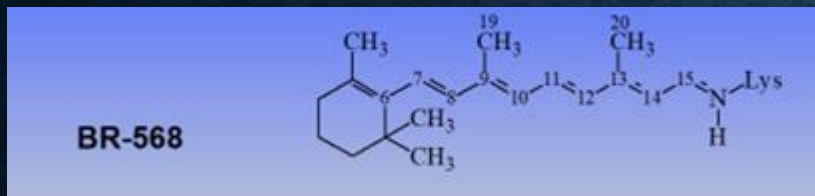




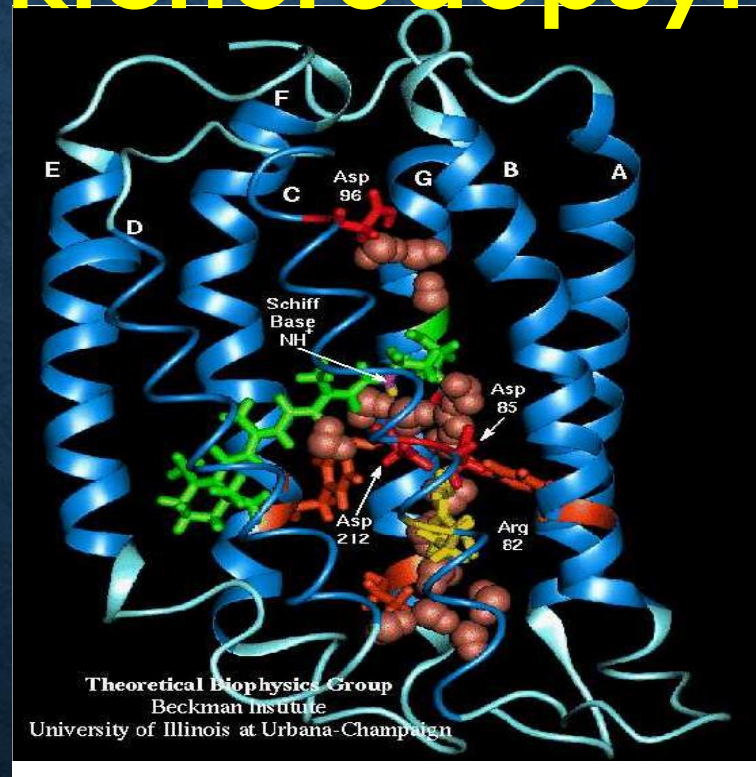
# RETINOIDY ZWIĄZANE Z BIAŁKAMI

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

## bakteriorodopsyna

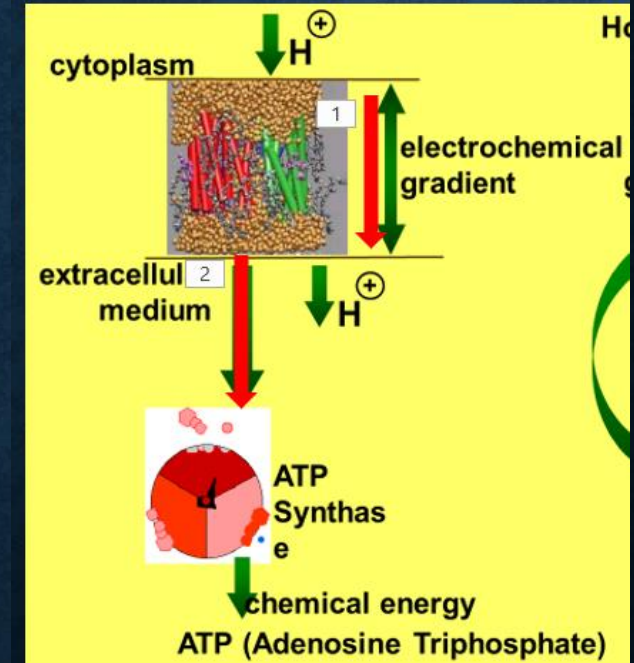
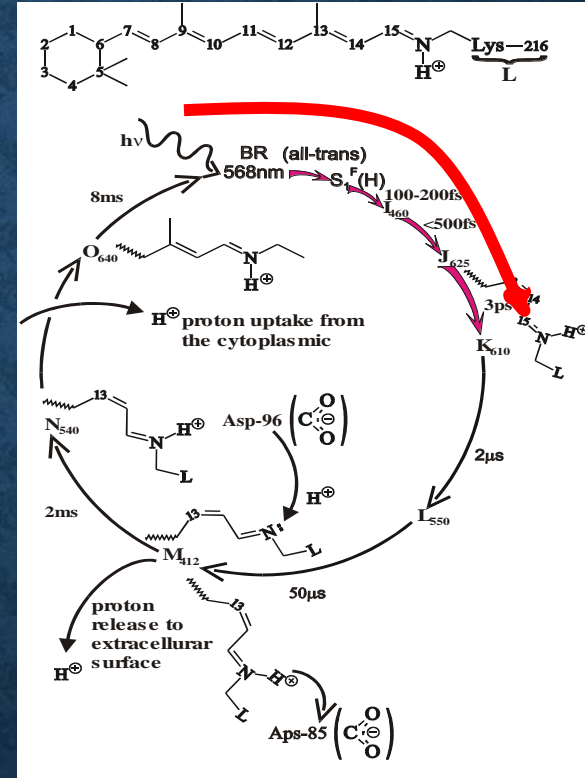
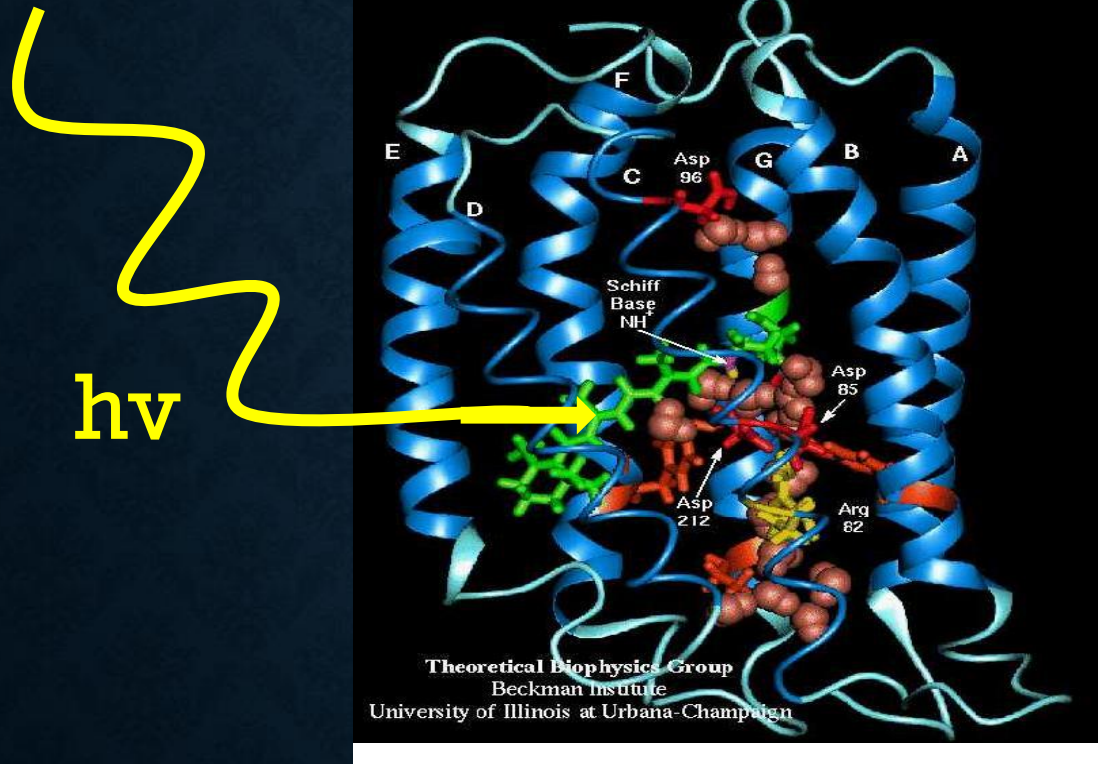


Retinyl imine (Schiff base)



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

# RETINOIDY ZWIĄZANE Z BIAŁKAMI



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



# MIKROSKOPIA SZEROKOPASMOWA CARS (BCARS) VS MIKROSKOPIA POJEDYNCZEJ CZĘSTOTLIWOŚCI CARS

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

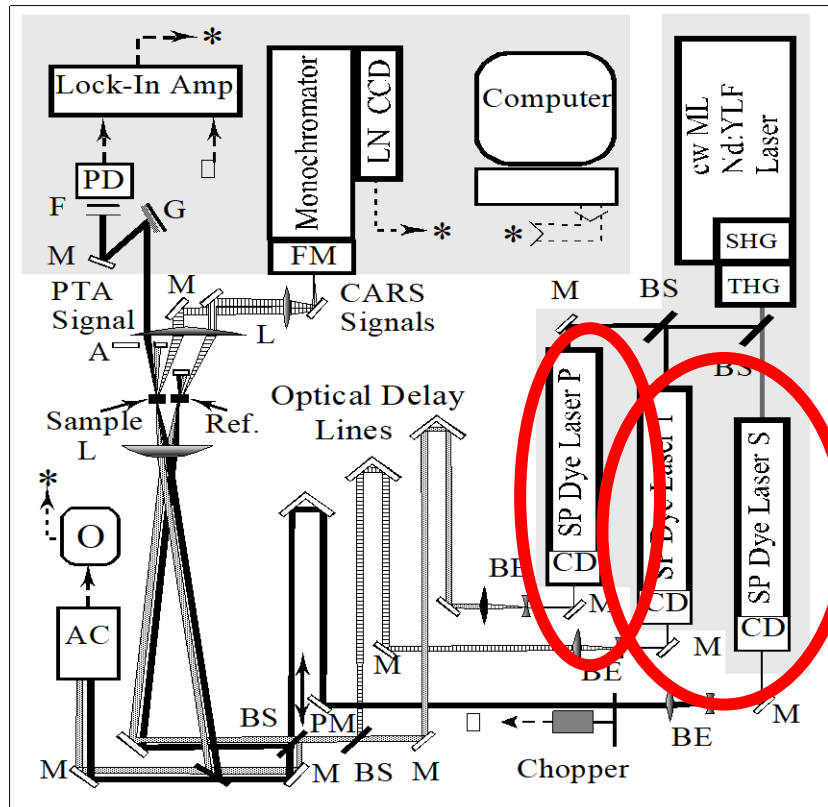
# **CZSOWOROZDZIELCZY CARS**

**DOMENA CZĘSTOŚCI**

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

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

# CARS W SAKLI PIKOSEKUND



**PUMP**

**PROBE**

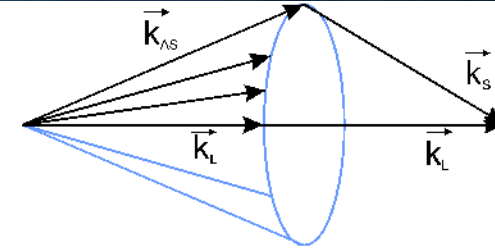


Fig. 4.5. Directions of propagation of the stimulated anti-Stokes scattering

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

To sum up, intense light of the frequency  $\omega_L$  can cause intense stimulated Raman scattering: Stokes  $\omega_S = \omega_L - \omega_{vib}$  and anti-Stokes  $\omega_{AS} = \omega_L + \omega_{vib}$ . As a result of photon interaction with matter, the energy exchange via optical phonons (or vibrations) takes place leading to the formation in a medium the third-order polarisation,  $P^{(3)} \propto \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l$ , that consists of the components changing with the frequency  $\omega_{vib} = \omega_L - \omega_S$ ,  $\omega_S = \omega_L - \omega_{vib}$  and  $\omega_{AS} = \omega_L + \omega_{vib}$ . The polarisation components generate new waves of the frequencies  $\omega_S$  and  $\omega_{AS}$  known as the stimulated Stokes and anti-Stokes Raman scattering. The phase matching condition is met in all directions for the Stokes radiation ( $\Delta \mathbf{k} = 0$ ), so the scattered light is emitted in all directions. The anti-Stokes stimulated scattering is observed in directions,  $\mathbf{k}_{AS}$ , for which the phase matching condition  $2\mathbf{k}_L - \mathbf{k}_S = \mathbf{k}_{AS}$  is met.

W skrócie, impulsy światła z wąskopasmowego (<4 cm<sup>-1</sup>, FWHM) lasera barwnikowego pracującego przy 663 nm (I<sub>1</sub>) i szerokopasmowego (700 cm<sup>-1</sup>) lasera barwnikowego działającego w zakresie 700–750 nm (I<sub>s</sub>) są dopasowane fazowo w płynącym BR (natywny lub zmodyfikowany pigment siatkówki), generując sygnały CARS obejmujące obszar widmowy (I<sub>AS</sub>) około 700 cm<sup>-1</sup>. Aby objąć cały interesujący zakres widmowy 750–1750 cm<sup>-1</sup>, I<sub>1</sub> jest odstrojony o kilka nanometrów lub I<sub>s</sub> jest regulowany przy użyciu innego roztworu barwnika laserowego.

# CARS: teoria

- intensywność sygnału CARS :

$$I_{as}(\omega_{as}) \propto |\chi^{(3)}(\omega_{as}, \omega_1, \omega_s)|^2 \cdot I_1^2 \cdot I_s(\omega_s) \cdot G^2$$

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

$$\frac{I_{as}^{Sample}}{I_{as}^{Reference}} = \mu^2 \left| 1 + (1 - \eta) \sum_{j=1}^{N_A} \frac{A_j e^{i\Theta_j}}{\Delta_j - i} + \eta \sum_{k=1}^{N_B} \frac{A_k e^{i\Theta_k}}{\Delta_k - i} \right|^2$$

$$\Delta_j = (\Omega_j - (\omega_1 - \omega_s)) / \Gamma_j$$

- Natężenie widma bez tła (linie Lorentza):

$$I_{raman} = \sum_{j=1}^N \frac{A_j^2}{(\Omega_j - (\omega_1 - \omega_s))^2 + \Gamma_j^2}$$

$\Omega$  = Band Origin

A = Amplitude

$\Gamma$  = Bandwidth

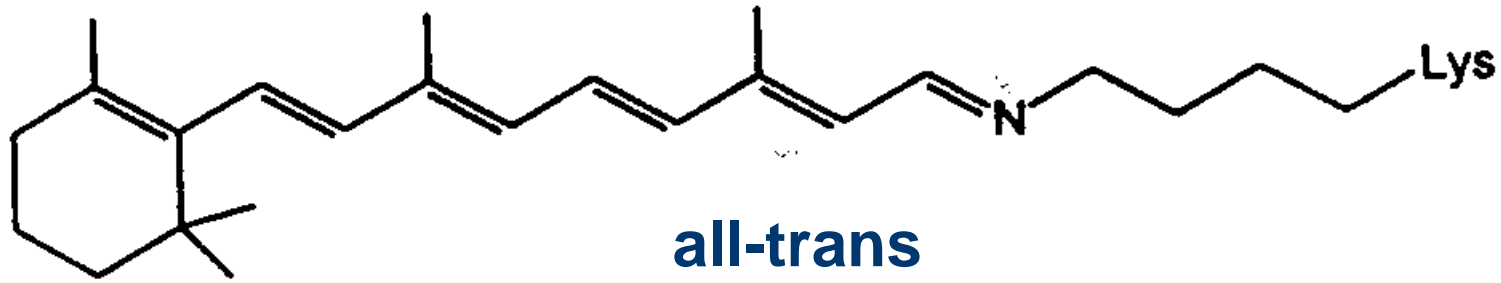
$\Theta$  = Vibrational phase

$\eta$  = relative conc. (0 ≤  $\eta$  ≤ 1)

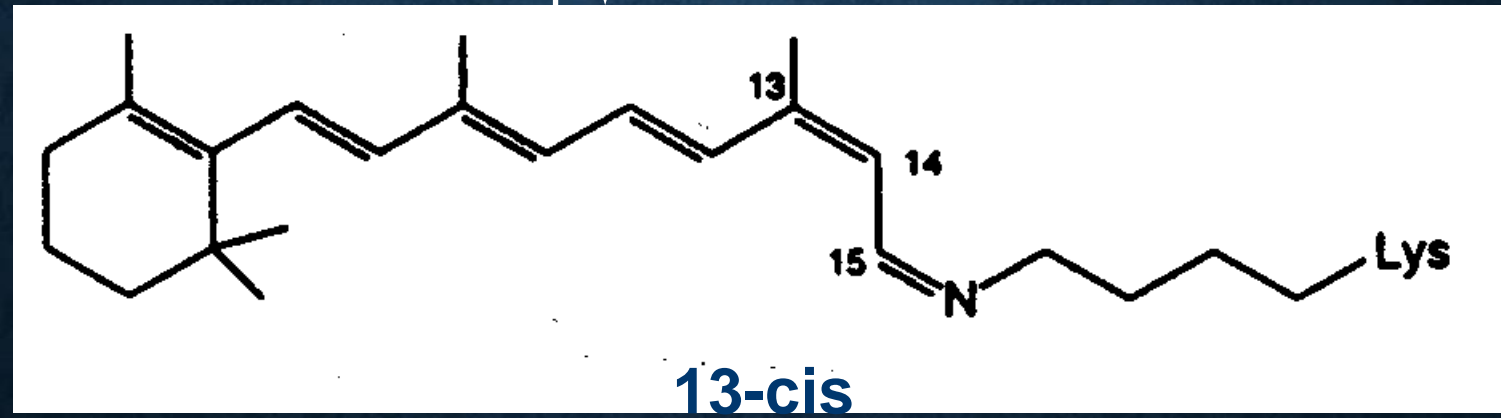
$\mu$  = Scaling factor

N = Number of vibrations

$\chi^{(3)}$  = third-order susceptibility

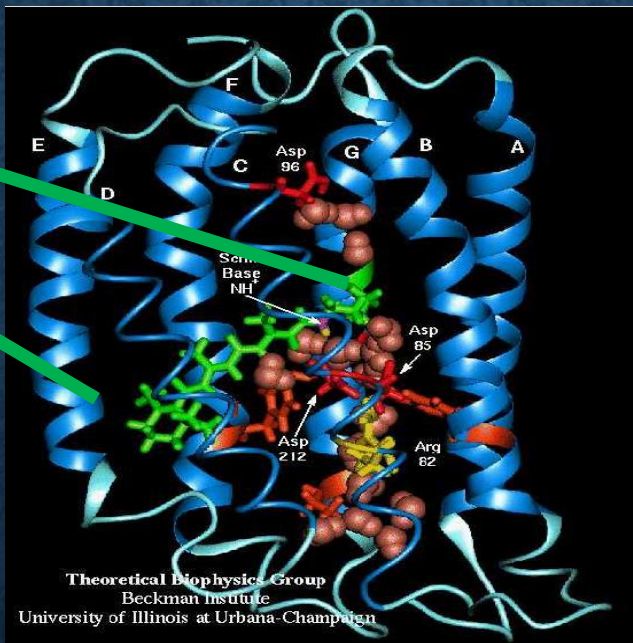
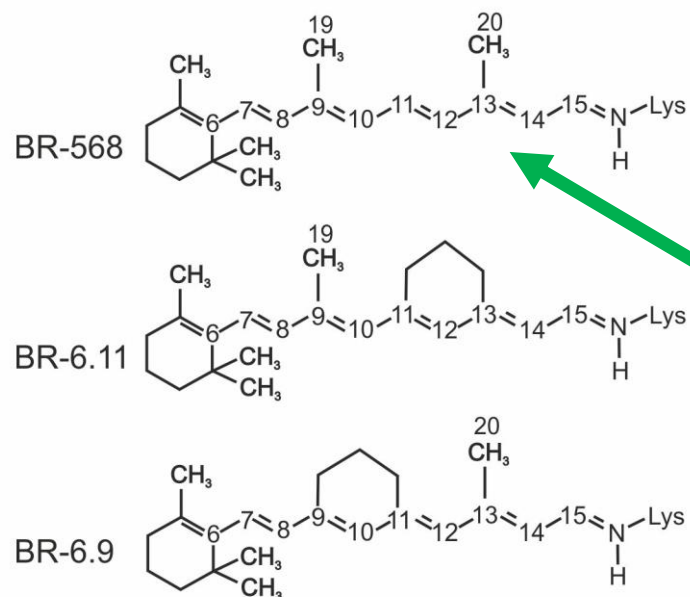


Aktywacja światłem  
wyzwała izomeryzację  
trans do cis  
związanego retinalu

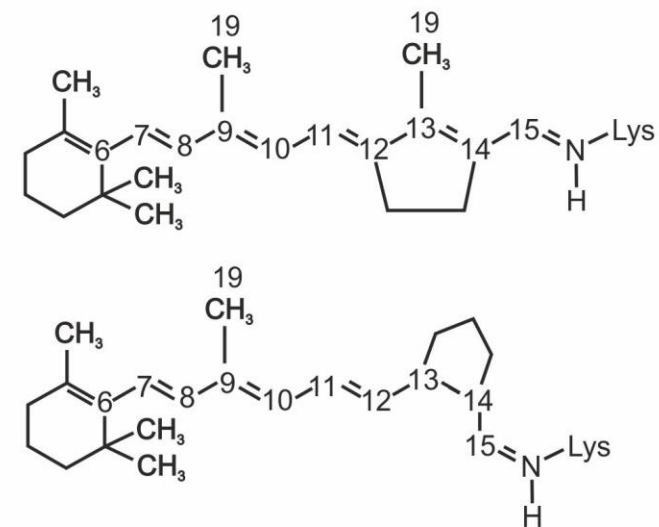




Native BR-568 and unlocked  
analogs BR 6.11 and 6.9



Locked analogs BR 5.12 and  
BR 5.13



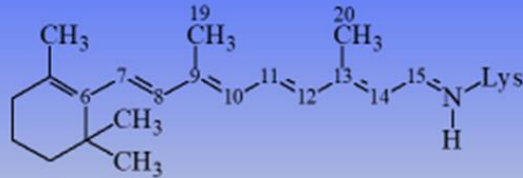
Andrew C. Terentis, Laszlo Ujj, Halina  
Abramczyk, George H. Atkinson\*  
Chemical Physics 313 (2005) 51-6

# NATYWNA BR-568 I NIEZMKNIĘTE ANALOGI BR 6.11 AND 6.9

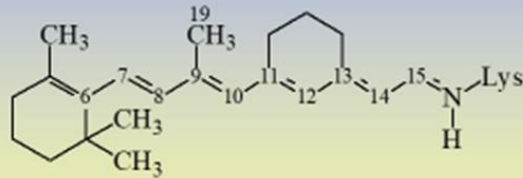
Badane tutaj sztuczne pigmenty BR zawierają retinal z sześciocząłowym pierścieniem węglowym wbudowanym w szkielet retinalu, który nie zawiera wiązań 13C = C14 do izomeryzacji

## Native BR-568 and unlocked analogs BR 6.11 and 6.9

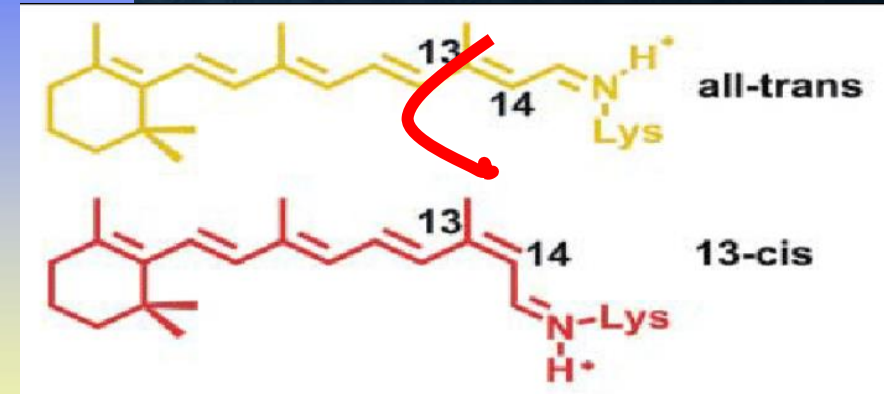
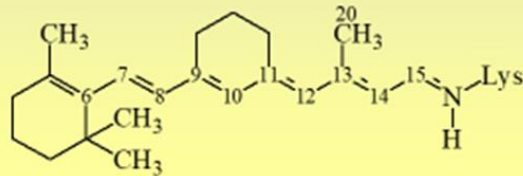
BR-568



BR 6.11



BR 6.9

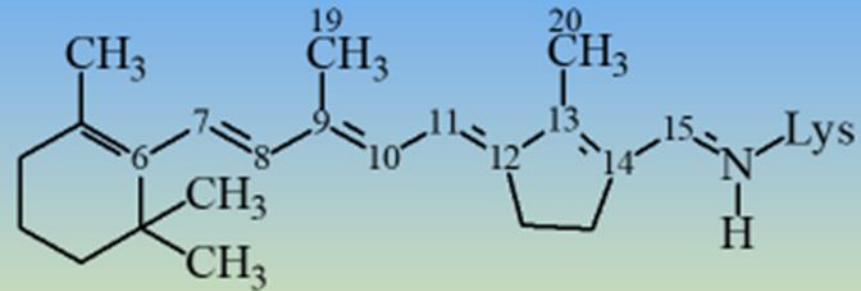


22

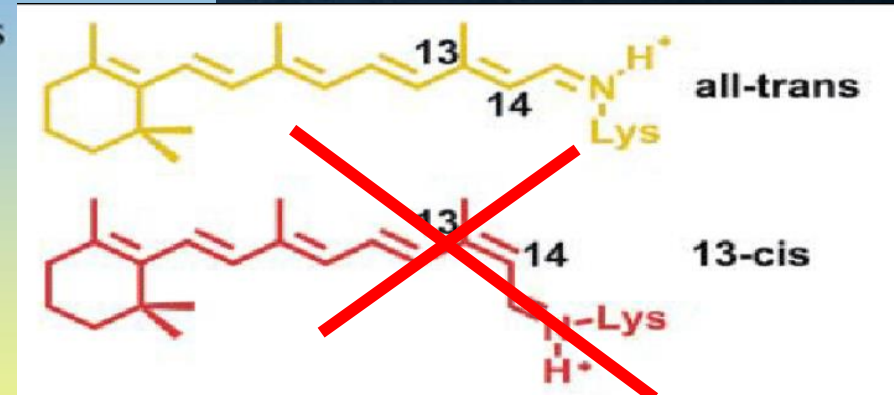
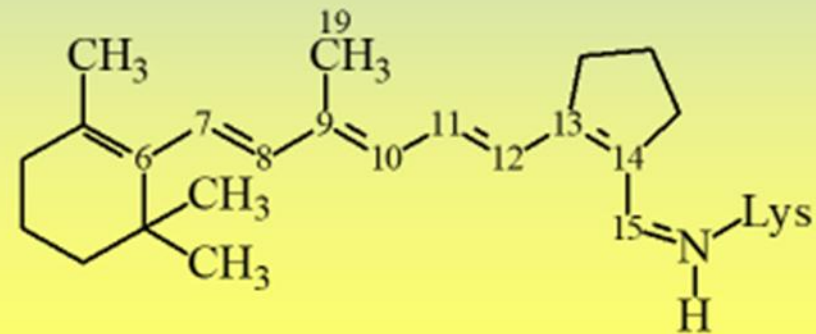
Primary events in the bacteriorhodopsin photocycle: Torsional vibrational dephasing in the first excited electronic state Andrew C. Terentis, Laszlo Ujj, Halina Abramczyk, George H. Atkinson\*  
Chemical Physics 313 (2005) 51–6

# Locked analogs BR 5.12 and BR 5.13

BR 5.12



BR 5.13



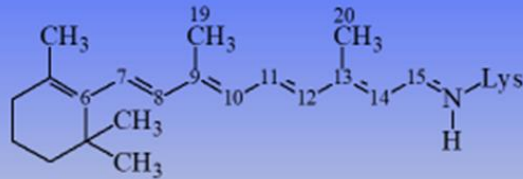
W przypadku BR5.12 wiązanie retinalu C13 = C14 jest zablokowane w konfiguracji trans przez sztywny pięcioczłonowy pierścień węglowy

# NATYWNA BR-568 I NIEZMKNIĘTE ANALOGI BR 6.11 AND 6.9

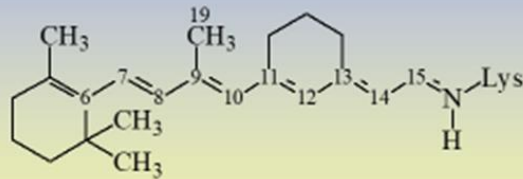
Badane tutaj sztuczne pigmenty BR zawierają retinal z sześciocząłowym pierścieniem węglowym wbudowanym w szkielet retinalu, który nie zawiera wiązań 13C = C14 do izomeryzacji

## Native BR-568 and unlocked analogs BR 6.11 and 6.9

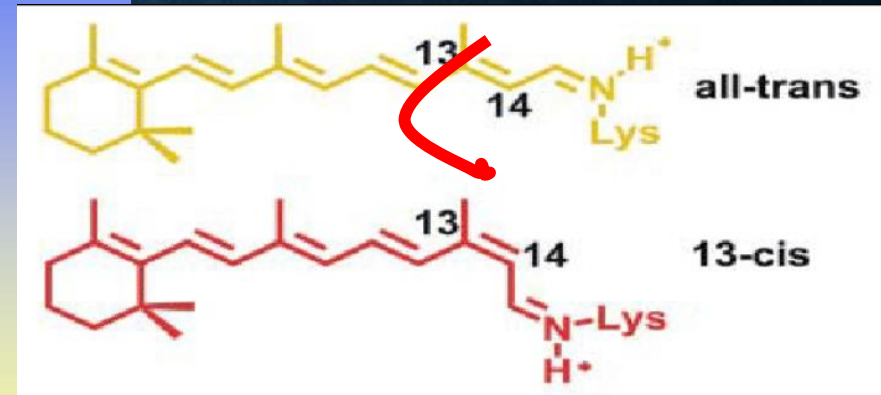
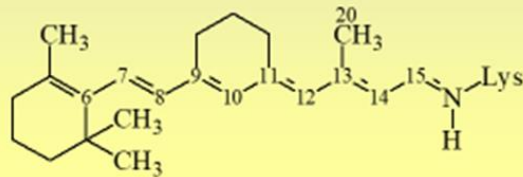
BR-568



BR 6.11



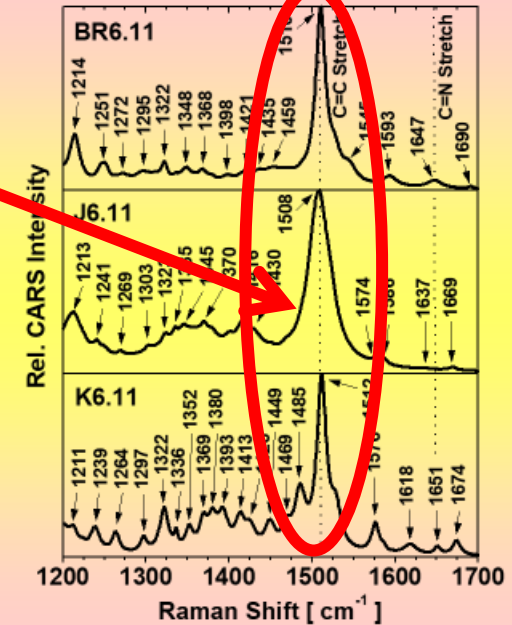
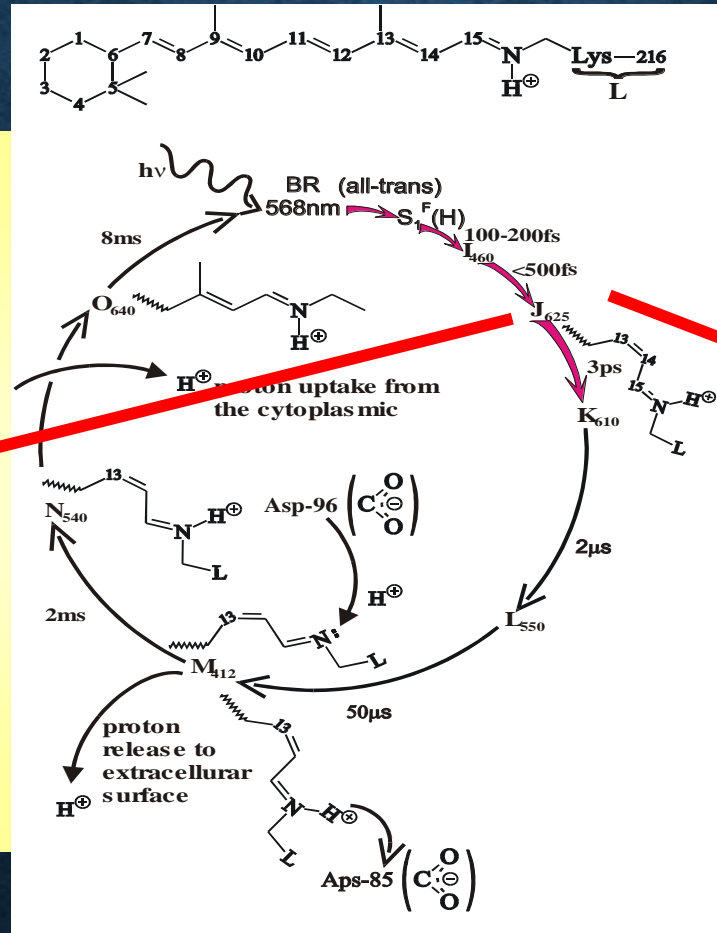
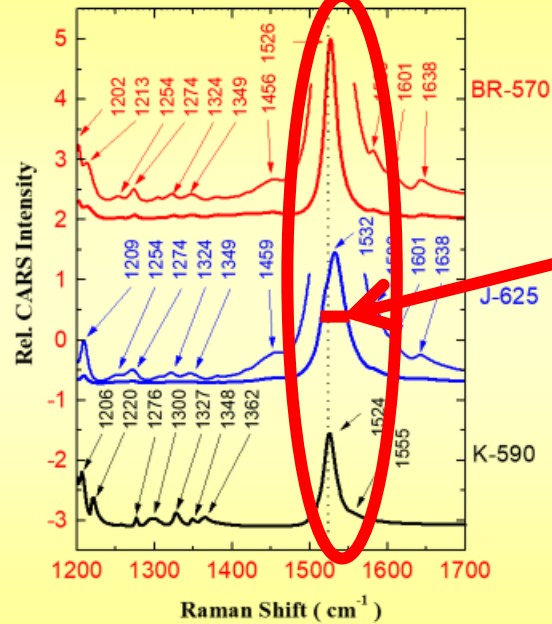
BR 6.9



22

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

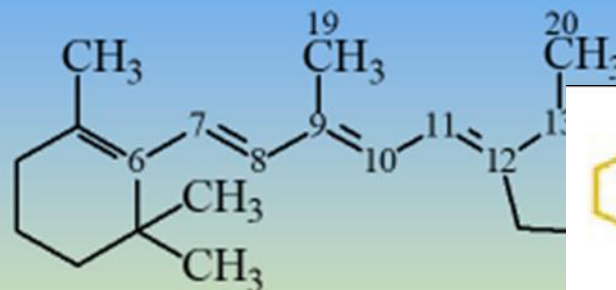
# NATYWNA BR-568 I NIEZMKNIĘTE ANALOGI BR 6.11 AND 6.9



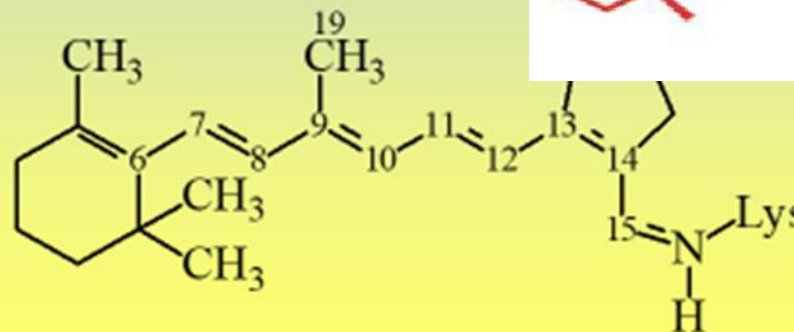
vibrational spectra of BR-570 (top), J-625 (center, derived from the 0-ps PTR/CARS data), and K-590 (bottom, derived from the 200-ps PTR/CARS data) in the 1200–1700  $\text{cm}^{-1}$  region

# Locked analogs BR 5.12 and BR 5.13

BR 5.12



BR 5.13



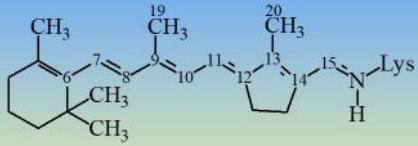
28

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

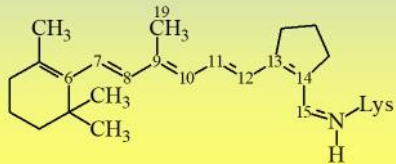
For BR5.12, the C13=C14 retinal bond is locked in the trans configuration by a rigid, five-membered carbon ring

## Locked analogs BR 5.12 and BR 5.13

BR 5.12

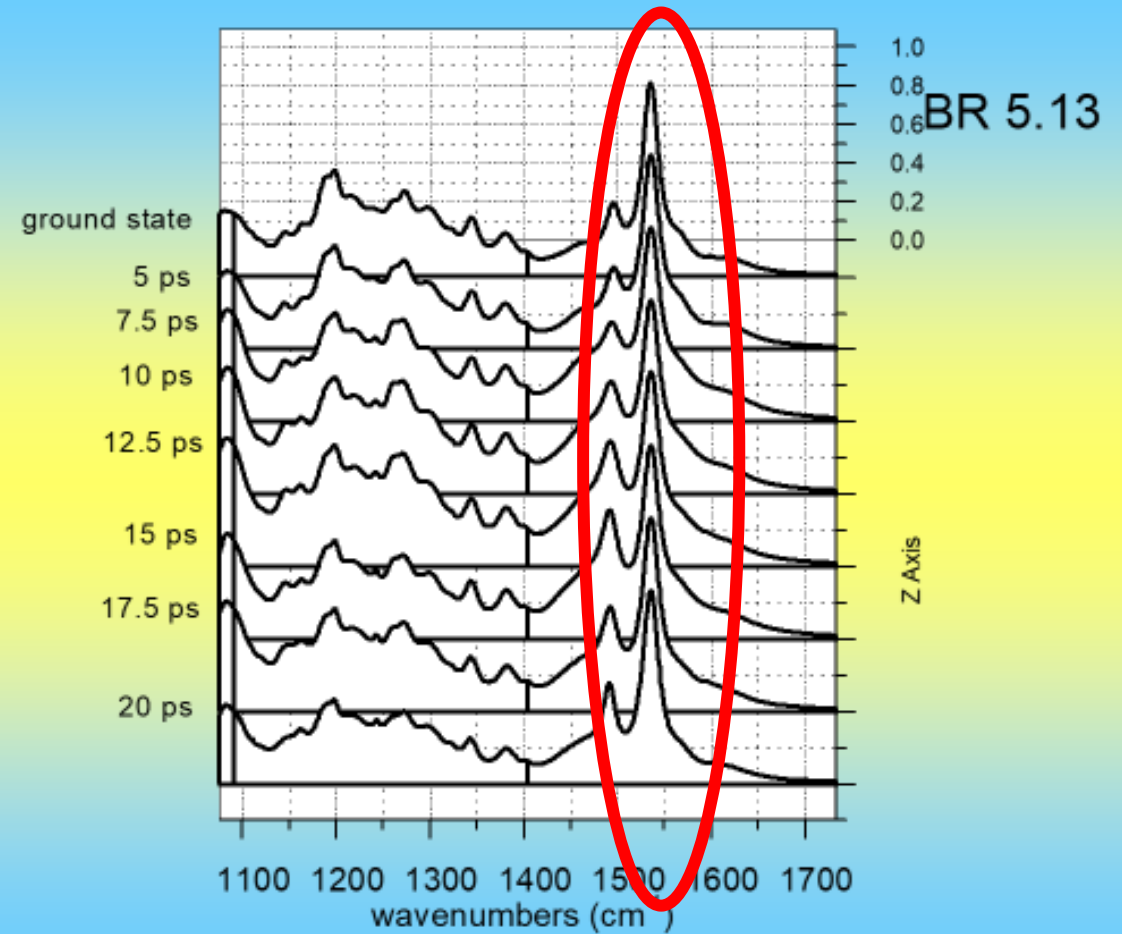


BR 5.13



28

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



30

**JAKIE INFORMACJE O  
DYNAMICE DRGAŃ ZAWIERA  
KSZTAŁT PASMA CARS?**



1 Maxwell equation

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

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

3

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

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

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

#### 4 Time domain response

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

#### 5 four time correlation functions

$$S^{(3)}(t) \Rightarrow \langle V(t_1)V(t_2)V(t_3)V(0) \rangle$$

⇓ factorization of the  
Green functions

$\langle V(t)V(0) \rangle$  two time  
correlation  
functions

where

$$V = -\mu E \Rightarrow \begin{cases} \frac{\partial \mu}{\partial Q} \cdot Q \\ \frac{\partial \alpha}{\partial Q} \cdot Q \end{cases}$$

6 frequency domain response

$$S_{CARS} \sim \chi^{(3)} |(-\omega_s, \omega_1, \omega_2, \omega_3)|^2$$

factorization

$$I(\omega_s) \cdot I(\omega_1) \cdot I(\omega_2)$$

$$\frac{1}{(\omega - \omega_1)^2 + \Gamma_1}$$

vibrational correlation function

$$\left\langle \frac{\partial \alpha(0)}{\partial Q} \cdot \frac{\partial \alpha(t)}{\partial Q} \right\rangle \langle Q(0)Q(t) \rangle$$

7

$$Q = Q_0 e^{-i(\omega_0 + \Delta\omega(t))t}$$

8

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

cumulant expansion

$$e^{-i \int_0^t \langle \Delta\omega(0)\Delta\omega(t') \rangle dt'}$$

$$\Gamma = \frac{1}{2\pi c T_2}$$

band width

⇐

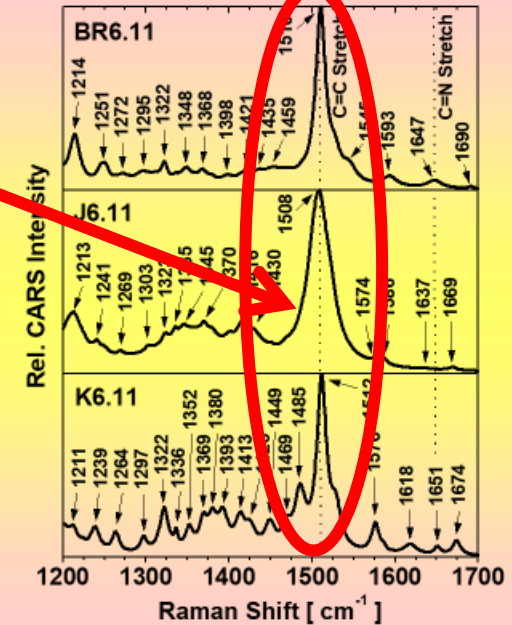
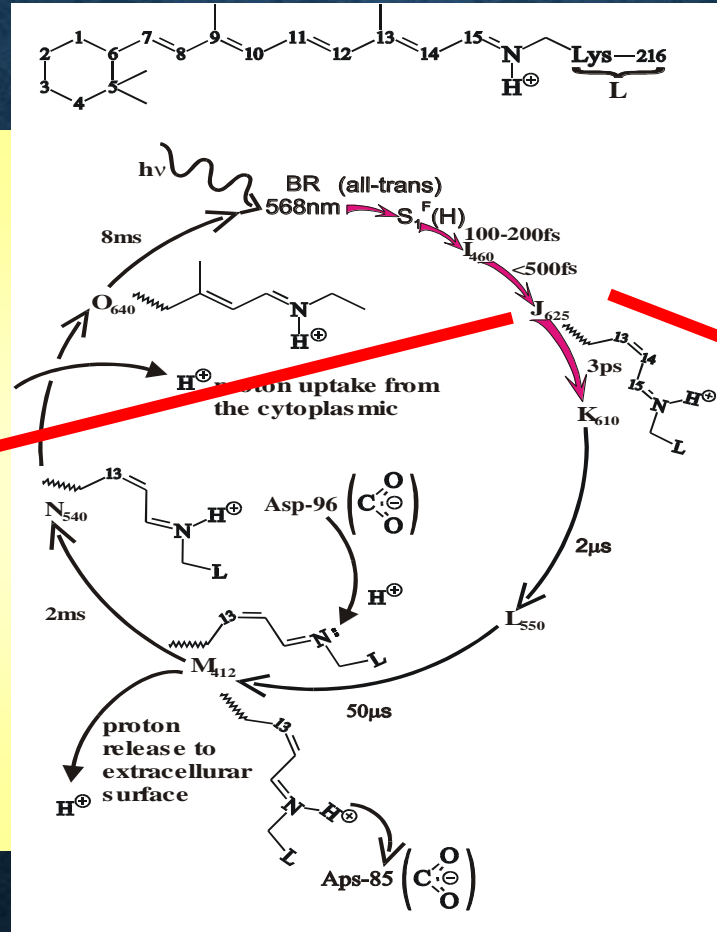
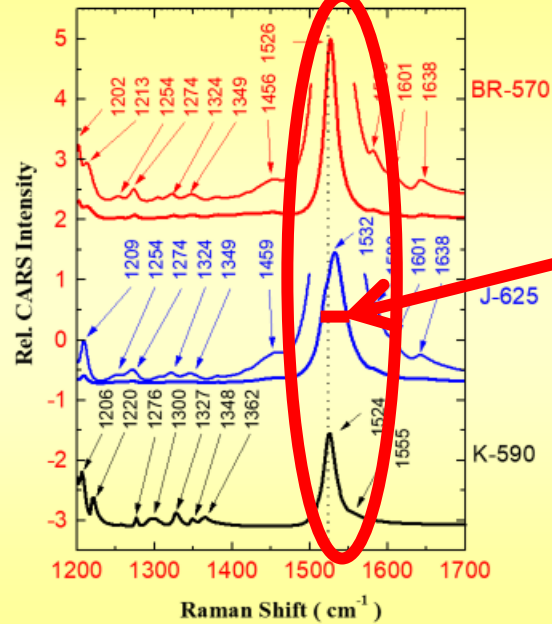
$$T_2^{-1} = (T_2^{-1})^* + \gamma^{-1}$$

vibrational dephasing

pure dephasing

life time

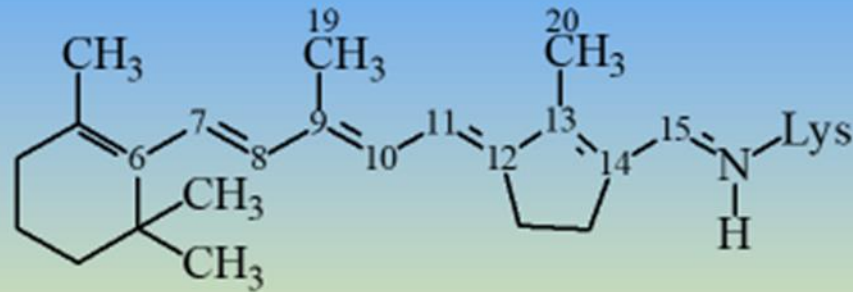
# NATYWNA BR-568 I NIEZMKNIĘTE ANALOGI BR 6.11 AND 6.9



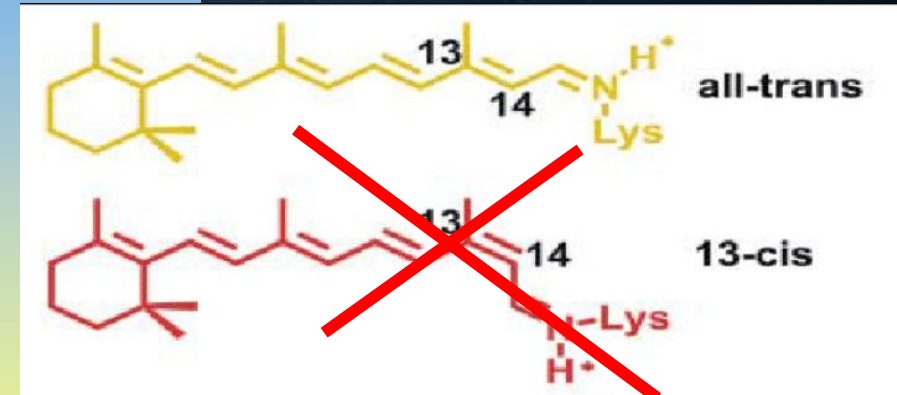
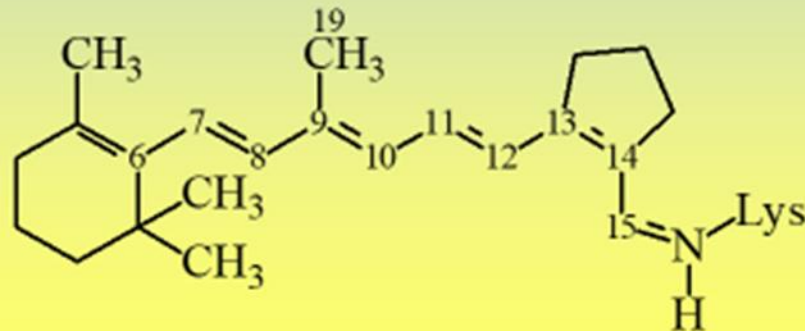
vibrational spectra of BR-570 (top), J-625 (center, derived from the 0-ps PTR/CARS data), and K-590 (bottom, derived from the 200-ps PTR/CARS data) in the 1200–1700 cm<sup>-1</sup> region

# Locked analogs BR 5.12 and BR 5.13

BR 5.12



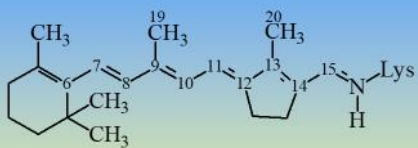
BR 5.13



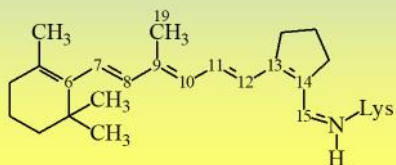
For BR5.12, the C13=C14 retinal bond is locked in the trans configuration by a rigid, five-membered carbon ring

# Locked analogs BR 5.12 and BR 5.13

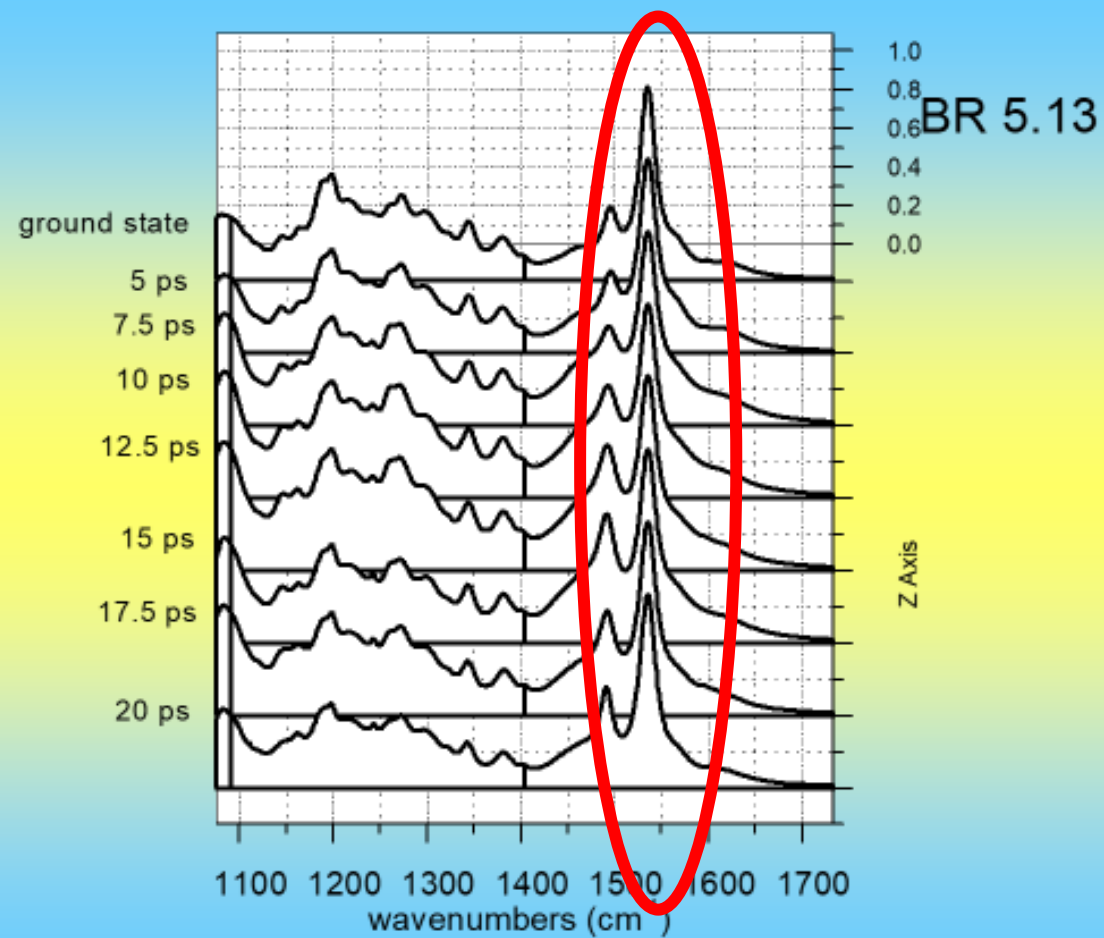
BR 5.12



BR 5.13



28



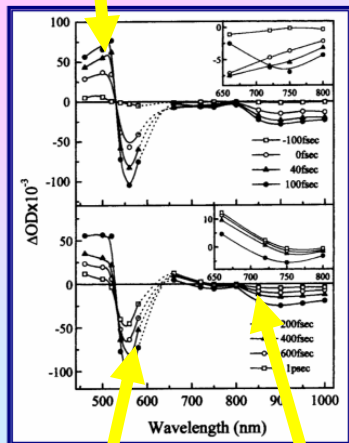
30

# DYNAMIKA ELEKTRONOWA BAKTERIORODOPSYNY I JEJ ZMODYFIKOWANYCH ANALOGÓW

Absorpcja ze stanu wzbudzonego



T.Ye, N.Friedman, Y.Gat, G.H.Atkinson, M.Sheves, M.Ottolenghi, S.Ruhman,  
*J. Phys. Chem. B, Vol. 103, No. 24, 1999*



Transient spectral changes following excitation of native, all-trans, bR (bR<sub>570</sub>). Time values represent the delay between zero time, determined as described in the text and the probe pulse. Top: fast time scale; bottom: slower time scale. Insets enlarge the vertical scale of the intermediate region, where the DOD values are relatively small. Data points are missing around the interfering 620nm excitation wavelength.

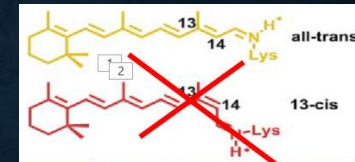
50

## Unanswered questions

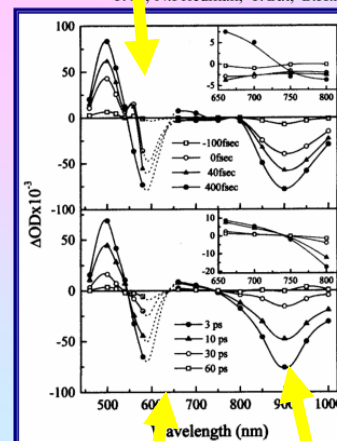
- why the femtosecond spectra of native BR-568 and locked analogs are identical ?
- why the stimulated emission spectrum does not overlap with the spontaneous fluorescence?

53

Absorpcja ze stanu wzbudzonego



T.Ye, N.Friedman, Y.Gat, G.H.Atkinson, M.Sheves, M.Ottolenghi, S.Ruhman,  
*J. Phys. Chem. B, Vol. 103, No. 24, 1999*



Transient spectral changes following excitation of C13C14, all-locked bacteriorhodopsin, bR 5.12. Details as in earlier figure.

51

Emisja wymuszona

Wybielanie stanu podstawowego

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

Wybielanie stanu podstawowego

Emisja wymuszona

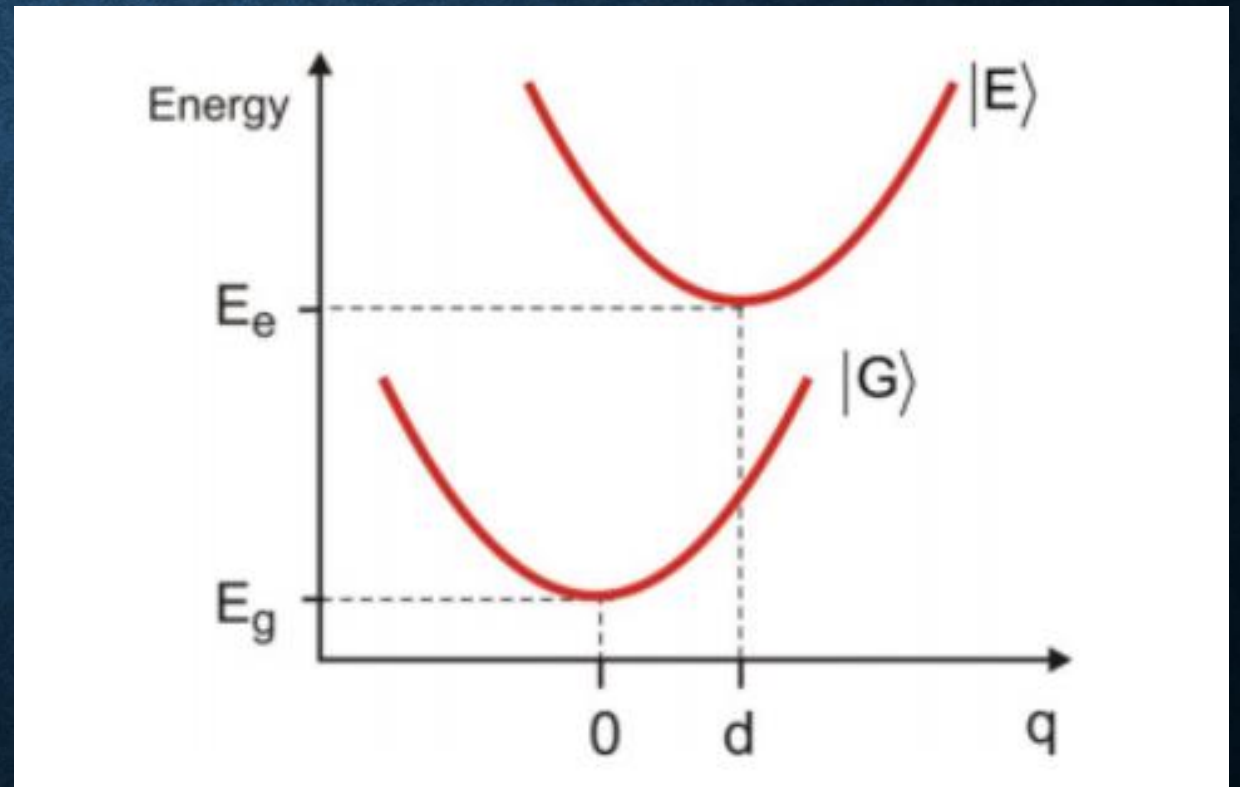
# ODPOWIEDZI LINIOWE I NIELINIOWE SPRZĘŻENIE WIBRACYJNE MODEL TEORETYCZNY

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

$$S_{HB}(\omega_1, \omega_2, \tau) = \left(\frac{1}{\hbar}\right)^3 2\omega_2 \int_0^\infty 2\omega_2 \int_0^\infty dt_1 \int_0^\infty dt_3 \left[ e^{i(\omega_2 t_3 + i\alpha t_1)\chi(t_3+t_1)} [R_1^H(t_3, \tau, t_1) + R_4^H(t_3, \tau, t_1)] + e^{i(\omega_2 t_3 - i\alpha t_1)\chi(t_3-t_1)} [R_2^H(t_3, \tau, t_1) + R_3^H(t_3, \tau, t_1)] \right]$$

55

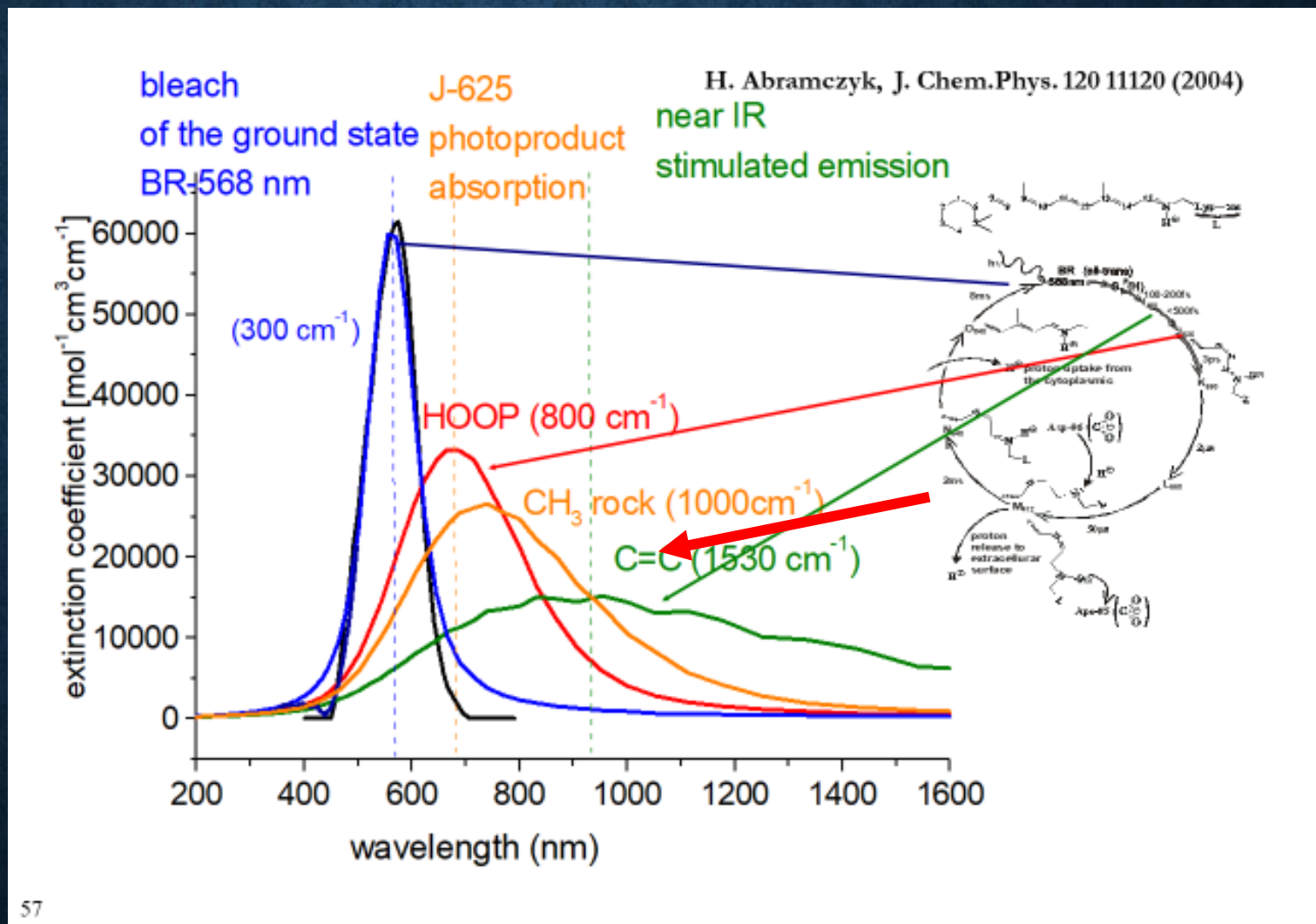
Shaul Mukamel Principles  
of Nonlinear Optical Spectroscopy





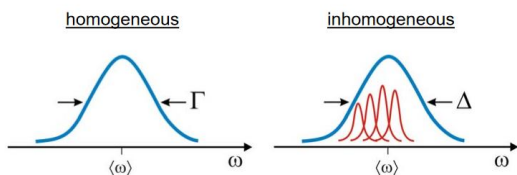
# PROFILE WYPALANIA DZIUR

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



57

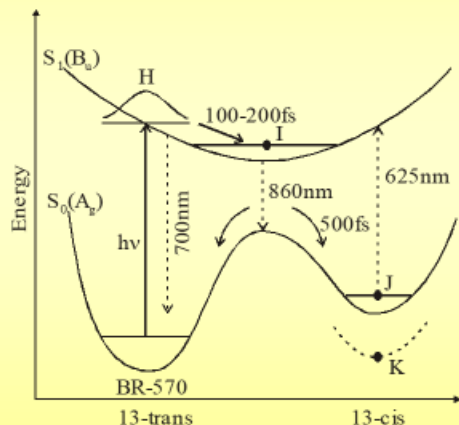
H. Abramczyk, Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin. Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates, J. Chem. Phys. 120 11120 (2004)



# POPZEDNIE MODELE

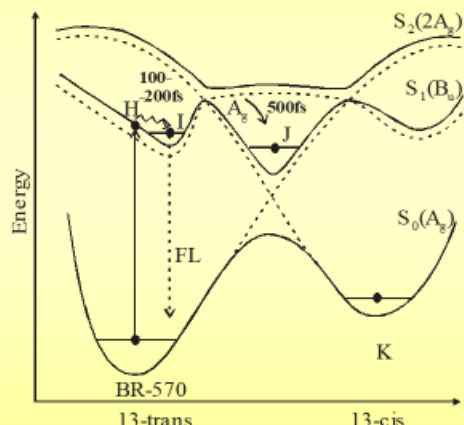
## Models

2-state model



$C_{13}=C_{14}$  torsional coordinate

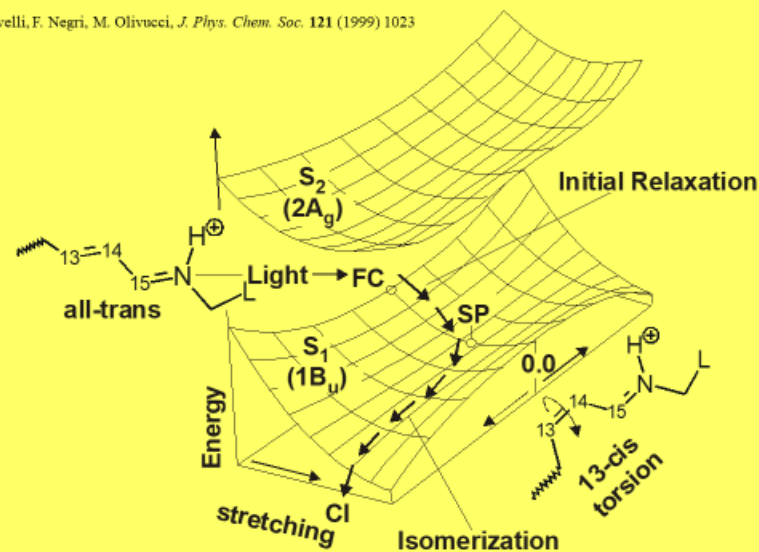
3-state model



$C_{13}=C_{14}$  torsional coordinate

52

1. M. Garavelli, F. Negri, M. Olivucci, *J. Phys. Chem. Soc.* **121** (1999) 1023

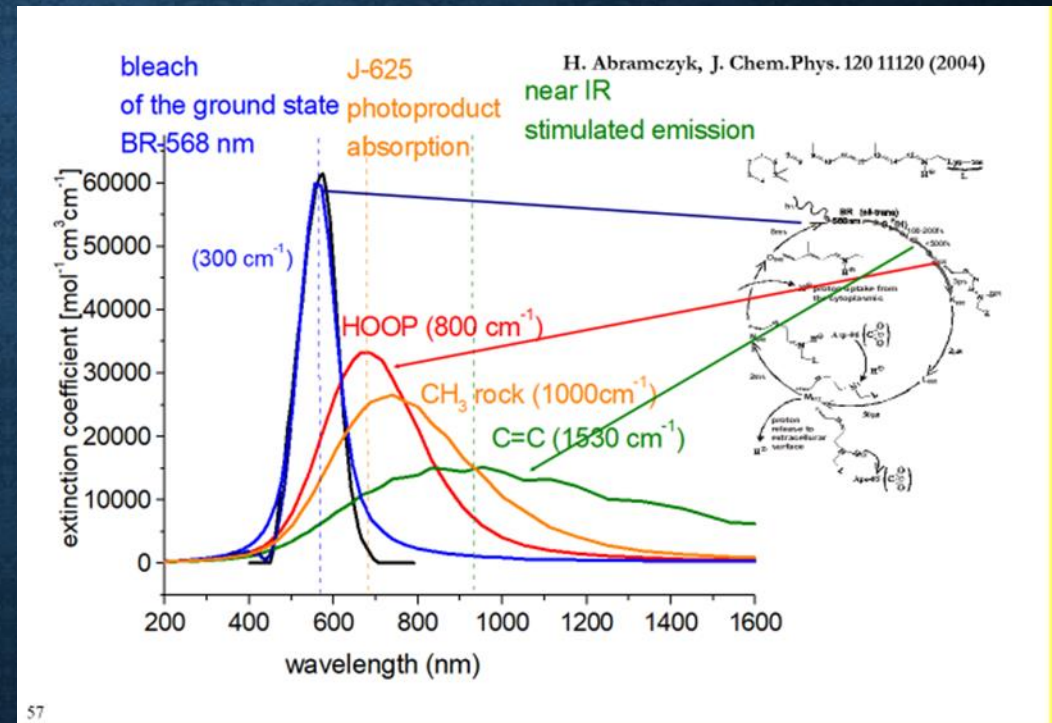
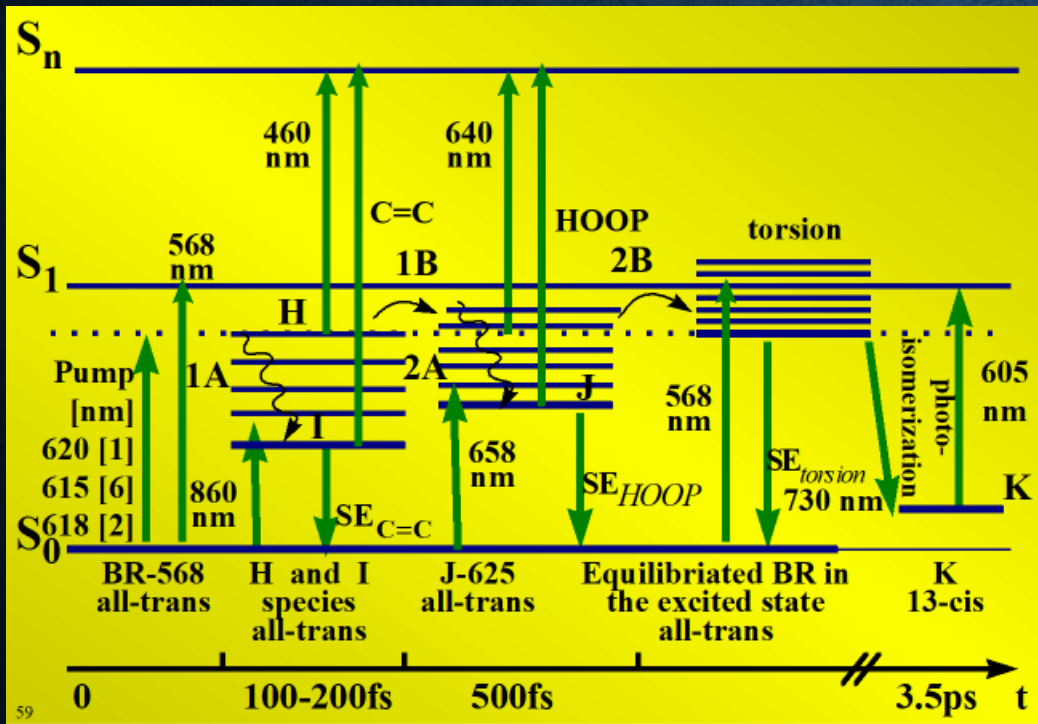


178

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

# WNIOSEK-1

## PROPONOWANY MECHANIZM ZDARZEŃ PIERWOTNYCH W FOTOCYKLU BR

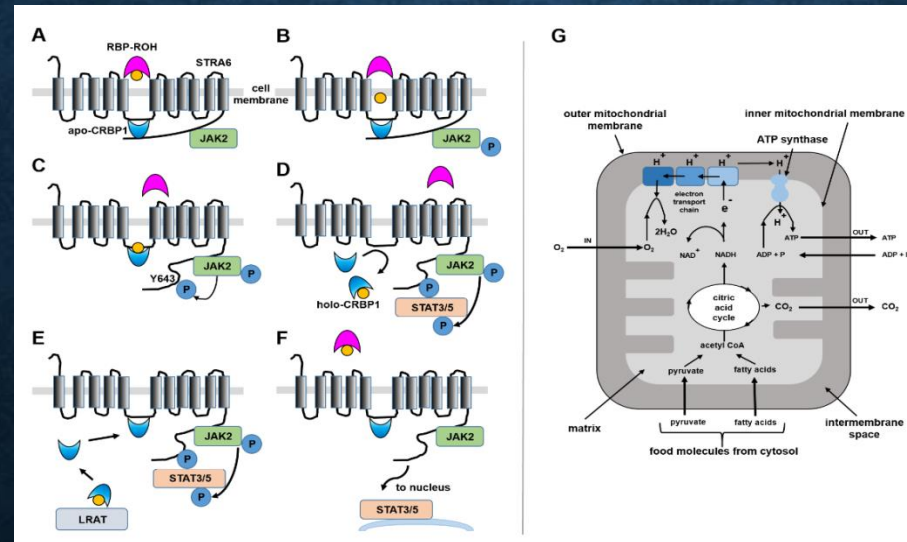


H. Abramczyk, Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin. Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates, J. Chem. Phys. 120 11120 (2004)

# WOLNE RETINOIDY I RETINOIDY ZWIĄZANE Z BIAŁKAMI

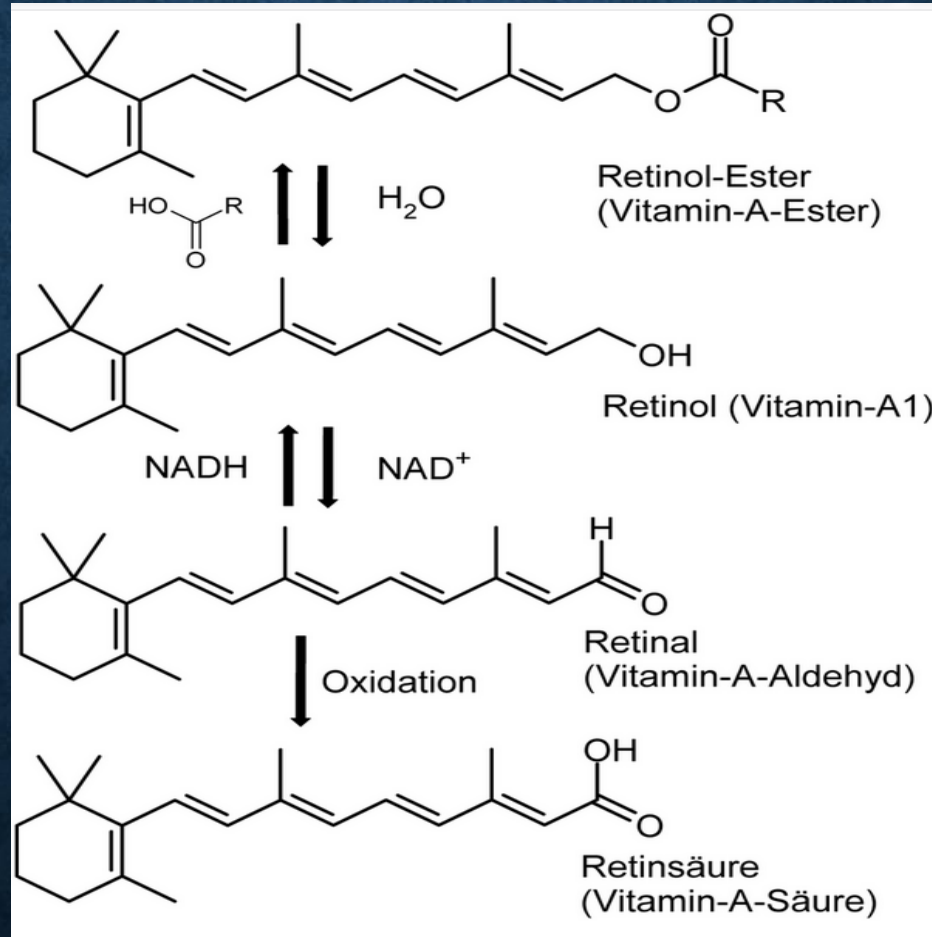
Czy dynamika femtosekundowa retinoidów „wolnych” w roztworze jest inna niż retinoidów związanych z białkami?

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

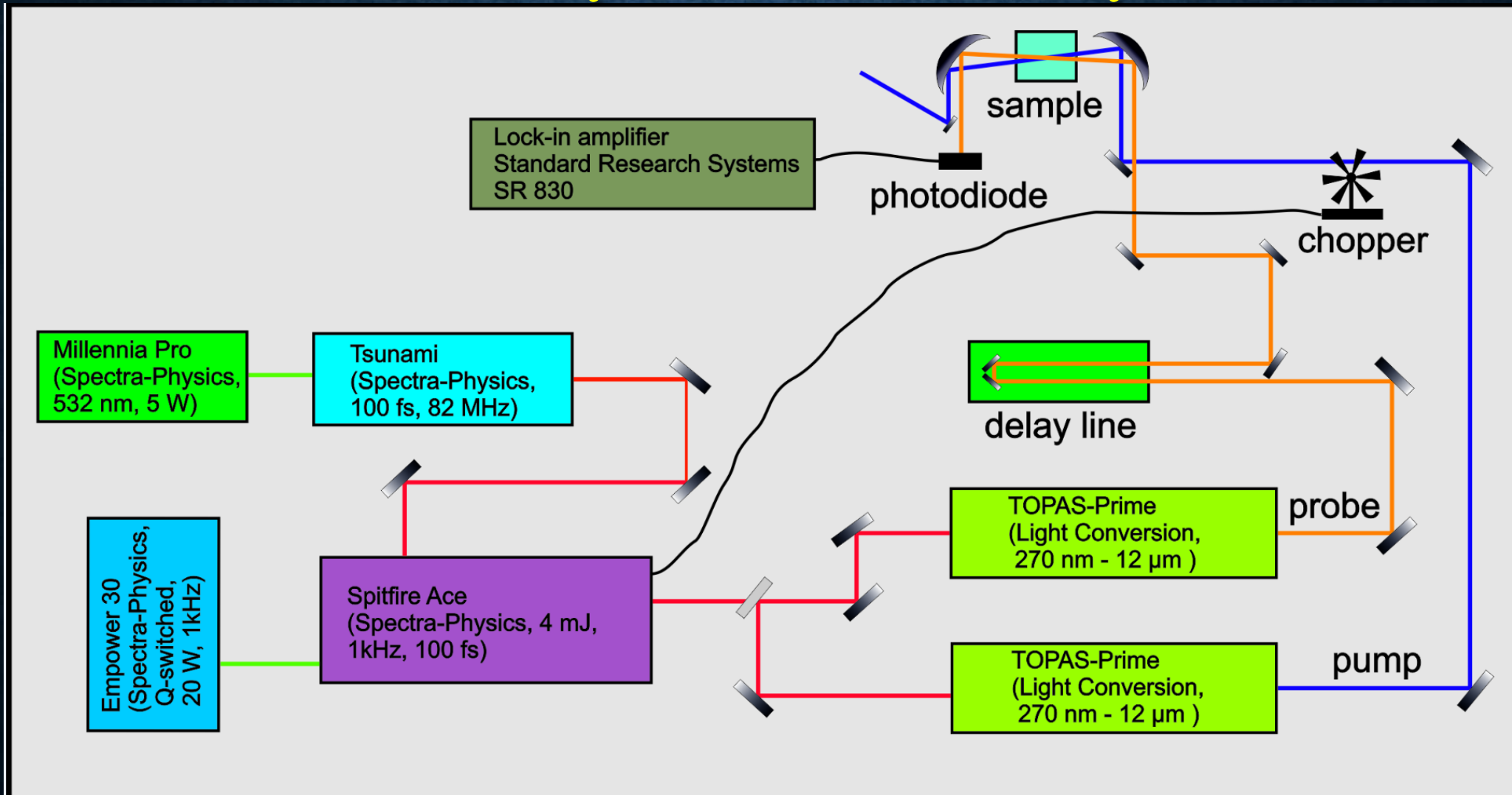


Model of the mechanism of retinol uptake and signalling by STRA6

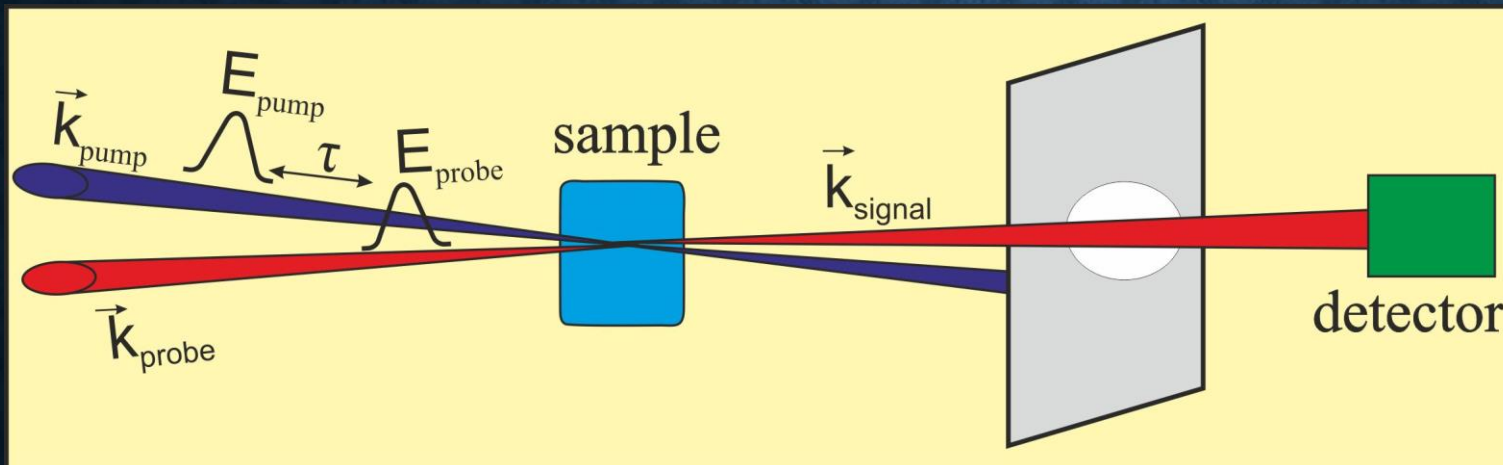
# WOLEN RETINOIDY W ROZTWORZE



# SPEKTROSKOPIA FEMTOSEKUNDOWA ABSORPCJI PRZEJSCIOWEJ METODA WIĄZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ



# SPEKTROSKOPIA FEMTOSEKUNDOWA ABSORPCJI PRZEJSCIOWEJ METODĄ WIAZKI POMPUJĄCEJ I SONDUJĄCEJ

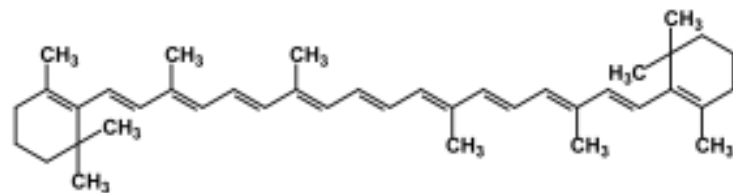
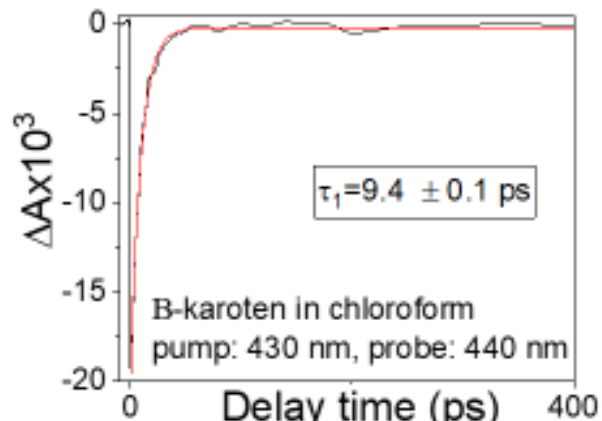
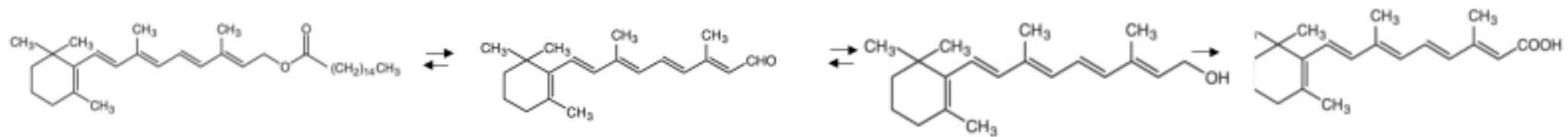
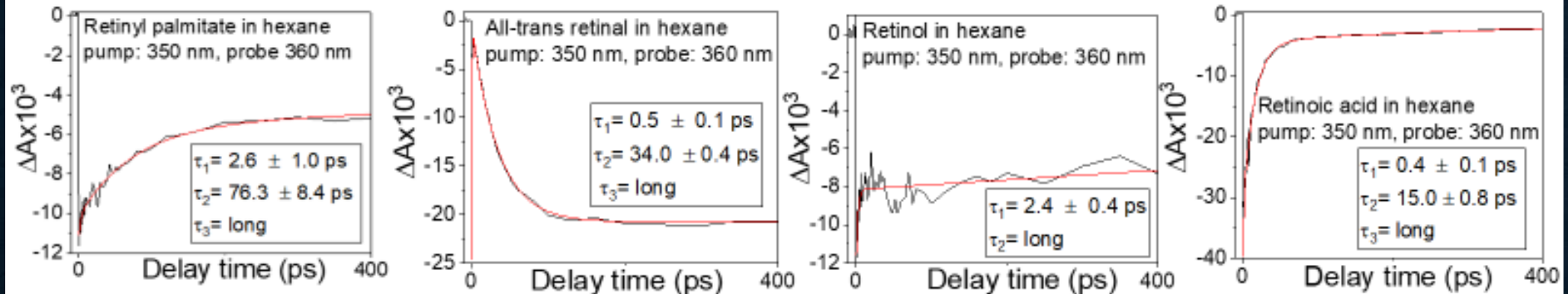


Mierzony sygnał pump-probe jest proporcjonalny do części urojonej polaryzacji

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

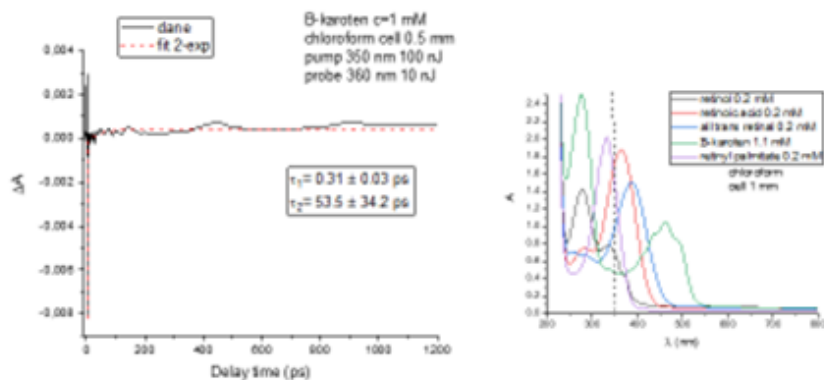
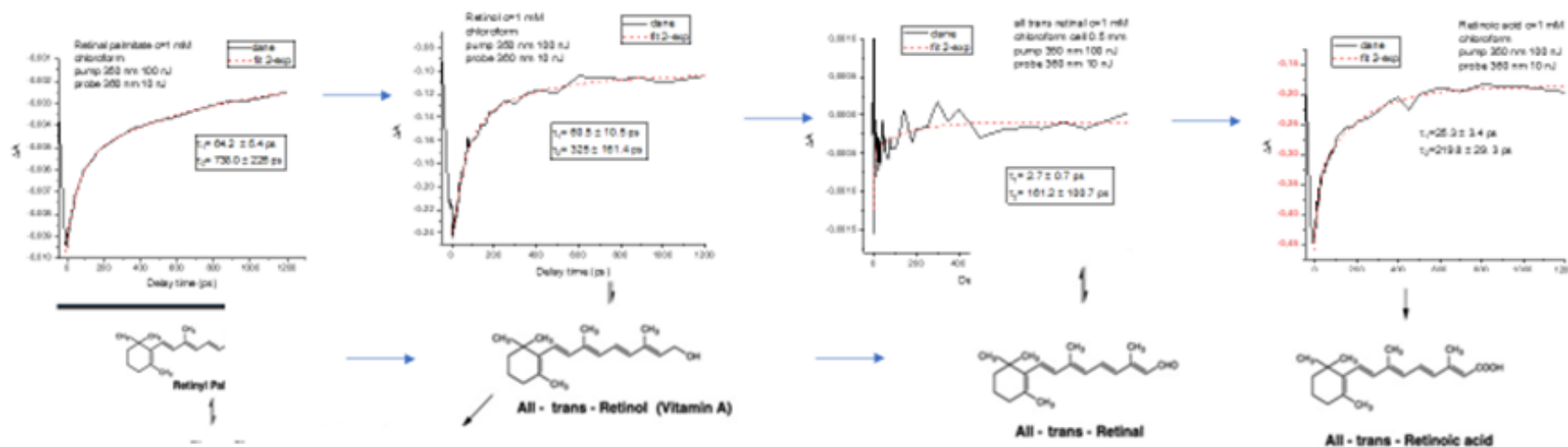
Eksperyment w konfiguracji pump-probe jest prawdopodobnie najczęściej stosowanym eksperymentem nieliniowym trzeciego rzędu. Może być używany do śledzenia wielu typów procesów relaksacji zależnych od czasu i dynamiki chemicznej i jest najczęściej używany do śledzenia relaksacji populacji, kinetyki chemicznej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

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





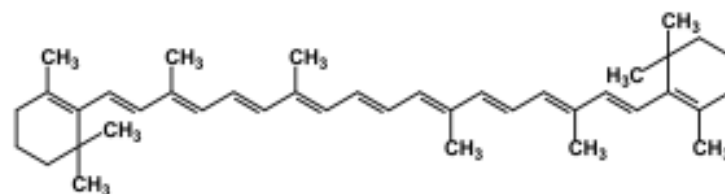
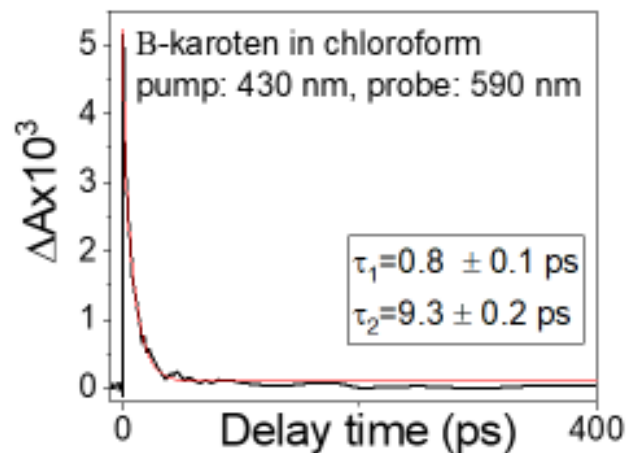
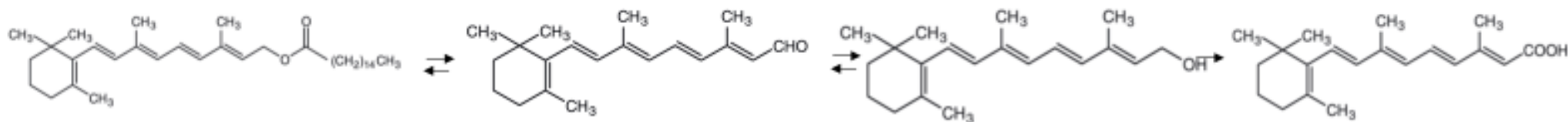
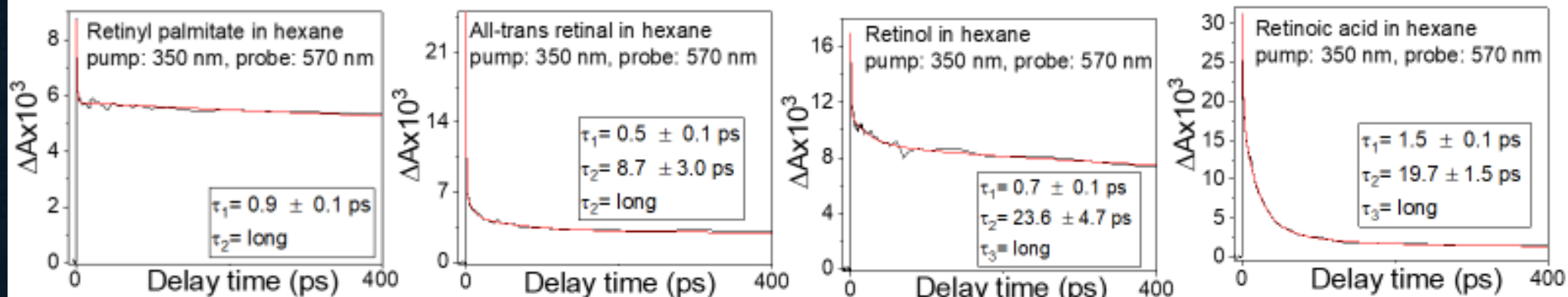
# WYBIELANIE STANU PODSTAWOWEGO RETINOIDÓW W ROZTWORZE (CHLOROFORM)



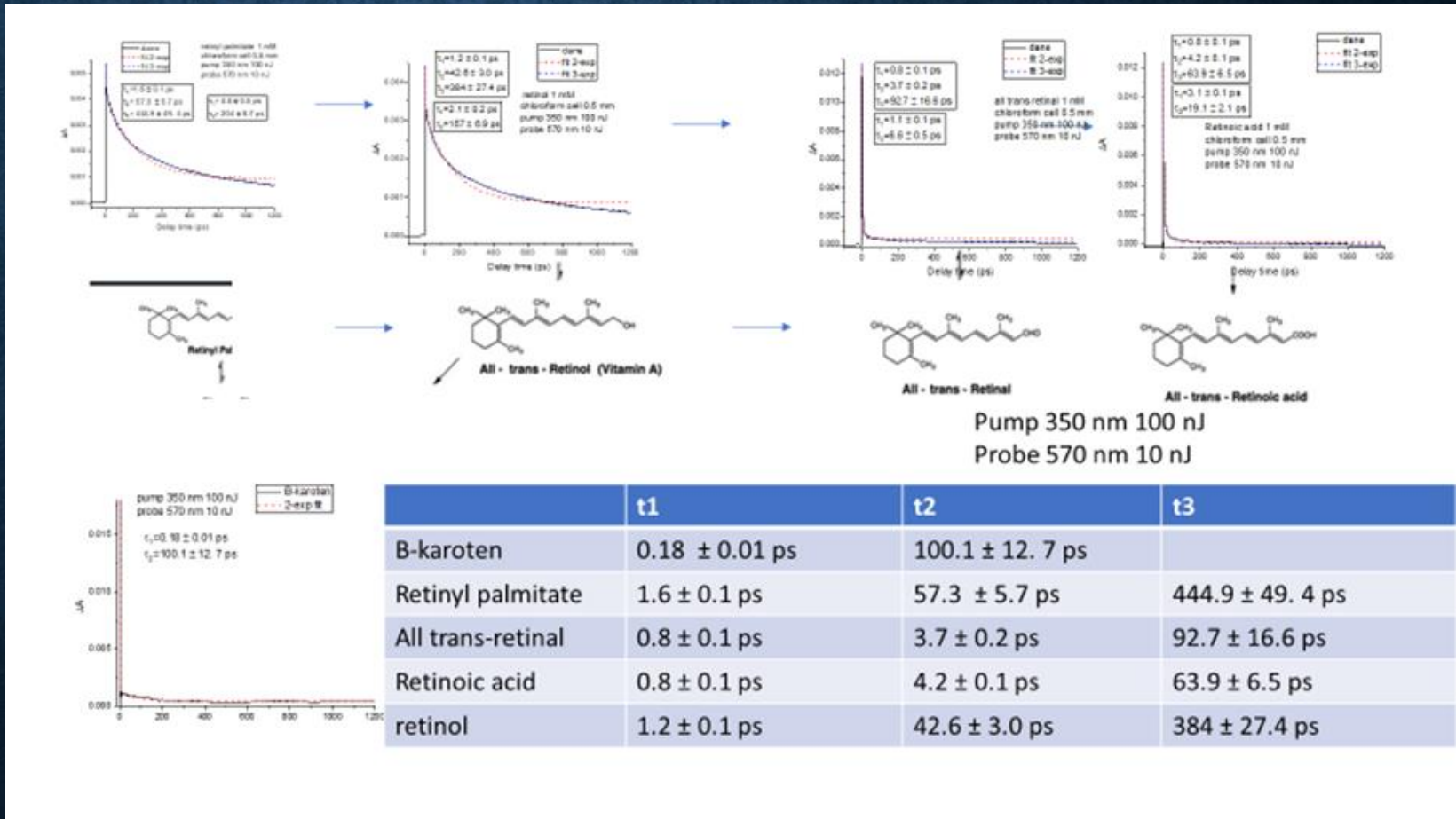
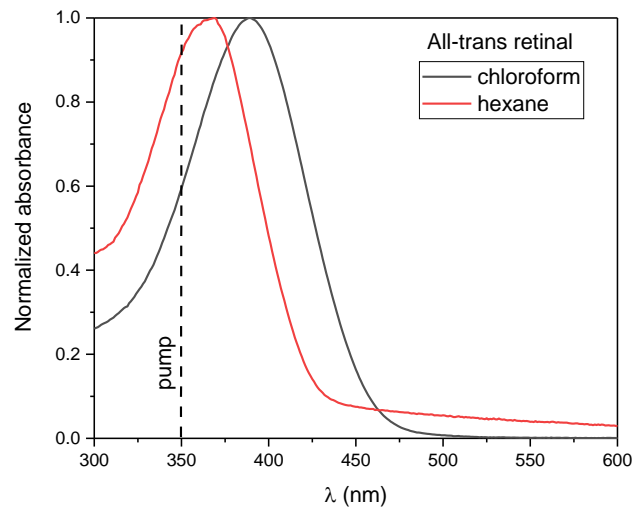
Pump 350 nm 100 nJ  
 Probe 360 nm 10 nJ

	t1	t2
B-karoten	0.31 ± 0.03 ps	53.5 ± 34.2 ps
Retinyl palmitate	64.2 ± 5.4 ps	738.0 ± 226 ps
All trans-retinal	2.7 ± 0.7 ps	161.2 ± 100.7 ps
Retinoic acid	25.3 ± 3.4 ps	219.8 ± 29.3 ps
retinol	60.5 ± 10.5 ps	325 ± 161.4 ps

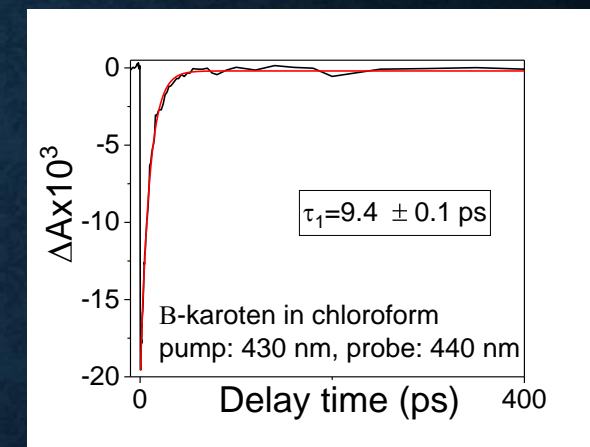
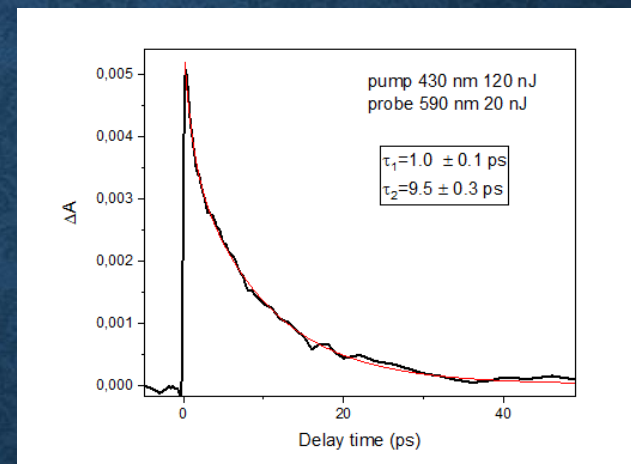
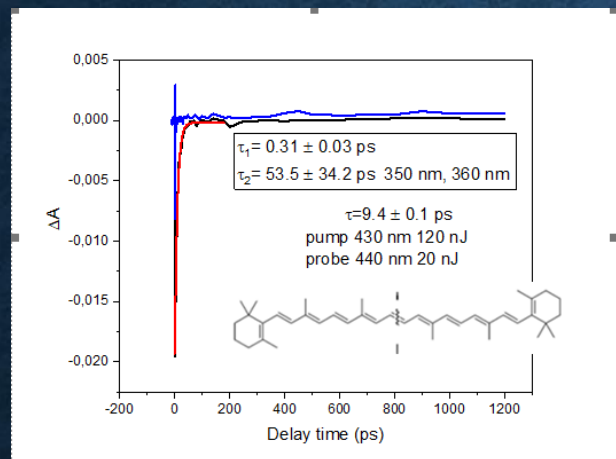
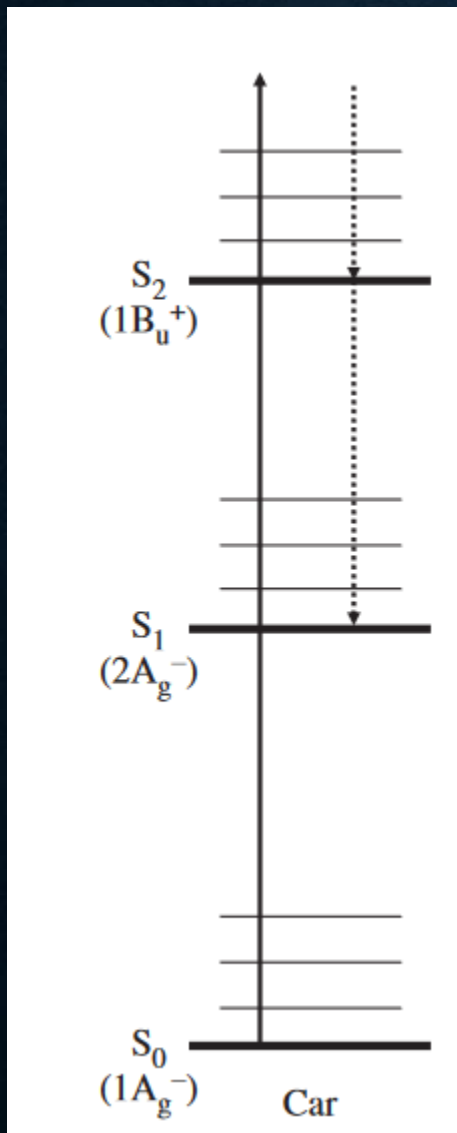
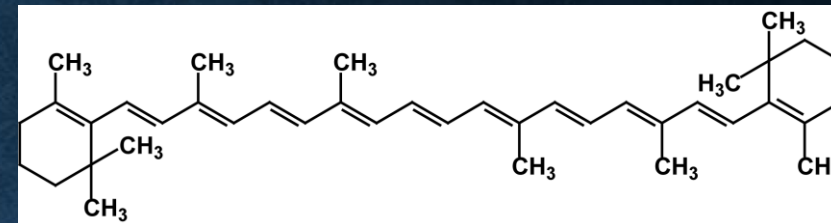
# ABSORPCJA W STANIE WZBUDZONYM RETINOIDÓW W ROZTWORZE (N-HEKSAN, KĄT MAGICZNY)



# ABSORPCJA W STANIE WZBUDZONYM RETINOIDÓW W ROZTWORZE (CHLOROFORM)

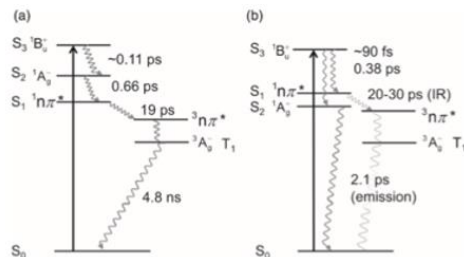
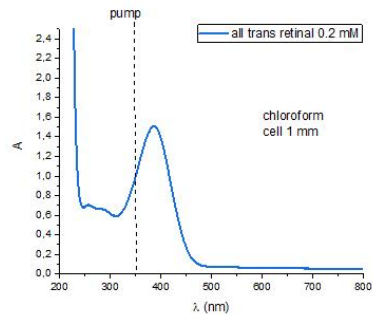


# BETA-KAROTEN



Wyniki bielenia dobrze odpowiadają absorpcji w stanie wzbudzonym (ESA) stanu  $S_1$  przedstawionego na rysunku. ESA narasta natychmiast i zanika dwuwykładniczo z czasami 1 i 9,5 ps. Pierwszy z nich odzwierciedla relaksację wibracyjną w stanie  $S_1$ , 9,5 ps odzwierciedla przejście do stanu  $S_0$ , odpowiadając doskonale czasowi powrotu do stanu  $S_0$  w granicach 9,4 ps.

# ALL-TRANS RETINAL



**Scheme 1.** Electronic structure of all-*trans*-retinal in (a) *n*-hexane or cyclohexane (nonpolar) and (b) acetonitrile (see Refs 3 and 7). Lifetimes representing state transitions are based on electronic transient absorption results although one for the weak ISC in (b) is based on transient infrared absorption.

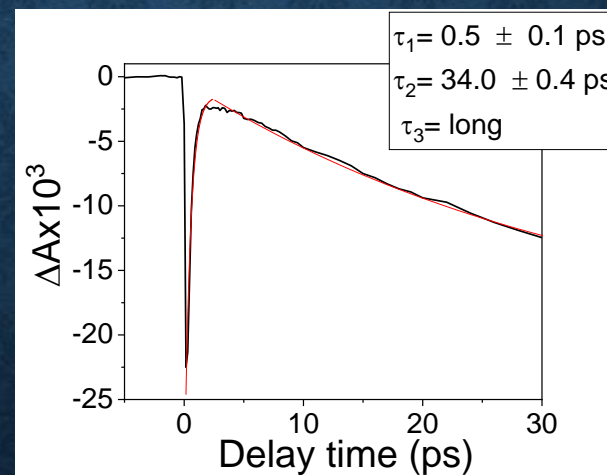
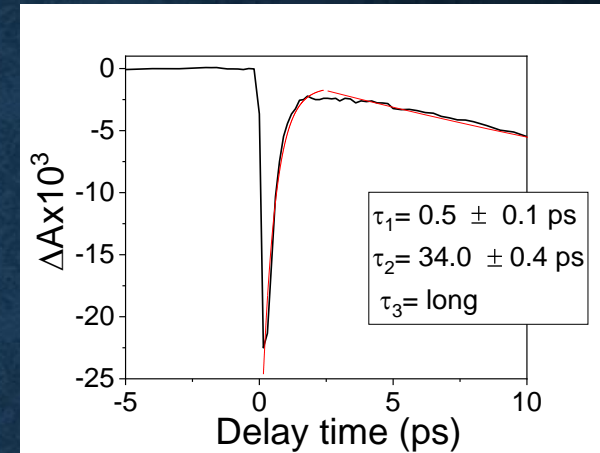
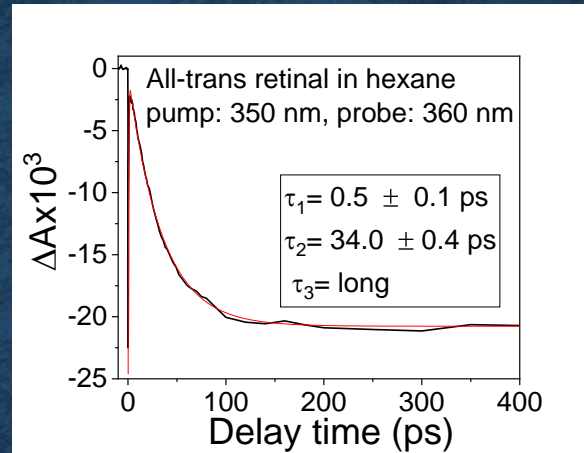
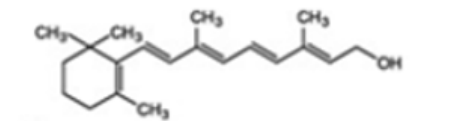
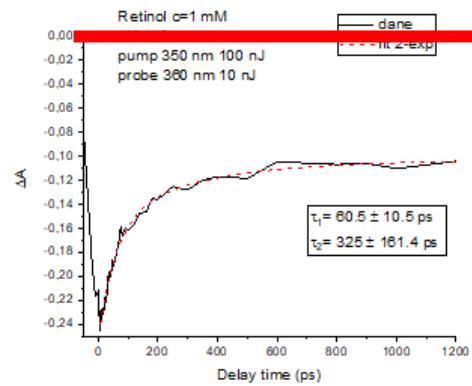


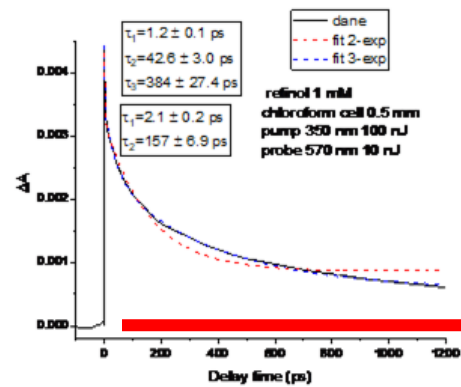
Fig. Poziomy elektronowe dla all-trans retinalu . Składają się z trzech wzbudzonych stanów singletowych w obszarze widmowym bliskiego UV i widzialnym (ryc. 2). Stany wzbudzone  $S_2 A_g(\pi\pi^*)$  i  $S_3 B_u(\pi\pi^*)$  reprezentują polienową strukturę elektronową,  $S_1(n\pi^*)$  reprezentuje grupę aldehydową all-trans retinalu

# ALL-TRANS RETINOL



All - trans - Retinol (Vitamin A)

325 nm



# METODY OBRAZOWANIA MIKROSPEKTROSKOPII MOLEKULARNEJ I LASEROWEJ

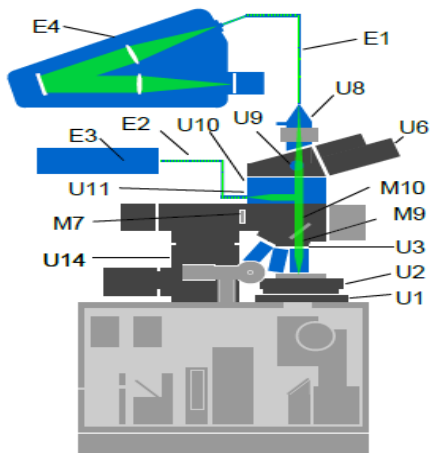


Fig. 8: Schematic illustration of the beam path for confocal Raman microscopy.

Obrazowanie Ramana Obrazowanie IR



## 3.1 SNOM AC in transmission configuration

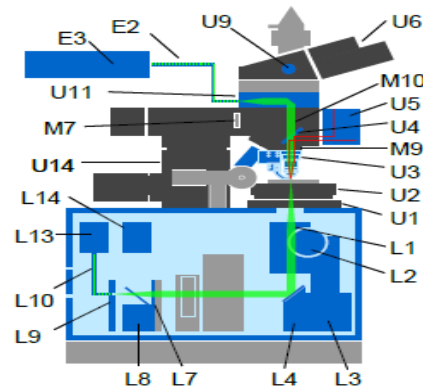


Fig. 5: Schematic illustration of the beam path for Scanning Near-field Optical Microscopy in AC transmission mode.

Obrazowanie SNOM

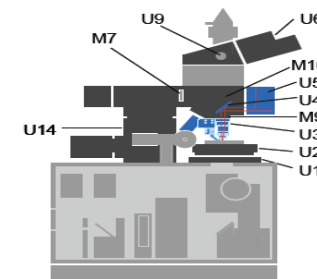


Fig. 5: Schematic illustration of the beam path for AFM AC Mode.

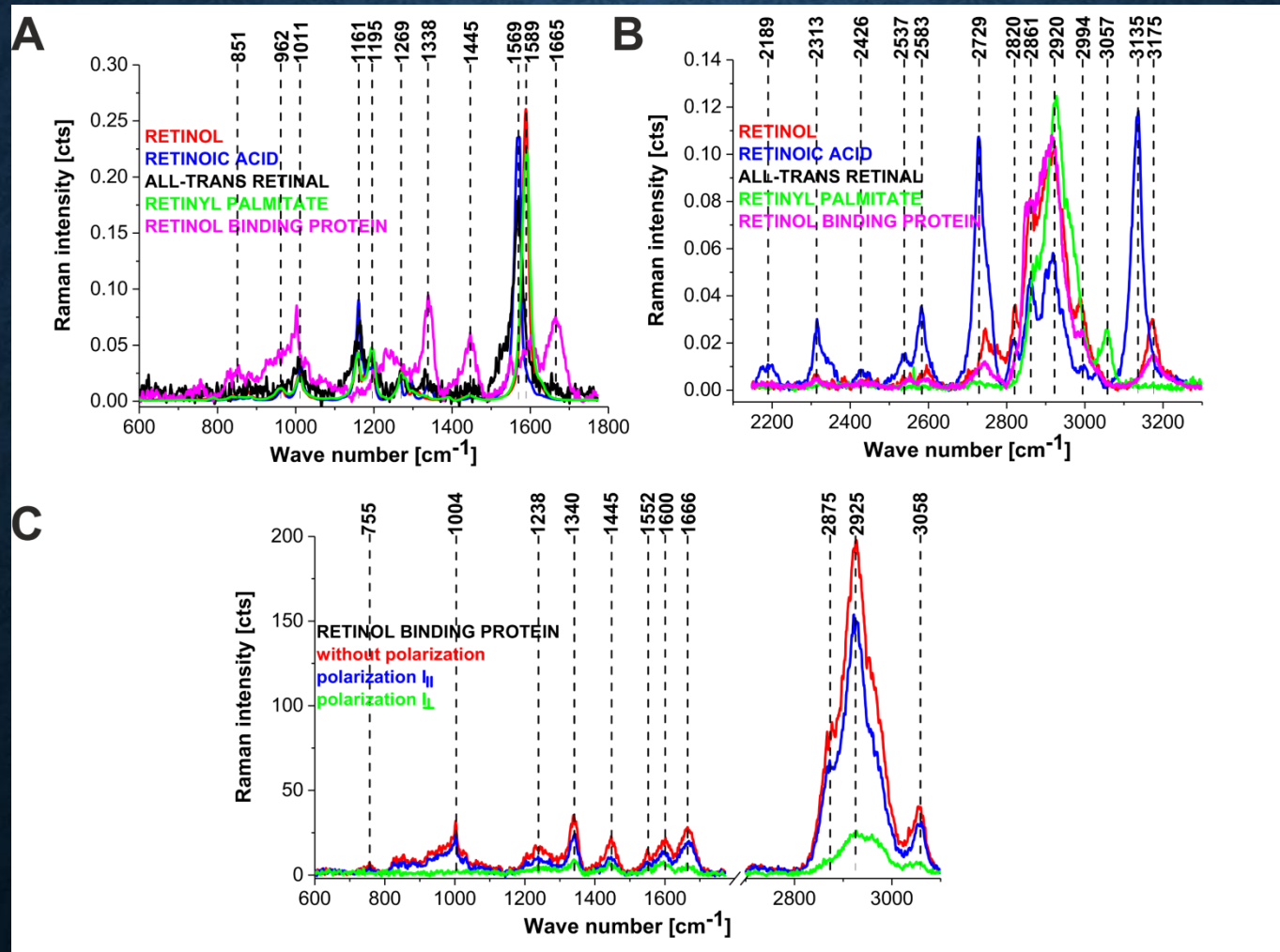
- U1 XY positioner
- U2 Scan stage
- U3 Objective turret with objectives including the inertial drive and the SNOM tip
- U4 Dichroic mirror
- U5 Beam deflection unit
- U6 Binocular tube with ocular camera
- U9 Pushrod
- U14 Microscope Z stage with stepper motor

Obrazowanie AFM

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

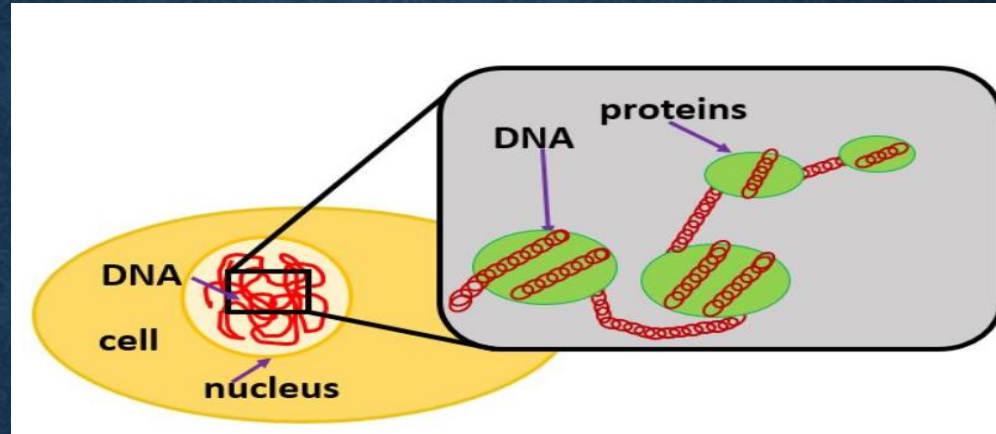
**Nie musimy rozrywać komórek, aby przeanalizować struktury komórkowe**

# WIDMA RAMANA RETINOIDÓW





# KONWENCJONALNA BIOLOGIA MOLEKULARNA



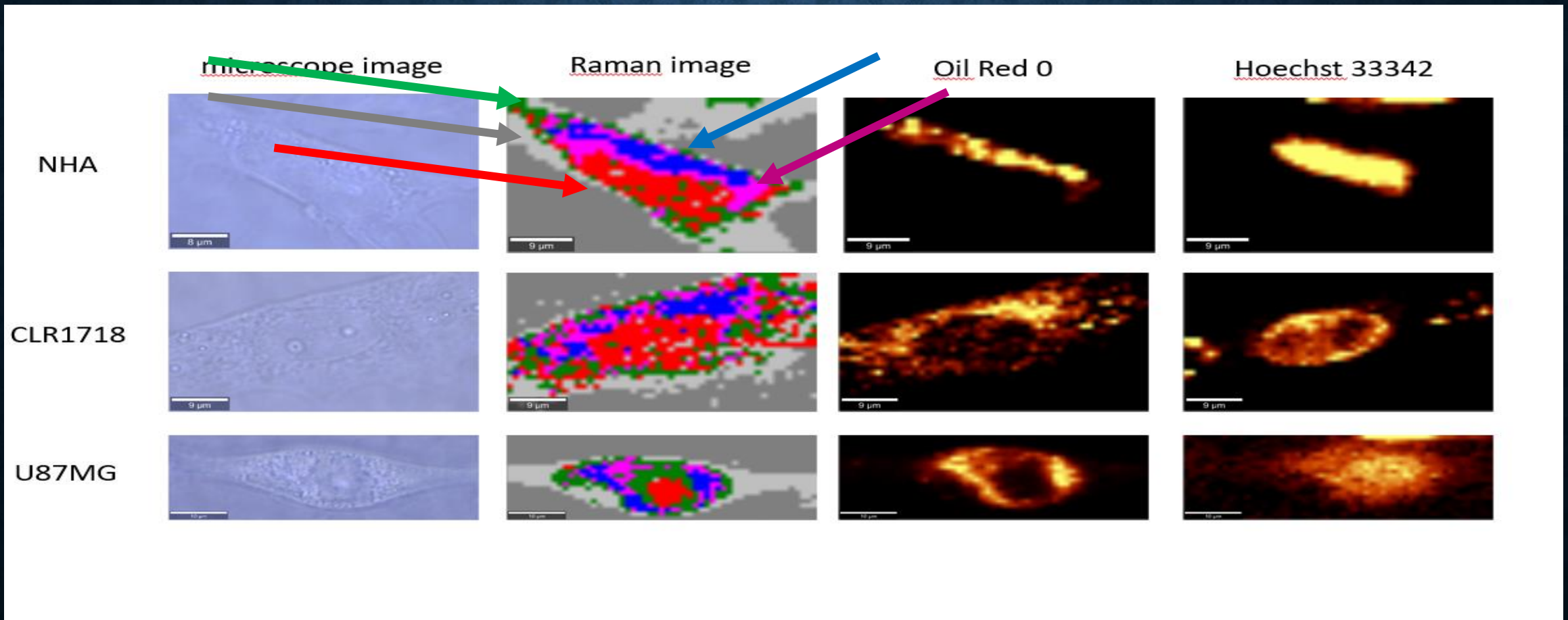
- **IZOLACJA DNA z komórek i tkanek**

- DNA można ekstrahować z wielu typów komórek. Pierwszym krokiem jest liza lub rozerwanie komórki. Można to zrobić także poprzez homogenizację tkanki. Po rozerwaniu komórek dodaje się roztwór soli, taki jak NaCl i roztwór detergentu zawierający związek SDS (sododecylsulfian).

- **Izolacja mitochondriów z komórek i tkanek**

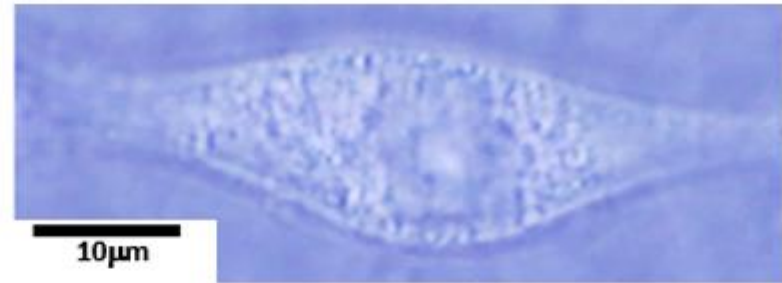
- Protokoły izolacji mitochondrialnej obejmują dwa procesy - rozbicie komórek w celu ich otwarcia i uwolnienia struktur komórkowych oraz wirowanie różnicowe w celu odzyskania frakcji wzbogaconych w mitochondria.

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

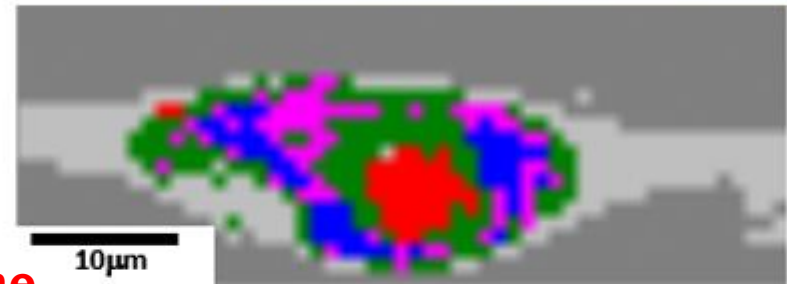


Biologia raka z protokołami genomiki i proteomiki zapewnia tylko częściowy obraz patologii raka. Protokoły izolacji DNA, białek, lipidów lub organelli z komórek i tkanek obejmują rozerwanie komórek w celu otwarcia komórek i uwolnienia struktur komórkowych. W obrazowaniu ramanowskim i IR nie musimy rozbijać komórek, aby dowiedzieć się o ich składzie biochemicznym kropelek lipidów, mitochondriów, cytoplazmy, jądra lub błony w żywych komórkach.

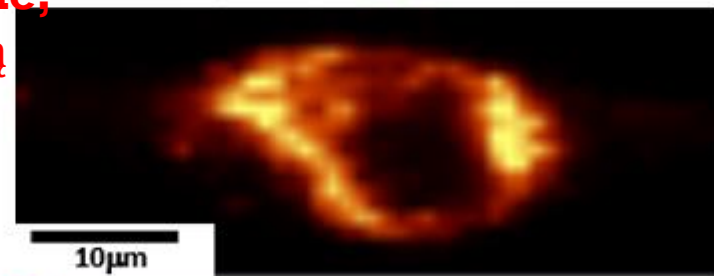
**Jasne pole**  
**Bright field**



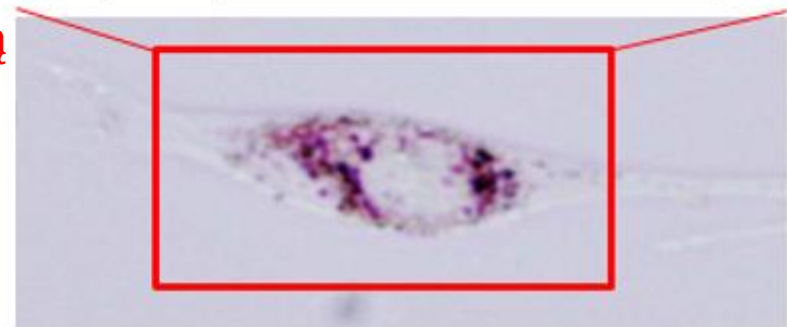
**Obrazowanie Ramana**  
**Raman imaging**



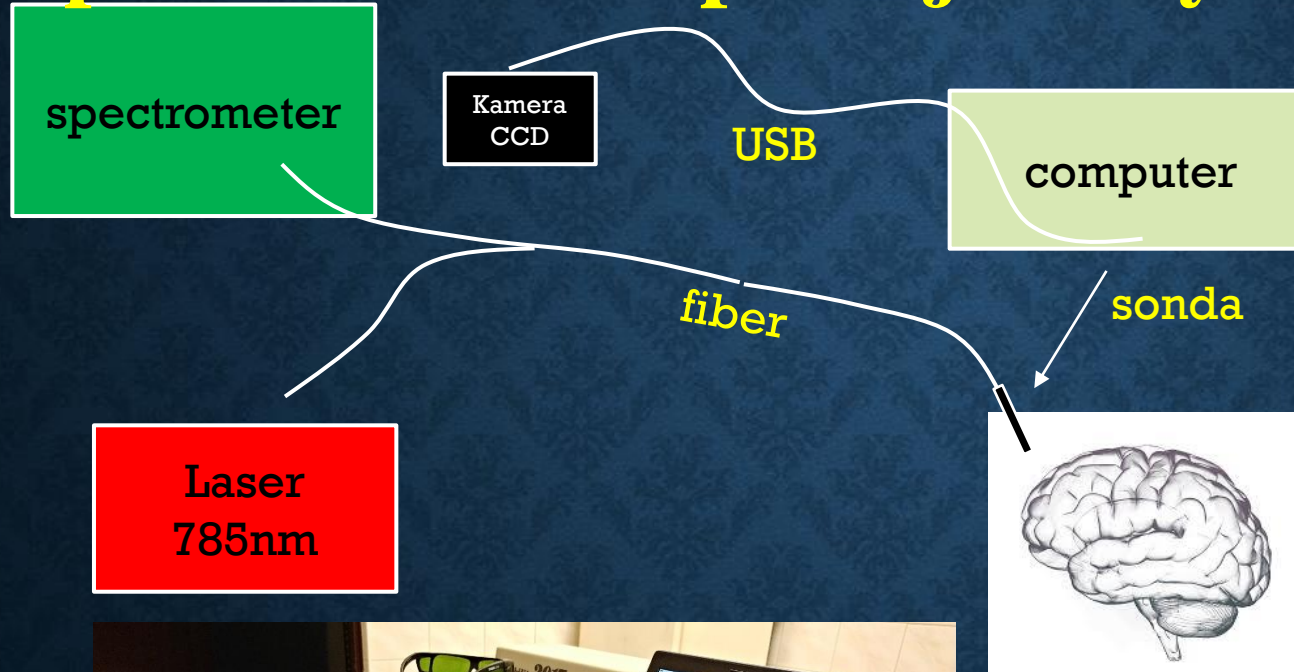
**Obrazowanie fluorescencyjne,**  
**barwienie czerwienią oleistą**  
**Fluorescence**  
**imaging of Oil Red O**



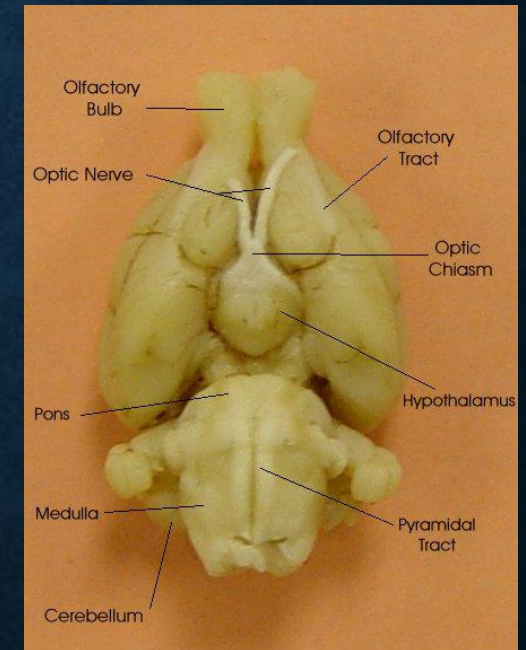
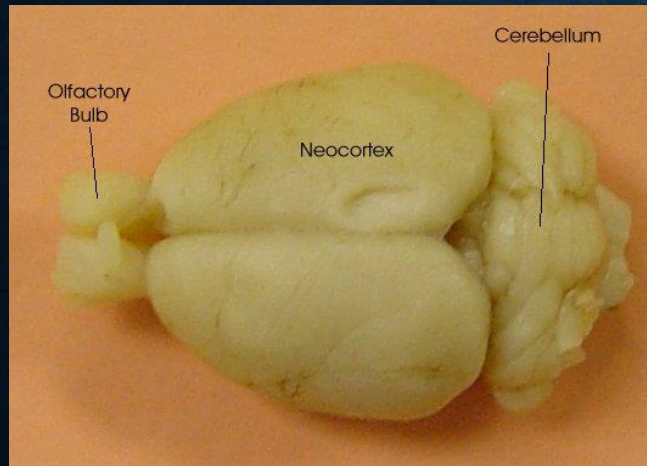
**Jasne pole,**  
**barwienie czerwienią oleistą**  
**Bright field after lipid**  
**staining with Oil Red O**



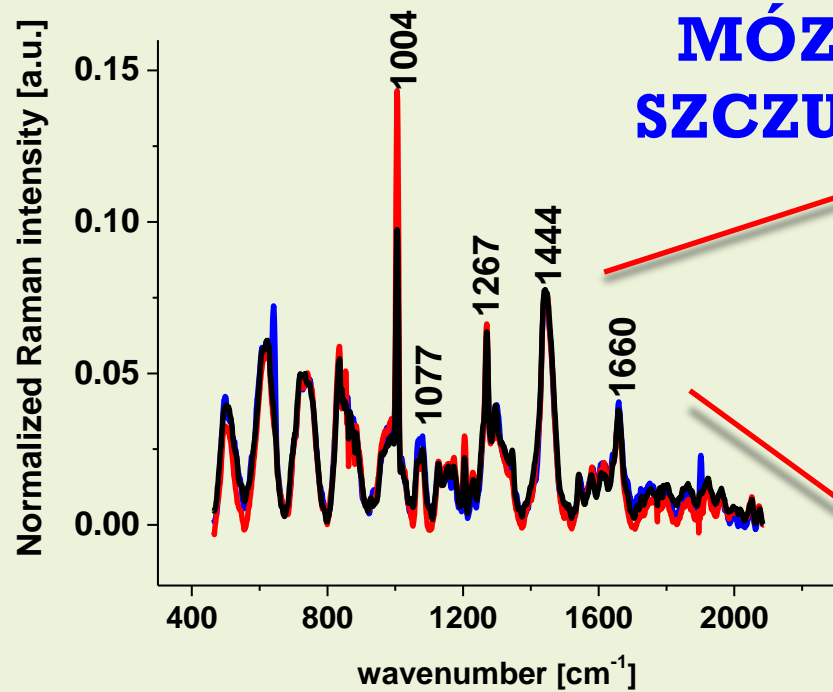
# System Ramana do diagnostyki w czasie rzeczywistym podczas neurooperacji w trybie in-vivo



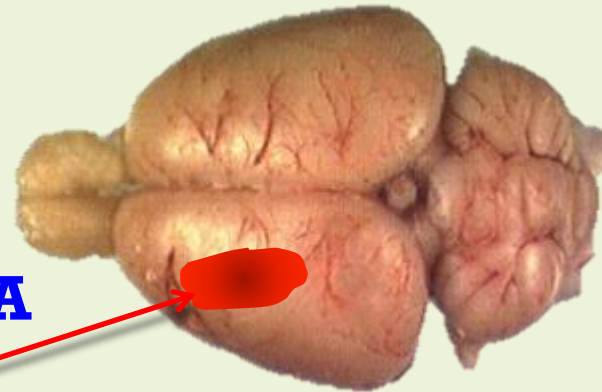
# BIOPSJA OPTYCZNEA MÓZGU SZCURA IN-VIVO W LLSM



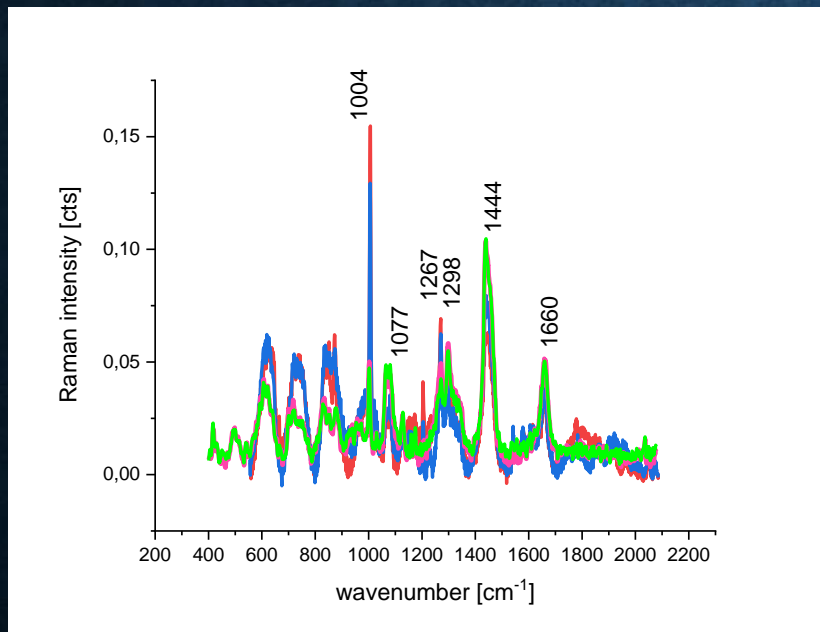
# NAWIGOWANA RAMANOWSKO BIOPSYA OPTYCZNA MÓZGU SZCZURA IN-VIVO



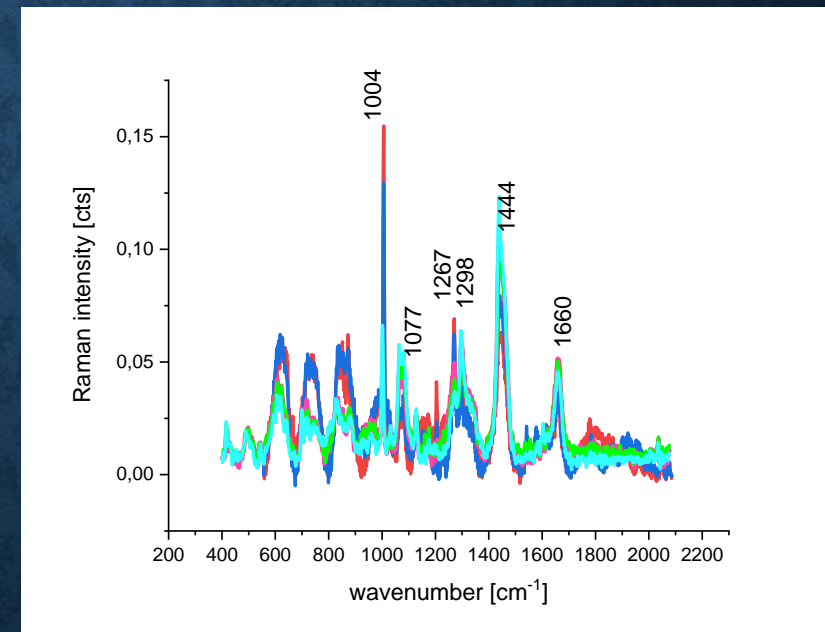
**MÓZG  
SZCZURA**



# BIOPSJA OPTYCZNA MÓZGU SZCZURA IN-VIVO W LLSM



MÓZG IN VIVO



MÓZG EX VIVO

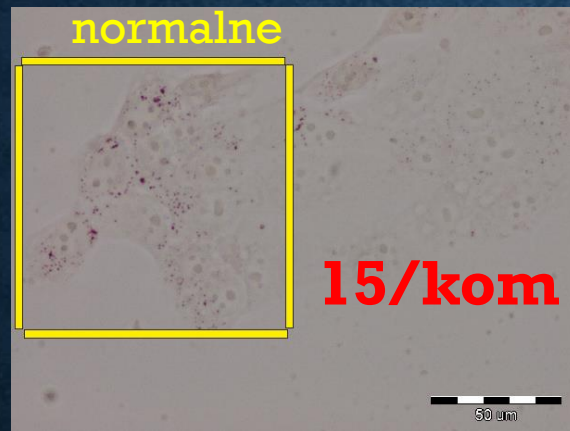
# WIZUALIZACJA KROPLI LIPIDOWYCH

- Choć w niektórych przypadkach morfologia jest dobrym wskaźnikiem zmian metabolicznych w komórkach, równie ważna może być znajomość zawartości komórkowej. W przypadku LD zmiany nasycenia wiązań i długości łańcuchów można powiązać z chorobami.

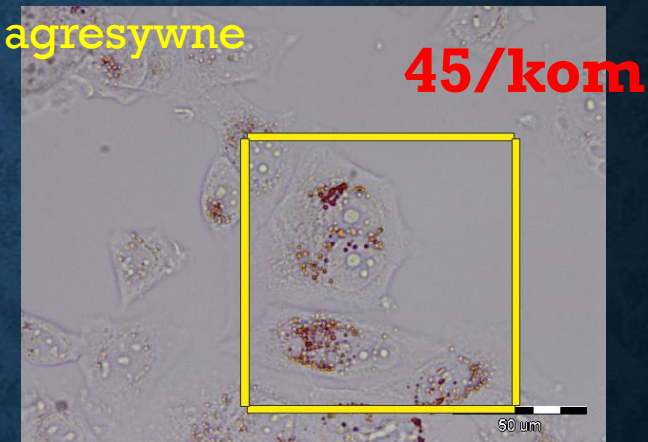


# KROPLE LIPIDOWE W NORMALNYCH KOMÓRKACH GRUCZOŁU PIERSIOWEGO MCF10A W PORÓWNANIU Z KOMÓRKAMI NOWOTWOROWYMI ŁAGODNYMI MCF7 I AGRESYWNIE ZŁOŚLIWYMI MDA-MB-231

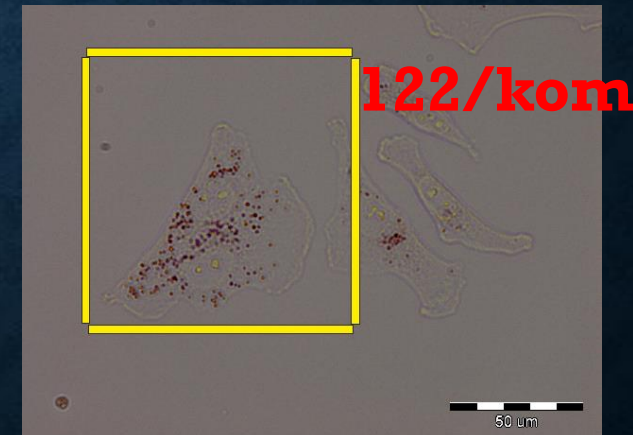
MCF10A – komórki normalne



MCF7 – średnio agresywne



MDA-MB-231 – wysoce agresywne



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

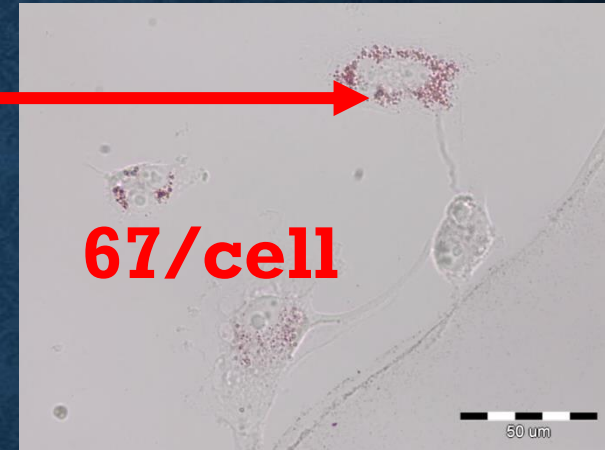
# KROPLE LIPIDOWE W ASTROCYTACH VS GLEJAK WIELOPOSTACIOWY U87



**Astrocyty- komórki normalne**



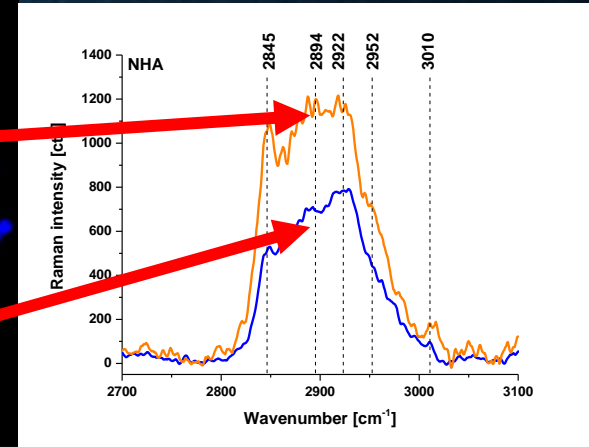
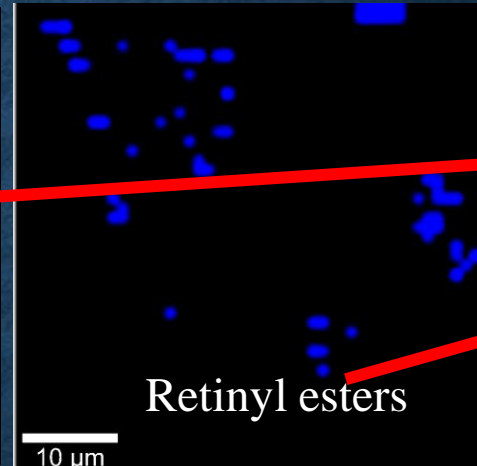
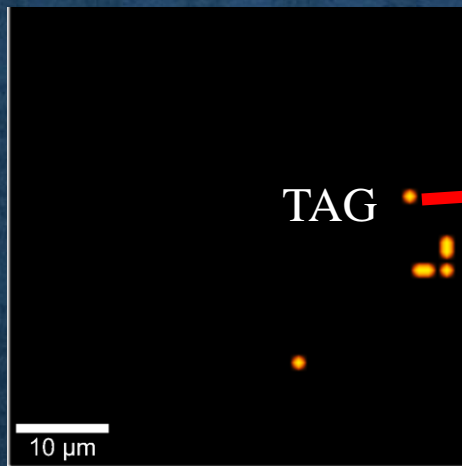
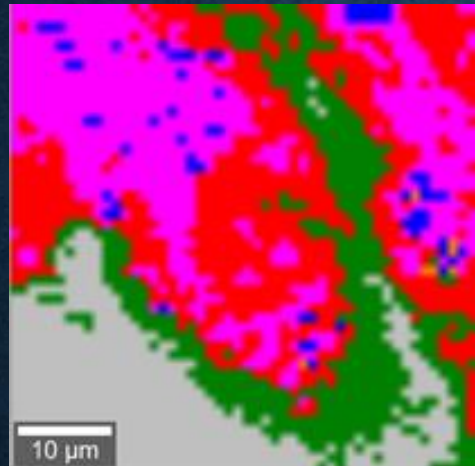
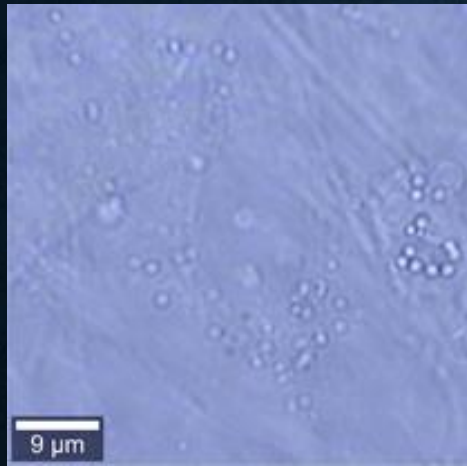
**Astrocytoma –komórki nowotworowe**



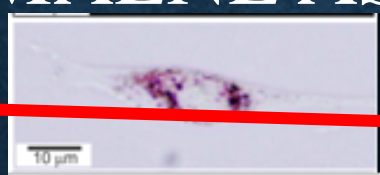
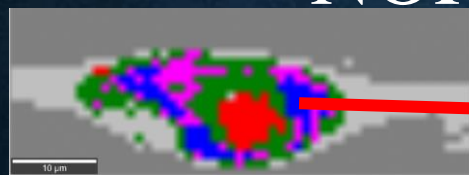
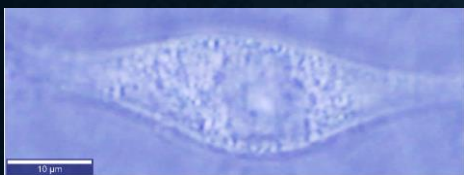
**Glejak U87-  
Komórki wysoce złośliwe**

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

# PRZESTRZENNE ROZMIESZCZENIE RETINOIDÓW W NORMALNYCH ASTROCYTACH I KOMÓRKACH GLEJAKA

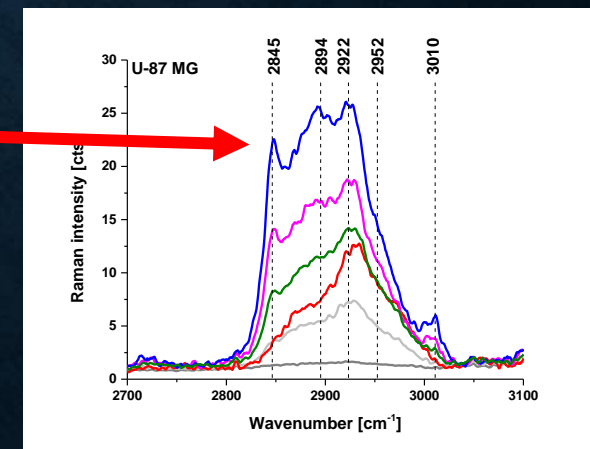


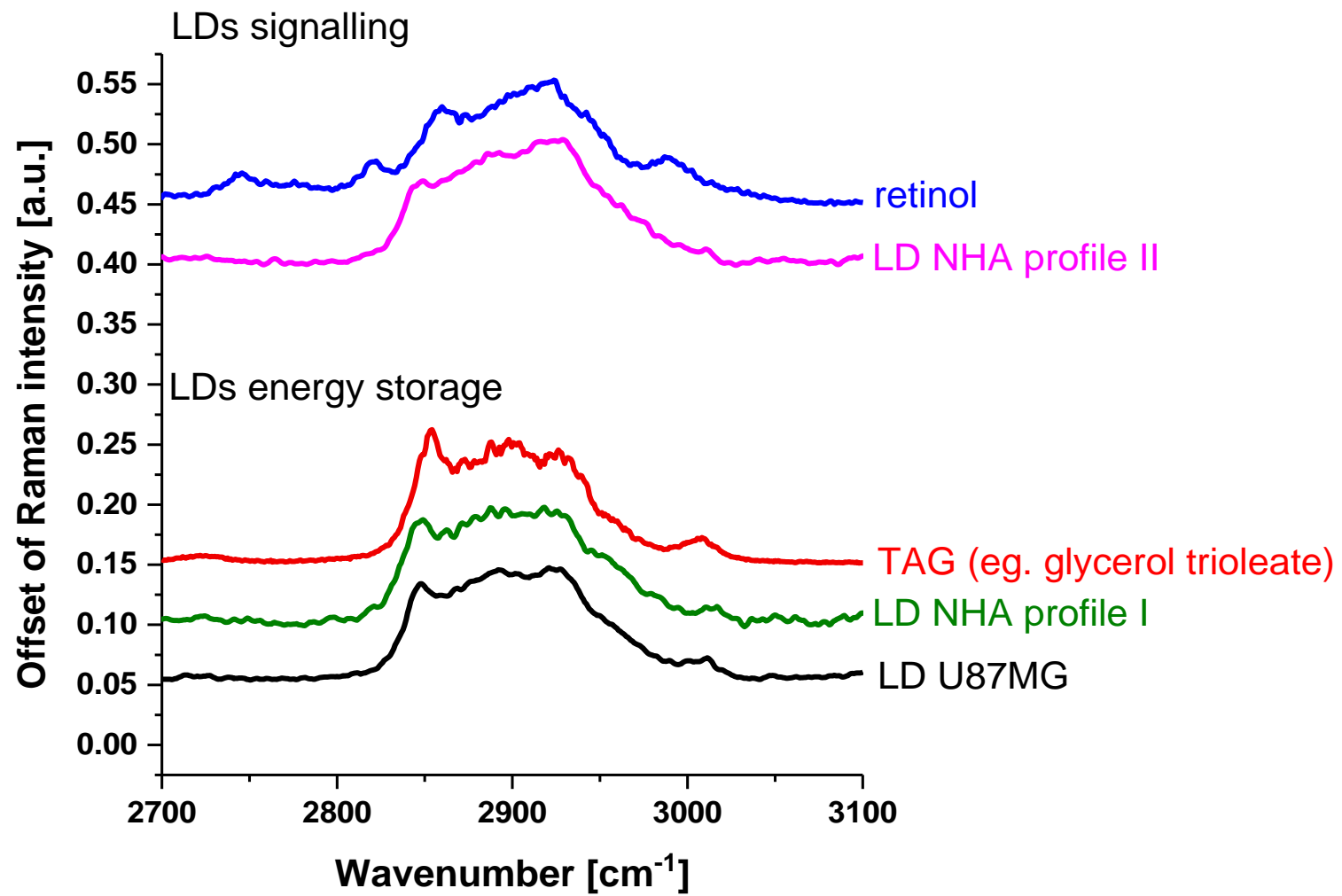
## NORMALNE ASTROCYTY



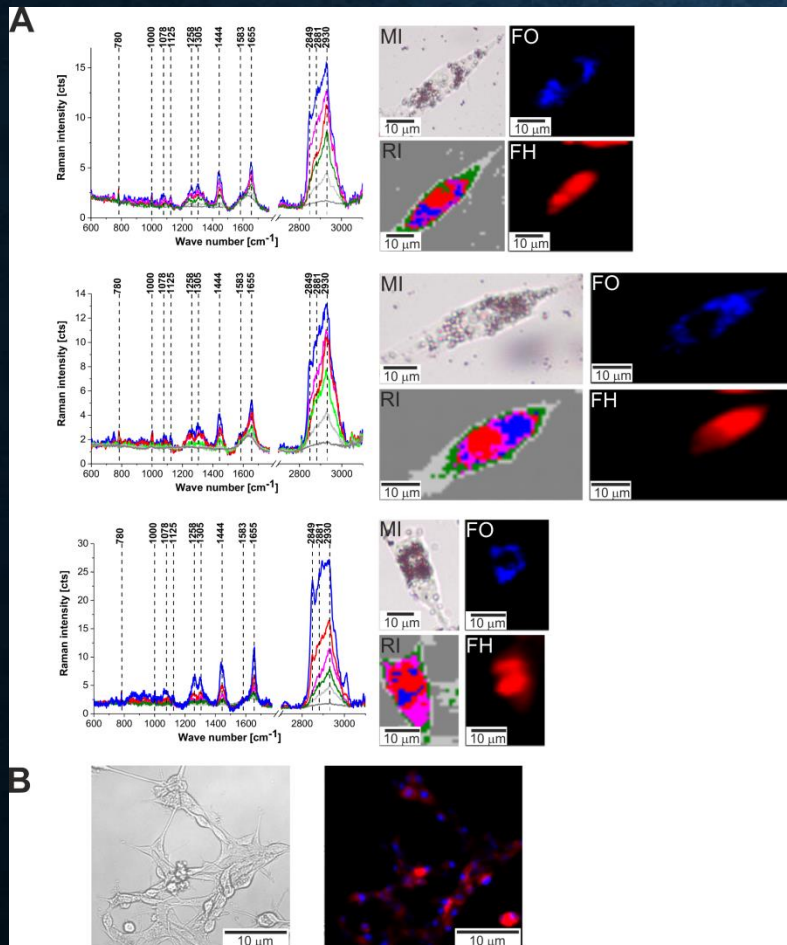
TAG

GLEJAK

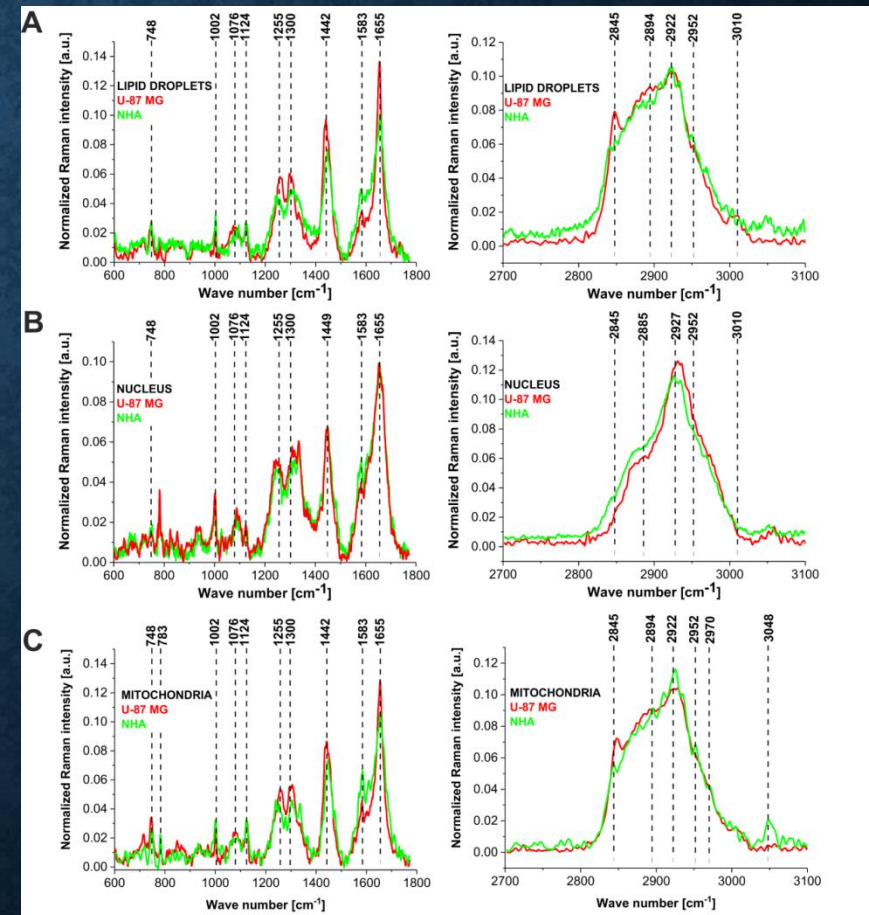




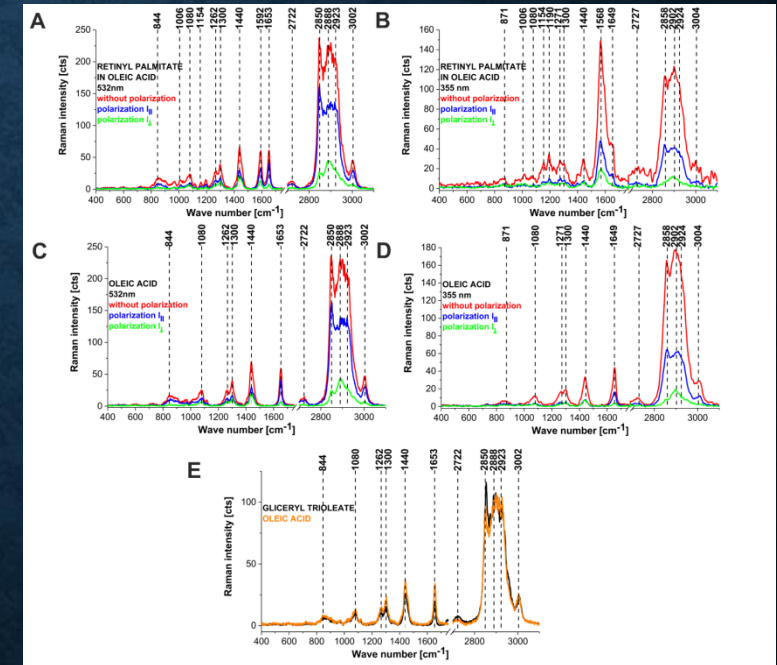
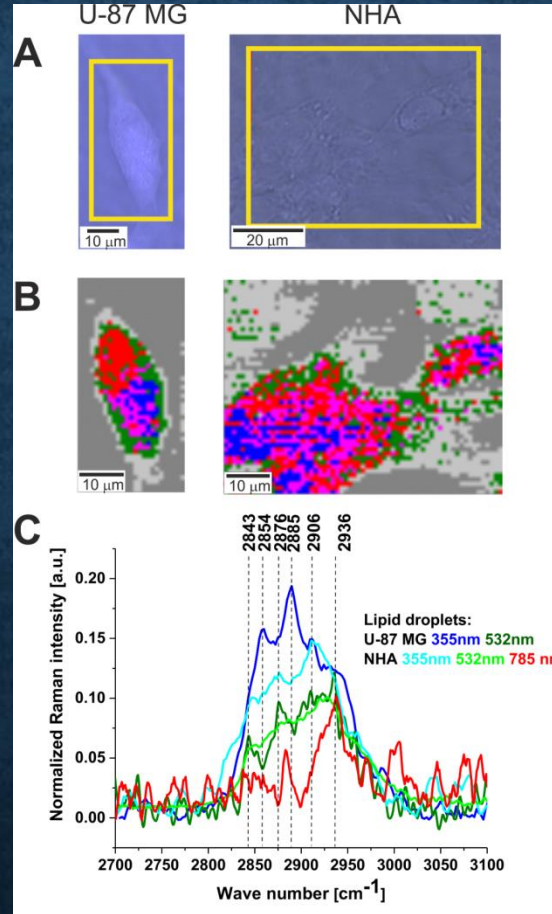
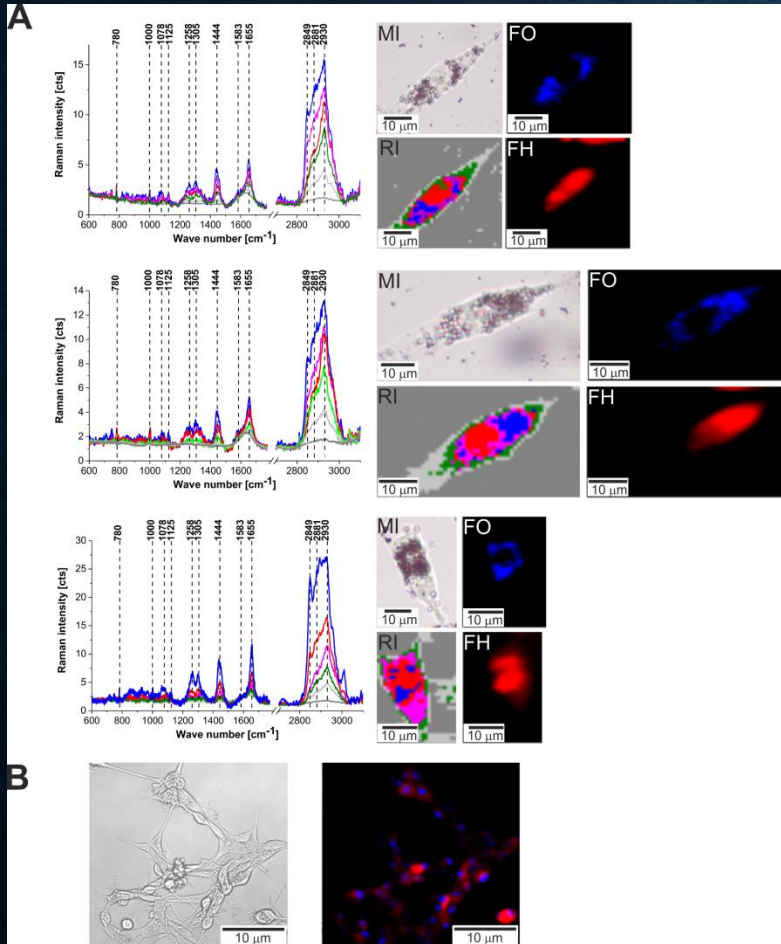
# PRZESTRZENNE ROZMIESZCZENIE RETINOIDÓW W KOMÓRKACH GLEJAKA: RETINOIDY W MITOCHONDRIACH, KROPLACH LIPIDOWYCH, JĄDRZE



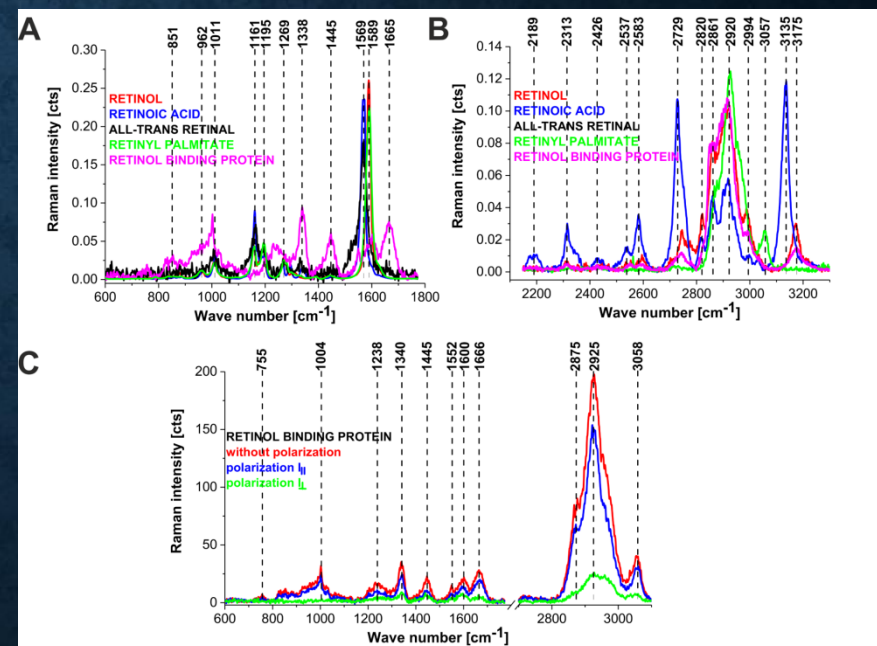
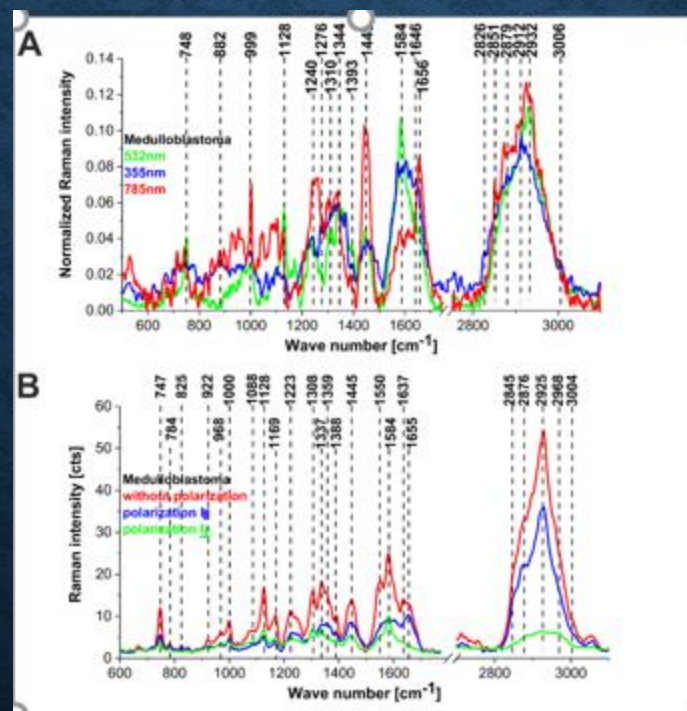
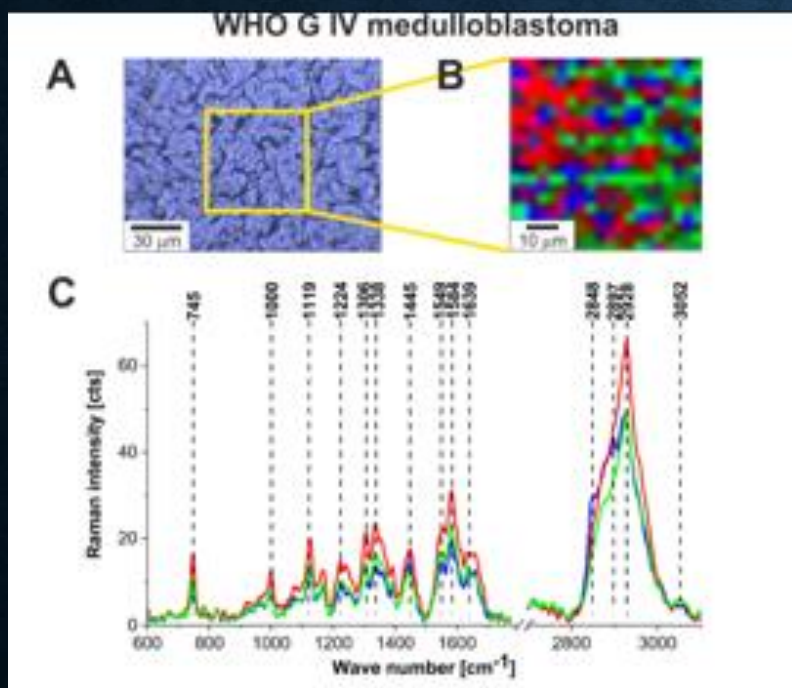
W obrazowaniu ramanowskim nie musimy niszczyć komórek, by analizować struktury komórkowe, aby dowiedzieć się o składzie biochemicznym kropli lipidowych, jądra, mitochondriów



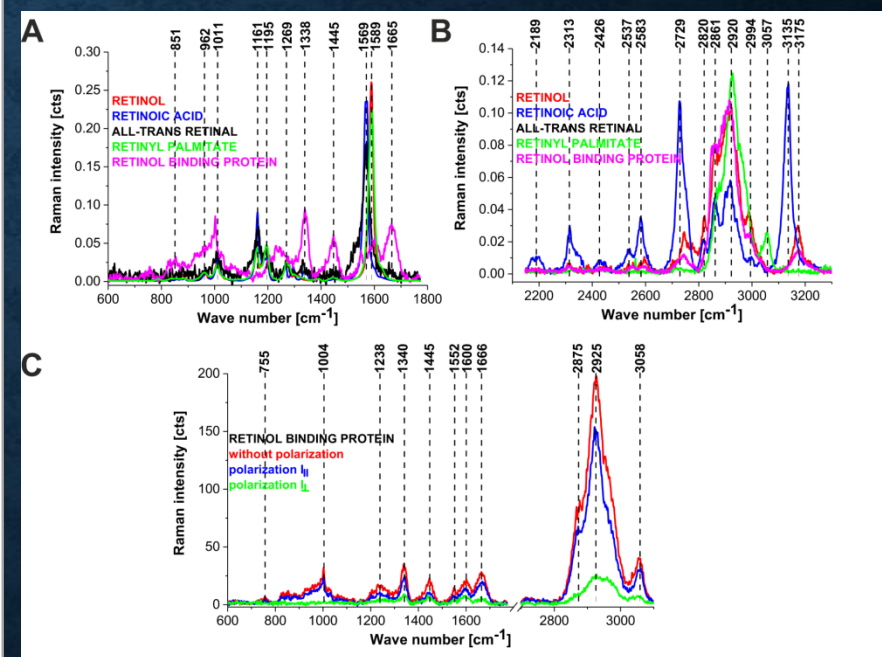
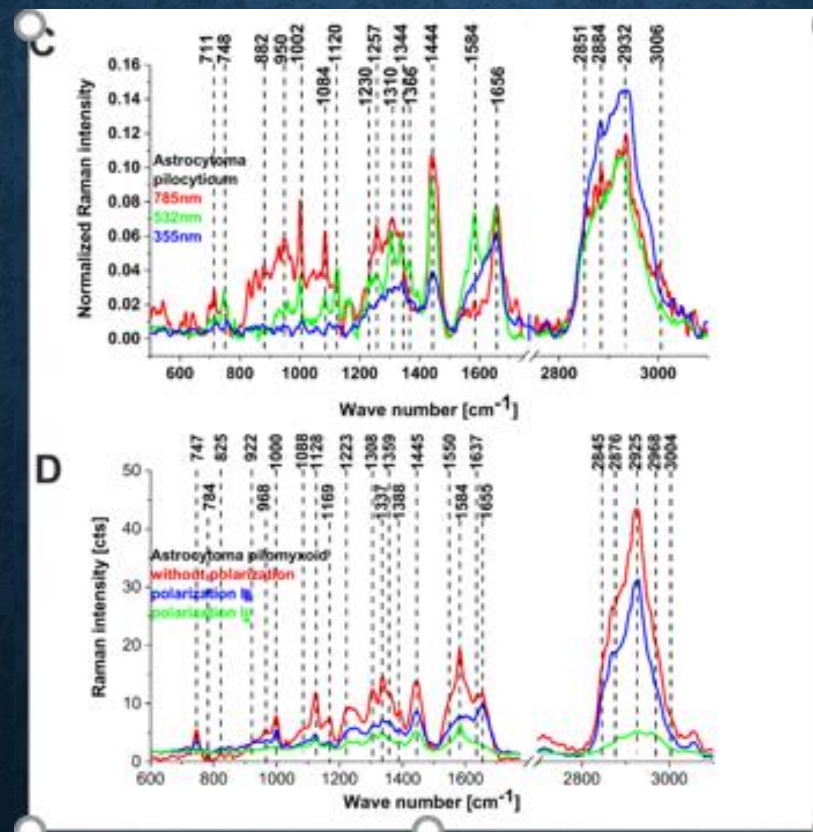
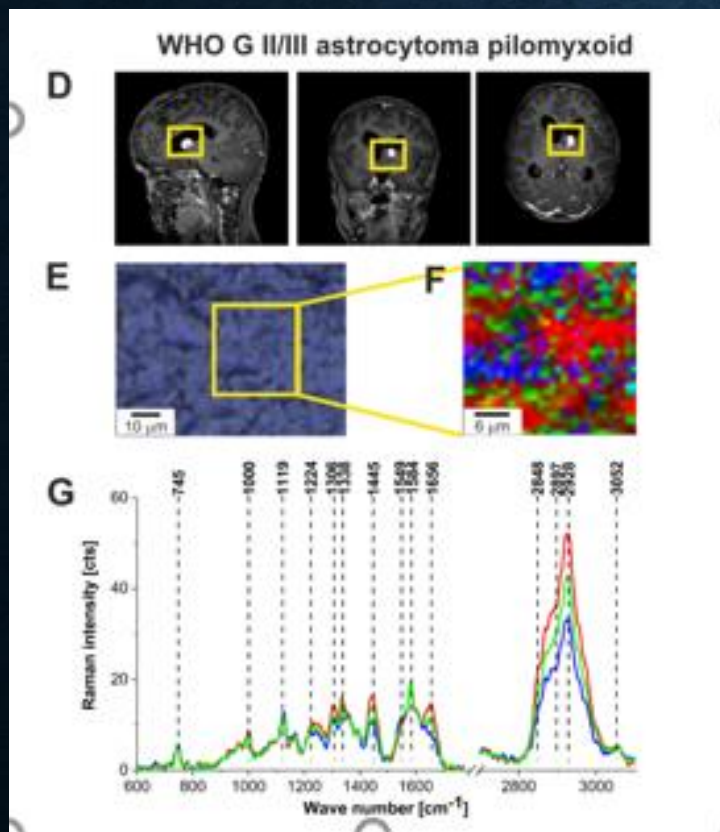
# PRZESTRZENNE ROZMIESZCZENIE RETINOIDÓW W NORMALNYCH ASTROCYTACH I GLEJAKU. REZONANSOWE WIDMA RAMANOWSKIE I WIDMA POLARYZACYJNE



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



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

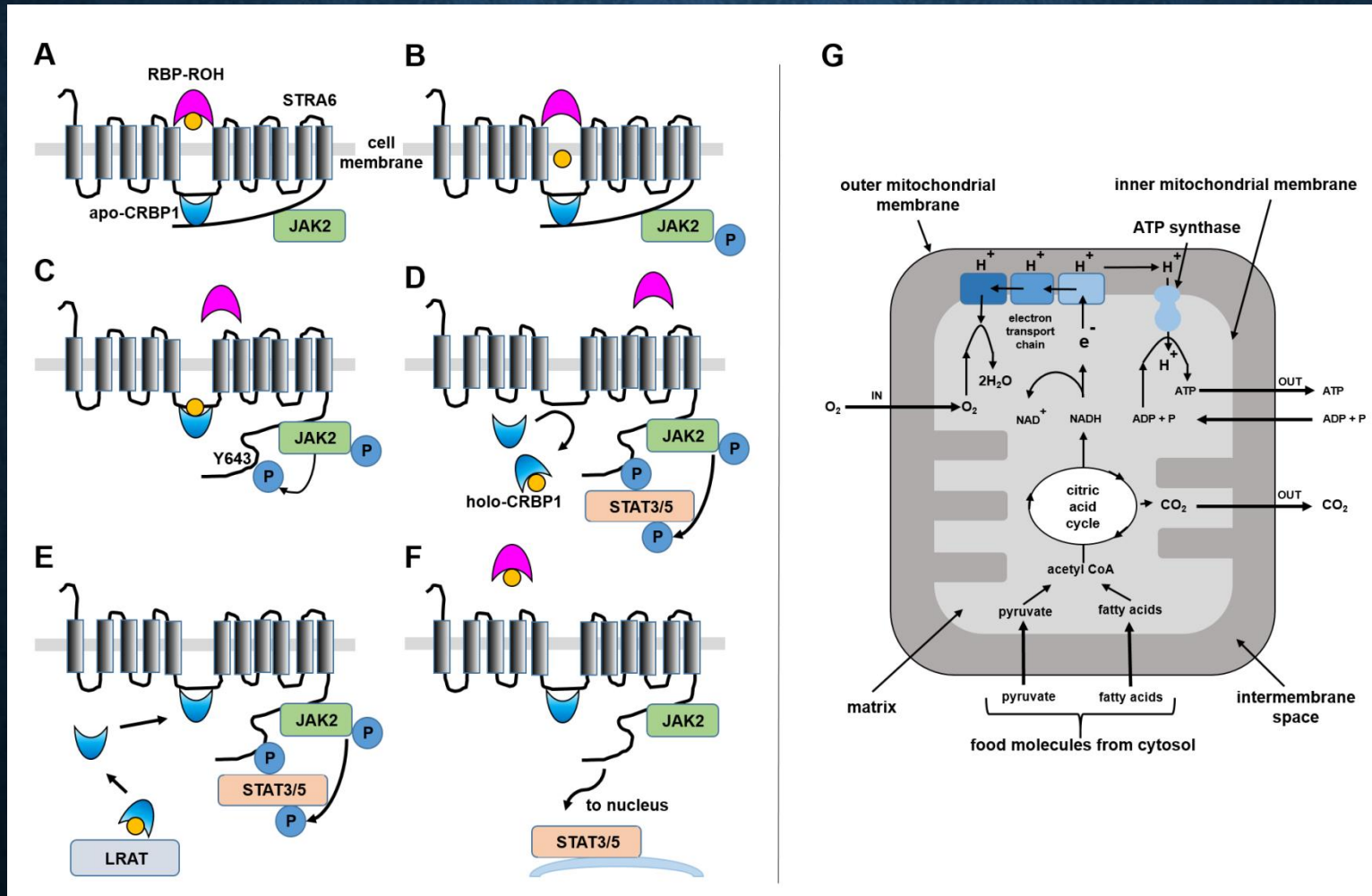




# WNISOKI

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

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



# WNISOKI OGÓLNE

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

# SPEKTROSKOPIA CZASOWO-ROZDZIELCZA I STYMULOWANA SPEKTROSKOPIA RAMANA

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