

Streszczenie

Jednym z ważnych kierunków rozwoju (bio)analitik jest projektowanie metod wykorzystujących chemiczne „odciski palca” (zestaw sygnałów analitycznych) i narzędzia chemometryczne, co ma pozwolić na ograniczenie wieloetapowych procedur przygotowania próbki i użycia skomplikowanych technik instrumentalnych, a także zwiększyć dostępność metod (bio)analitycznych. Potencjalnie bogatym nośnikiem informacji chemicznej stanowiącym unikalny, fluorescencyjny „odcisk palca” badanej próbki może być widmo wzbudzenia-emisji (EEM, ang. *excitation-emission matrix*), uzyskiwane w wyniku pomiaru fluorescencji multispektralnej. **Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie metod (bio)analitycznych wykorzystujących fluorescencję multispektralną i metody chemometryczne do analizy próbek biologicznych** (hodowli komórkowych), a także **detekcji (bio)analitów wykazujących duże podobieństwo strukturalne** (neuroprzekazniki, fragmenty peptydowe amyloidu β). Prace badawcze realizowane były w dwóch podejściach – stosując fluorescencję multispektralną do badania zmian w natywnej fluorescencji hodowli komórkowych lub zmian we właściwościach fluorescencyjnych wybranych (nano)receptorów – kropek kwantowych (QDs, ang. *quantum dots*) – w wyniku kontaktu z (bio)analitami.

Badania rozpoczęto od **weryfikacji hipotezy badawczej dotyczącej możliwości zastosowania fluorescencji multispektralnej i metod chemometrycznych do badania zmian żywotności komórek w hodowli *in vitro***, wywołanych przez fizyczny lub chemiczny czynnik stresogenny. Prace eksperymentalne prowadzono na dwóch liniach komórek adherentnych skóry: linii nowotworowej czerniaka złośliwego (A375) i linii prawidłowej keratynocytów (HaCaT). Krytycznym punktem badań było opracowanie procedury przygotowania hodowli komórkowych do pomiarów fluorescencji multispektralnej i metody akwizycji widm wzbudzenia-emisji z wykorzystaniem czytnika płytek wielodołkowych. Następnie utworzono bibliotekę widm wzbudzenia-emisji hodowli komórek A375 i HaCaT o różnej żywotności. Zastosowanie klasycznej metody częściowych najmniejszych kwadratów (PLS, ang. *partial least squares*) pozwoliło na skorelowanie informacji o endogennych fluoroforach zakodowanej w widmach wzbudzenia-emisji hodowli komórek linii A375 z referencyjną wartością średniej żywotności komórkowej wyznaczoną za pomocą testu MTT. Z kolei dekompozycja widm wzbudzenia-emisji hodowli komórek A375 i HaCaT za pomocą współbieżnej analizy wieloczynnikowej (PARAFAC, ang. *parallel factor analysis*) pozwoliła zidentyfikować profile wzbudzenia i emisji oraz wyznaczyć względne stężenia pięciu fluoroforów obecnych w próbkach, które mogą być związane ze zmianami żywotności

komórkowej. Ewaluacja statystyczna średnich wartości żywotności komórkowej uzyskanej za pomocą modelu PLS, a także zbudowanego na podstawie wyników analizy PARAFAC modelu wielokrotnej regresji liniowej (MLR, ang. *multiple linear regression*), wykazała wysoką zgodność z wynikami testu MTT, taką samą dokładność i nawet wyższą czułość niż metoda tradycyjna. Rezultatem przeprowadzonych prac badawczych było więc zaproponowanie nieinwazyjnej i bez-znacznikowej metody testowania żywotności komórek w hodowli *in vitro*, wykorzystującej fluorescencję multispektralną i metody chemometryczne.

Kolejny etap badań dotyczył **weryfikacji hipotezy badawczej dotyczącej możliwości zastosowania fluorescencji multispektralnej kropek kwantowych, która ulegała zmianie wynikającej z oddziaływań z różnymi (bio)analitami, do ich analizy jakościowej i/lub ilościowej**. Za pomocą metod chemometrycznych badano efektywność dostarczenia informacji optycznej użytecznej do rozróżnienia, rozpoznania i/lub oznaczania ilościowego wybranych celi analitycznych o zróżnicowanym podobieństwie strukturalnym. Badania przeprowadzone na grupie neuroprzekazników dowiodły, że fluorescencja multispektralna umożliwia uchwycenie subtelnych różnic we wpływie (bio)analitów na właściwości fluorescencyjne kropek kwantowych, które nie są widoczne w przypadku klasycznie przeprowadzonej analizy (kiedy rozważana jest jedynie intensywność fluorescencji rejestrowana przy optymalnych warunkach wzbudzenia). W konsekwencji, przetwarzanie uzyskanych widm wzbudzenia-emisji za pomocą metod chemometrycznych pozwoliło uzyskać najlepsze rozróżnienie i rozpoznanie (bio)analitów. Wykazano również, że proponowana metoda może być z powodzeniem wykorzystana do przeprowadzenia analizy ilościowej neuroprzekazników katecholaminowych. W kolejnym etapie zaproponowano metodę wykorzystującą jeden rodzaj kropek kwantowych i fluorescencję multispektralną do detekcji krótkich fragmentów peptydowych amyloidu β ($A\beta$), które wykazują zdecydowanie większe podobieństwo strukturalne niż badane wcześniej neuroprzekazniki. Przeprowadzone badania pozwoliły na wykazanie potencjału proponowanej metody w detekcji zarówno pojedynczych, jak i znajdujących się w mieszaninie peptydów $A\beta$, nawet na poziomie nanomolowym. Uzyskane w tej części pracy wyniki są wysoce istotne w kontekście projektowania metod (bio)analitycznych wykorzystujących chemiczne „odciski palca” do identyfikacji strukturalnie podobnych związków chemicznych.

Ostatnim etapem pracy doktorskiej było przeprowadzenie badań nad wydajnością wybranych sposobów przetwarzania danych i metod chemometrycznych w analizie jakościowej i/lub ilościowej modelowych (bio)analitów. Efektem

zrealizowanych badań było wykazanie, że pomimo dużego stopnia skomplikowania analizowanych danych chemicznych, zgodnie z regułą brzytwy Ockhama, klasyczne warianty metody częściowych najmniejszych kwadratów pozwalają na otrzymanie modeli klasyfikacyjnych i regresyjnych charakteryzujących się dobrymi parametrami jakościowymi. W konsekwencji, przeprowadzone badania podkreślają duże znaczenie weryfikacji działania podstawowych narzędzi chemometrycznych przed sięgnięciem po bardziej zaawansowane sposoby analizy danych.

Przedstawione w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania wykazały, że fluorescencja multispektralna w połączeniu z metodami chemometrycznymi stanowi atrakcyjne i wydajne narzędzie (bio)analityczne, charakteryzujące się satysfakcjonującymi parametrami analitycznymi, oraz umożliwiające szybką, bez-znacznikową, zautomatyzowaną analizę o wysokiej przepustowości dzięki kompatybilności z czytnikami płytek wielodołkowych.

Słowa kluczowe: fluorescencja multispektralna, widma wzbudzenia-emisji, metody chemometryczne, hodowle komórkowe, żywotność komórkowa, kropki kwantowe, neuroprzekazniki, peptydy A β