

## **Reportery ramanowskie jako narzędzie do oceny różnicowania komórek na przykładzie modeli *in vitro* komórek prekursorowych krwi linii mieloidalnej.**

Hematopoeza jest wieloetapowym procesem, w wyniku którego dochodzi do wytworzenia i zróżnicowania elementów morfotycznych krwi, zachodzącym w szpiku kostnym. Jest ona regulowana przez warunki fizykochemiczne, pozwalające na transformację hematopoetycznej komórki macierzystej do w pełni dojrzałych, funkcjonalnych komórek krwi. Wszelkie nieprawidłowości na poziomie różnicowania i właściwej proliferacji komórek prekursorowych wpływają na morfologię krwi. Skutkuje to m.in. zaburzeniem jej istotnych funkcji, takich jak: odpowiedź immunologiczna, transport składników odżywczych i gazów itd. Proces różnicowania się prekursorów komórek krwi (tzw. blastów) charakteryzuje się zmianami metabolicznymi związanymi z produkcją istotnych białek, zmianą skondensowania chromatyny, czy też częściową lub całkowitą utratą funkcjonalności wybranych organelli komórkowych. Tak więc pierwsze oznaki różnicowania można wykryć poprzez barwienie dystrybucji i zdolności organelli do podtrzymywania prawidłowych funkcji. Klasyczne podejście do obrazowania pojedynczych komórek polega na zastosowaniu barwienia rozmazów obwodowych oraz mikroskopii fluorescencyjnej. **Celem tego projektu jest znalezienie unikalnych markerów pozwalających na określenie zmian chemicznych i morfotycznych związanych z indukowanym różnicowaniem komórek w trzech układach modelowych linii białaczkowych w kierunku erytrocytów, monocytów, makrofagów, neutrofilii i eozynofili wykorzystując szereg metod spektroskopowych takich jak: obrazowanie ramanowskie, obrazowanie z wykorzystaniem molekularnych reporterów ramanowskich, fluorescencyjne oraz testów biochemicznych i cytometrii.** W szczególności ocenie zostaną poddane zmiany stanu biochemicznego mitochondrium, jądra komórkowego, siateczki śródplazmatycznej czy lizosomów. Szczegółowa ocena zmian na biochemicznych i morfologicznych na poziomie subkomórkowym pozwoli na charakterystykę i śledzenie zmienności fenotypu komórek podczas indukowanego różnicowania wybranych komórek prekursorowych w kierunku erytrocytów, monocytów, neutrofilii i eozynofili, co z kolei pozwoli na lepsze zrozumienie procesu różnicowania komórek w kontekście terapeutycznym w przypadku badań nad nowymi lekami przeciw białaczkowymi.

Głównym narzędziem badawczym do oceny stanu biochemicznego będzie mikroskopia ramanowska pozwalająca na niedestruktywną identyfikację składników próbki, z jednoczesnym wskazaniem ich dystrybucji przestrzennej z rozdzielczością kilkuset nm. Pomimo wielu zalet spektroskopii ramanowskiej, w szczególności wynikających z możliwości bezznacznikowej detekcji składu biochemicznego, obecnie na znaczeniu zyskuje koncepcja wykorzystywania molekularnych reporterów ramanowskich do szybkiego obrazowania. Są to związki podstawione izotopowo lub posiadające w swojej strukturze wiązania potrójne oraz selektywną grupę kierującą do odpowiednich struktur stukomórkowych. Taka budowa chemiczna pozwala na rejestrowanie pasm charakterystycznych w obszarze niespecyficznym dla znacznej ilości związków pochodzenia biologicznego, co pozwala na uniknięcie nakładania się pasm ramanowskich. Szczególnym zainteresowaniem cieszy się idea obrazowania wielu organelli komórkowych jednocześnie, wykorzystując szereg odpowiednio zaprojektowanych sond ramanowskich o niewielkiej szerokości pasm w porównaniu do konwencjonalnie wykorzystywanych znaczników fluorescencyjnych. Jest to szczególnie ważne, jeśli weźmie się pod uwagę możliwość zastosowania tego typu znaczników w obrazowaniu z wykorzystaniem obecnie rozwijanych nieliniowych technik ramanowskich, takich jak wymuszona spektroskopia ramanowska (SRS, ang. *Stimulated Raman Scattering*), umożliwiających wzmocnienie sygnału. Połączenie technik obrazowania z zastosowaniem reporterów ramanowskich daje wysoce selektywne i czułe narzędzie do monitorowania nie tylko zmian biochemicznych komórek w związku z ich indukowanym różnicowaniem ale pozwoli na kompleksową analizę morfologiczną komórek w pojedynczych komórkach.

Poza doбором odpowiednich związków jako potencjalnych znaczników w niniejszym projekcie, istotne jest opracowanie pełnej metodologii obrazowania ramanowskiego z ich wykorzystaniem w celu uzyskania optymalnych warunków, pozwalających na szybkie rozróżnienie poszczególnych etapów dojrzewania prekursorowych komórek krwi. Zastosowanie znaczników wymaga również kompleksowych badań cytotoxycywności, co zostanie przeprowadzone, wykorzystując szereg dodatkowych metod analitycznych, pozwalających określić zmiany na poziomie biochemicznym i morfologicznym w badanych układach.