

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 20__ р.

**ВИКОРИСТАННЯ FTIR-ATR-СПЕКТРОСКОПІЇ ДЛЯ РОЗРОБКИ
МЕТОДОЛОГІЇ АНАЛІЗУ ПАТОЛОГІЙ МИШЕЙ**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання
за спеціальністю
Біотехнології та біоінженерія
Борозенець Анастасії Олександрівни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доцент Гребіник
Д.М.

Робота виконана на базі ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова
НАМН України» під керівництвом завідувача лабораторією епігенетики
Красненкова Дмитра Сергійовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ІЧ	–	інфрачервоне світло;
FTIR	–	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (інфрачервона-спектроскопія з перетворенням Фур'є);
ATR	–	Attenuated Total Reflectance (порушене повне внутрішнє відбиття);
PCA	–	Principal Component Analysis (аналіз головних компонентів);
FDR	–	False Discovery Rate (метод Бенджаміні-Хохберга);
PLS-DA	–	Partial Least Squares Discriminant Analysis (дискримінантний аналіз методом часткових найменших квадратів).

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. FTIR-ATR-спектроскопія як інструмент дослідження патологій у мишей	7
1.1. Фізико-хімічні принципи методу FTIR-ATR-спектроскопії	8
1.2. FTIR-ATR-спектроскопія біологічних макромолекул	12
1.3. Математична обробка та статистичний аналіз спектрів	15
1.4. Біологічні моделі патологій у мишей	19
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	22
2.1. Тварини та умови утримання	22
2.2. Досліджувані групи.....	23
2.3. Створення моделей з пухлинами	23
2.4. Оцінка росту пухлин	24
2.5. Введення препаратів	25
2.6. Оцінка стану тварин.....	25
2.7. Некропсія та забір органів.....	25
2.8. Підготовка зразків та реєстрація спектрів FTIR-ATR	26
2.9. Математична обробка спектрів.....	26
2.10. Статистичний аналіз	27
2.11. Біоетичні аспекти	27
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	29
3.1. Порівняння спектрів печінки моделі гепатоцелюлярної карциноми та контрольної групи	30
3.2. Порівняння спектрів печінки моделі гепатоцелюлярної карциноми та контрольної групи	33
3.3. Порівняння спектрів печінки моделі меланому та гепатоцелюлярної карциноми	47
3.4. Оцінка біохімічних та молекулярно-біологічних змін в тканинах печінки при лікуванні	56

	4
ВИСНОВКИ	58
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	59

ВСТУП

Гістологія, в якій людське око виступає детектором, а накопичений у пам'яті патолога досвід – діагностичним дискримінатором, фактично є однією з основних методів виявлення захворювань. Водночас її чутливість та специфічність обмежена рівнем структурних змін: на ранніх етапах патологічного процесу тканина може не демонструвати виражених морфологічних відхилень. У таких випадках для виявлення патології необхідне залучення біохімічних та молекулярно-генетичних методів, що є занадто ресурсоємними.

Тому сучасна медицина, особливо онкологія, потребує нових засобів діагностики [1]. У цьому контексті особливого значення набувають підходи, що дозволяють безпосередньо оцінювати біохімічні (біоорганічні) та молекулярно-біологічні властивості тканин. Використання FTIR-ATR-спектроскопії дозволяє одночасно відстежувати зміни у вторинній структурі складових протеому, ліпідному складі мембран, проводити напівкількісне визначення вуглеводного складу та досліджувати конформації нуклеїнових кислот, таким чином можна виявити незначні біохімічні зрушення, які передують явним морфологічним змінам при онкології [2]. Зокрема, можна прослідкувати накопичення неправильно згорнутих білків та зміни у відносному вмісті α -спіральних і β -структурних конформацій, що є ознаками клітинного стресу та злоякісної трансформації [3]. Безумовними перевагами методу є висока швидкість отримання результатів, мінімальна пробопідготовка та відносна економічність порівняно з традиційними методами, такими як імуногістохімія, полімеразна ланцюгова реакція чи імуноферментний аналіз [4].

Зважаючи на все вищевказане метою роботи було розробити методологію застосування FTIR-ATR-спектроскопії для детекції біохімічних і молекулярно-біологічних маркерів патологічних змін у тканинах печінки на мишиних моделях меланоми (B16F10) та гепатоцелюлярної карциноми

(RIL175), а також оцінити можливості методу для контролю та молекулярно-біологічних змін в тканинах печінки при лікуванні.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Опанувати метод створення мишачих моделей онкологічних захворювань (меланоми лінії B16F10 та гепатоцелюлярної карциноми лінії RIL175), включно з культивуванням пухлинних клітин, їх ін'єкційним введенням, утриманням ліній мишей та контролем росту пухлин, а також технікою проведення некропсії.
2. Відпрацювати протокол пробопідготовки тканин печінки та умови реєстрації FTIR-ATR-спектрів.
3. Розробити та оптимізувати алгоритм математичної обробки спектрів та статистичного аналізу з їхньою подальшою програмною реалізацією мовою Python.
4. Провести порівняльний аналіз спектрів тканин печінки дослідних груп з контролем та між собою.
5. Оцінити ефективність FTIR-ATR-спектроскопії виявляти біохімічні та молекулярно-біологічні зміни в тканинах печінки, що виникають за умов моделювання онкологічного процесу та після введення фармакологічних препаратів.
6. Зробити висновки про науково-практичну цінність FTIR-ATR-спектроскопії: обґрунтувати діагностичну інформативність та перспективи застосування у вирішення як фундаментальних питань, так і прикладних проблем фармакологічного скринінгу.

РОЗДІЛ 1

FTIR-ATR-СПЕКТРОСКОПІЯ ЯК ІНСТРУМЕНТ ДОСЛІДЖЕННЯ ПАТОЛОГІЙ У МИШЕЙ

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є у режимі повного внутрішнього відбиття (FTIR-ATR) є аналітичним методом, що забезпечує швидкий, відтворюваний та високопродуктивний аналіз широкого спектра біологічних і небіологічних зразків. Метод ґрунтується на реєстрації спектра поглинання інфрачервоного світла (ІЧ) молекулами досліджуваного зразка в умовах повного внутрішнього відбиття, коли еванесцентна хвиля проникає на незначну глибину в зразок і взаємодіє з його хімічними компонентами.

FTIR-ATR дозволяє здійснювати оптичне дослідження біохімічних змін, що супроводжують патологічні процеси в тканинах, наприклад, для вимірювання характеристик пухлинної тканини та клітин. Це дозволяє точно та чітко визначити функціональні групи, типи зв'язків та конформації молекул [5]. Біохімічні зміни, що виникають при розвитку захворювань, відображаються у зміні інтенсивності та положення смуг поглинання. Суттєвою перевагою FTIR-візуалізації є можливість проведення аналізу без застосування будь-яких міток або барвників. Це усуває ризик хімічного чи фізичного втручання у досліджувану систему та дозволяє оцінювати біохімічний склад тканин без їх додаткової обробки. Спектральні смуги у коливальних спектрах є специфічними для молекул і надають пряму інформацію про біохімічний склад. Створюється інфрачервоний спектр, який є «відбитком пальця» аналізованого зразка.

Інфрачервоне випромінювання є складовою електромагнітного спектра і широко використовується для дослідження структури речовин [6]. ІЧ-спектр можна розділити на 3 піддіапазони: далекий ІЧ $< 400\text{ см}^{-1}$, середній ІЧ $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ і ближній ІЧ $13000\text{--}4000\text{ см}^{-1}$. Зазвичай для аналізу біологічних зразків використовується середній ІЧ-діапазон. Для аналізу біологічного матеріалу методом FTIR спектроскопії наразі використовують три режими

відбору проб: пропускання, трансфлексія та ATR (порушене повне внутрішнє відбиття). Ці три режими дають змогу отримувати спектри досліджуваних зразків. Наприклад: цільна кров [7], плазма [8], сироватка крові [2], сеча [9], слина [10], слюзи [11] та жовч [12]. Як адгезивні клітинні лінії, так і клітини в суспензії (лімфоцити [13], стовбурові клітини [14]). Досліджуються зразки тканин, отримані шляхом біопсії або резекції, свіжозаморожені тканини (кріозрізи), депарафінізовані зрізи або навіть нативні зразки тканин *ex vivo*.

1.1. Фізико-хімічні принципи методу FTIR-ATR-спектроскопії

Фур'є-інфрачервоний спектрометр з модулем ATR складається з джерела інфрачервоного світла, детектора та кристала з високим показником заломлення, такого як алмаз, германій або селенід цинку. Зразок розміщується на кристалі, і на нього спрямовується ІЧ світло. Світло проходить крізь кристал і відбивається на межі кристал-зразок, де воно частково проникає в зразок, створюючи еванесцентну хвилю (Рис. 1.1). Молекули зразка поглинають енергію еванесцентної хвилі на характерних частотах, унаслідок чого змінюється спектральний розподіл інтенсивності відбитого випромінювання [15]. Відбите світло проходить до детектора, що дозволяє отримати спектр FTIR-ATR. Для чистих зразків ідентифікація відбувається шляхом прямого пошуку в бібліотеці, тоді як аналіз сумішей передбачає використання хемометричних методів розділення спектрів на окремі складові.

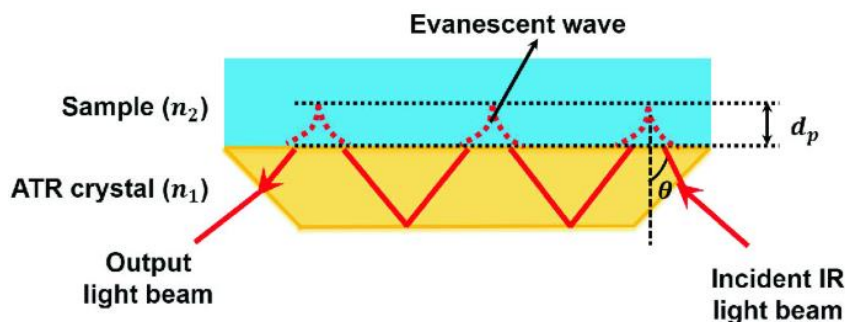


Рис. 1.1. Схематичне зображення принципу роботи FTIR-ATR-спектрометра [16]

ІЧ промінь потрапляє на межу розділу кристал-зразок під кутом, більшим за критичний кут падіння, а потім зазнає повного внутрішнього відбиття внаслідок різниці показників заломлення, оскільки кристал має вищий показник заломлення, ніж зразок [17]. Глибина проникнення еванесцентної хвилі d_p (зазвичай становить від 0,5 до 2,0 мікрон) визначається як відстань від поверхні кристала, на якій напруженість електричного поля зменшується в e разів до рівня e^{-1} від початкового значення, що описується рівнянням (1.1) [18].

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \left(\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right)^{0.5}} \quad (1.1)$$

де d_p – глибина проникнення;

λ – довжина хвилі інфрачервоного випромінювання;

n_1 – показник заломлення кристалу (ATR елементу);

n_2 – показник заломлення зразка;

θ – кут падіння променю.

Для методу FTIR-ATR-спектроскопії показник заломлення кристала n_1 повинен бути більшим за показник заломлення зразка n_2 . Чим більша

різниця між n_1 та n_2 , тим меншою є глибина проникнення, що важливо для отримання чітких спектрів поверхневих шарів. Від співвідношення показників заломлення кристалу та зразка залежить критичний кут падіння – мінімальний кут падіння, за якого відбувається повне внутрішнє відбиття. Вираховується він за наступним рівнянням:

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right) \quad (1.2)$$

де θ_c — критичний кут;

n_2 — показник заломлення зразка;

n_1 — показник заломлення кристала.

Ефективна довжина шляху світла в FTIR-ATR визначає, наскільки довго інфрачервоне випромінювання взаємодіє із зразком під час багаторазового внутрішнього відбиття. Ефективна довжина шляху – d_e – згасаючої хвилі в вимірюванні ATR, тобто еквівалентна довжина шляху в вимірюванні пропускання, яка призвела б до смуги поглинання однакової інтенсивності є більш точною метрикою, ніж d_p [19].

Кількість відбиттів на кожній поверхні кристала зазвичай становить від п'яти до десяти, залежно від кута падіння, довжини та товщини кристала. До поширених матеріалів для виготовлення кристалів ATR належать алмаз, селенід цинку, кремній і германій. Незважаючи на високу вартість, алмаз є чудовим матеріалом для ATR завдяки своїй міцності. Він стійкий до високих температур, контакту з корозійними речовинами (як з високим, так і з низьким рН) та контакту з абразивними зразками. Окрім вартості, єдиним іншим недоліком є властива їм поглинання інфрачервоного випромінювання в діапазоні приблизно $2700\text{--}1800\text{ см}^{-1}$. Хоча в цій області спектра шум є більшим, це насправді є лише незначним недоліком, оскільки поглинання алмазом є частиною фону і, отже, віднімається від спектра зразка. Більше

того, в цьому діапазоні хвильових чисел є лише кілька важливих піків зразка. Якщо міцність не є важливою, то найкращим вибором для максимізації пропускну здатності інфрачервоної енергії є селенід цинку. Цей матеріал доступний у вигляді кристалів з одним відбиттям, а також кристалів з декількома відбиттями, які підвищують чутливість детекції. Кремній і германій мають проміжні властивості (включаючи вартість і передачу енергії) для окремих застосувань [19].

Під час вимірювання речовин надзвичайно важливо забезпечити хороший контакт між зразком і кристалом. Наявність повітря між кристалом і зразком, або нерівності поверхні значно послаблюють спектральний сигнал. Це особливо актуально для біологічних тканин, що мають неоднорідну структуру та різну жорсткість. Для цього зразок притискають до поверхні кристала або використовують тонкі зрізи тканини. Нещільний контакт може призвести до появи шумів та артефактів у спектрі, які ускладнюють подальшу інтерпретацію даних [4].

Таким чином, кінцевий вигляд FTIR-ATR-спектра формується під впливом низки експериментальних факторів, зокрема показників заломлення ATR-кристала і зразка, кута падіння та довжини хвилі ІЧ-променя, критичного кута, глибини проникнення, ефективної довжини шляху, кількості відбиттів, якості контакту зразка з ATR-кристалом та характеристики ATR-кристала [20].

Взаємодія цих факторів визначає інтенсивність, форму та відтворюваність спектральних смуг, а також чутливість методу до приповерхневих шарів зразка.

1.2. FTIR-ATR-спектроскопія біологічних макромолекул

На молекулярному рівні метод FTIR-ATR детектує коливання зв'язків у функціональних групах молекул, присутніх у досліджуваному зразку, що дозволяє оцінювати відносний їх вміст та структуру.

У середній області ІЧ-діапазону можна спостерігати коливання хімічних груп, присутніх у ліпідах, білках, вуглеводах і нуклеїнових кислотах. Діапазон $4000\text{--}2000\text{ см}^{-1}$ надає інформацію про хімічні групи O--H , C--H , N--H і =C--H , C=C і C--N , присутні головним чином у ліпідах і білках. Проміжна область між $2000\text{--}1800\text{ см}^{-1}$ не містить цінної інформації для дослідження біологічних зразків, оскільки в цій області мало хімічних груп. Ділянка між $1800\text{--}900\text{ см}^{-1}$ є так званою ділянкою «відбитків пальців» і має коливання всіх сполук, які можуть характеризувати даний зразок [21]. Цю ділянку можна умовно розділити на три підділянки: $1800\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ є ділянкою подвійних зв'язків, що відноситься до коливань C=O та C=C , які містяться переважно в жирних кислотах; $1700\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ – це область амідів білків (амід I і амід II). Область між $1500\text{--}900\text{ см}^{-1}$ є змішаною областю, що характеризується розтягувальними коливаннями груп COO-- , P--O і COOC , а також згинанням C--H вуглеводів, нуклеїнових кислот, а також деяких ліпідних і білкових структур [22].

Смуга амиду I є інформативною для аналізу вторинної структури білків, оскільки зумовлена переважно валентними коливаннями зв'язку C=O пептидної групи. Її максимум зазвичай спостерігається поблизу 1650 см^{-1} , хоча точне положення може змінюватися залежно від типу вторинної структури (α -спіраль, β -шари тощо). Вклад у формування цієї смуги також мають слабо виражені коливання C--N та деформаційні коливання N--H [23].

Точне положення смуги амиду I визначається водневим зв'язком, а також конформацією білкового ланцюга [24]. Смуга амиду II також є інформативною для визначення вторинних структурних змін у білках, оскільки відображає відмінності між її елементами, зокрема невпорядковані ділянки та агреговані

β -структури. Смука амиду II, формується переважно деформаційними коливаннями N–H у площині та валентними коливаннями C–N, зазвичай поглинає при 1550 см^{-1} . Амід III локалізується в діапазоні $1300\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ і виникає в результаті поєднання деформаційних коливань N–H і C=O в площині та розтягувальних коливань C=C [25]. Хоча смуга амиду III виявляє чутливість до вторинної структури поліпептидного ланцюга і використовується в дослідженнях структури білків і пептидів, на її положення істотно впливають бічні ланцюги амінокислот, і тому її спектральні характеристики змінюється залежно від амінокислотного складу білка. Амід IV та амід VII з'являються на нижчих частотах $750\text{--}200\text{ см}^{-1}$ і рідше використовуються в дослідженнях структури білків через їх низьку інтенсивність і помірну чутливість до структури білка. [26]. FTIR-ATR дозволяє відслідковувати конформаційні зміни білків під впливом зовнішніх факторів, таких як температура, окисдаційний стрес або патологічні процеси, що робить метод перспективним для біомедичних досліджень [27]. Проте слід пам'ятати, що предметом дослідження є тканини, а отже ці зміни є характеристиками протеому, а не конкретних білків.

FTIR-ATR дозволяє ідентифікувати та напівкількісно визначати різні класи та підтипи ліпідів у клітинних зразках. Зазвичай використовують дві області метильні та метиленові групи [28]. Зокрема, спектри FTIR-ATR для ліпідів клітинних мембран характеризуються двома основними областями: $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$, які відповідають валентним коливанням C–H у метиленових $\text{--CH}_2\text{--}$ та метильних --CH_3 групах жирних кислот. Співвідношення інтенсивностей цих смуг дозволяє оцінювати довжину та впорядкованість ліпідних ланцюгів. Смука $\sim 1740\text{ см}^{-1}$ відповідає валентним коливанням карбонільної групи (C=O) естерів жирних кислот і є показником стану фосфоліпідів та тригліцеридів. Деформаційні коливання C–H у діапазоні $1500\text{--}1300\text{ см}^{-1}$ також використовуються для характеристики ліпідного складу та ступеня насиченості жирних кислот [29]. Смуки розтягування C–H, пов'язані з ділянкою ліпідного вуглеводневого ланцюга, не зазнають

суттєвого впливу інших коливальних мод, навіть якщо розглядати складні зразки, такі як біологічні системи [30]. Різні ліпіди можна ідентифікувати, враховуючи спектральний діапазон, пов'язаний з полярною частиною молекул ліпідів. Добре відомо, що кожен ліпід має особливий FTIR спектр в області, що характеризується хвильовими числами нижче 1800 см^{-1} . Ця особливість використовувалася різними авторами для ідентифікації різних компонентів у ліпідних сумішах [31]. Окиснювальні ушкодження мембран супроводжуються змінами інтенсивності та положення смуг C–H і C=O, що дозволяє використовувати ліпідні спектральні ознаки як маркери окиснювального стресу та метаболічних порушень.

FTIR-ATR виявилася корисною технікою для вивчення різних аспектів структури нуклеїнових кислот. Як в РНК, так і в ДНК, в спектрі переважають сигнали від цукрово-фосфатного ланцюга та азотистих основ. Сигнали від нього надають інформацію про конформацію нуклеїнової кислоти, включаючи спіральне скручування та вигин [32]. Сигнали від основ чутливі до водневих зв'язків та взаємодій між основами, а отже, і до змін у загальній вторинній та третинній структурі. Крім того, оскільки FTIR-ATR може надавати інформацію як про нуклеотидні основи, так і про цукрово-фосфатний каркас нуклеїнової кислоти, він дозволяє проводити комплексний аналіз всієї макромолекули [33].

Основні вібрації в областях спектра коливаються від $1800\text{--}700\text{ см}^{-1}$, і виділяються чотири чітко виражені області: від $1800\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ – смуги поглинання, викликані розтягувальними вібраціями подвійних зв'язків у площинах основ; смуги від $1500\text{--}1250\text{ см}^{-1}$ через основи-цукри, які особливо сильно залежать від глікозидного кута скручування; від $1250\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ через високе поглинання фосфатних груп і цукру; та смуги менше 1000 см^{-1} через коливання фосфодіестерного ланцюга в поєднанні з коливаннями цукру [34].

Порівняння FTIR-спектрів може бути використано для аналізу ефектів мутацій або для вивчення впливу модифікацій ДНК, таких як метилування, на спектральний відбиток ДНК, що дозволяє зрозуміти роль цих модифікацій

в епігенетичній регуляції. FTIR також дозволяє аналізувати вплив білків на структуру ДНК/РНК [35].

У зневодненому стані деякі смуги ДНК-маркерів важче виявити та інтерпретувати через розширення смуг та втрату інтенсивності, тоді як у гідратованому стані ці смуги легше спостерігаються. Цей результат має далекосяжні наслідки для діагностики раку за допомогою FTIR-ATR [15], де виявлення відносної концентрації ДНК є важливим маркером дисплазії та неоплазії.

FTIR-ATR в діапазоні хвиль $960\text{--}1130\text{ см}^{-1}$ вважаються «відбитковою» областю для вуглеводів, що дозволяє ідентифікувати основні хімічні групи в полісахаридах, оскільки положення та інтенсивність смуг є специфічними для кожного полісахариду [36]. Це призводить до появи відносно сильніших смуг порівняно з білками та особливо ліпідами, які поглинають на коротших довжинах хвиль (вищих хвильових числах, відповідно, 1660 та 1740 см^{-1}). Крім того, область у спектрі FTIR-ATR що відповідає вуглеводам, є дуже складною, адже складається з великої кількості перекриваючих смуг, деякі з яких мають внески від функціональних груп інших молекул (наприклад, розтягнення груп PO_2 та Si-O) [37].

1.3. Математична обробка та статистичний аналіз спектрів

Спочатку відбувається попередня обробка спектрів. В основному, даний крок спрямований на усунення апаратних артефактів, підвищення надійності та точності подальших багатовимірних аналізів і поліпшення інтерпретованості даних шляхом виправлення проблем, пов'язаних із отриманням спектральних даних [38]. У випадку FTIR-ATR-спектроскопії необхідність попередньої обробки є особливо важливою, оскільки інтенсивність смуг поглинання визначається не лише концентрацією речовини, а й глибиною проникнення еванесцентної хвилі, притиском зразка

до ATR-кристала та мікронерівностями поверхні біологічної тканини. Через це спектри біологічних зразків можуть відрізнятися навіть при однаковому хімічному складі [39].

Методи попередньої обробки можна розділити на шумозаглушення, спектральну корекцію, нормалізацію та інші маніпуляції; часто поєднують два або три методи (наприклад, шумозаглушення, а потім спектральну корекцію та нормалізацію). Вибір методів попередньої обробки може залежати від мети аналізу, фізичного стану зразка, а також від доступного часу та обчислювальної потужності. У випадку біологічних тканин використовують таку послідовність: видалення фонового спектру, згладжування, корекція базової лінії, нормалізація [40].

У FTIR-ATR спектроскопії фоновий спектр – це спектр, записаний без зразка, коли ІЧ-промінь проходить через оптичну систему і відбивається від чистого кристала ATR. Він фіксує внесок усіх компонентів, що не належать до зразка: характеристики джерела випромінювання, світлоділника, детектора, а також поглинання атмосферних газів. Видаляється автоматично програмним забезпеченням приладу.

Згладжування за Савіцьким-Голєєм застосовується для підвищення якості спектра шляхом усунення випадкового шуму. Метод базується на локальній поліноміальній апроксимації спектральних точок і дозволяє зменшити шум детектора, зберігаючи положення та форму смуг поглинання [41].

Корекція базової лінії є необхідним методом обробки в ІЧ-спектроскопії, який є корисним для подальшого якісного або кількісного аналізу. Базова лінія може зміщуватися через поглинання води, температурні коливання приладу, а також через неповний контакт зразка з ATR-кристалом. У біологічних тканинах особливо значним є внесок води, смуга поглинання якої перекриває область амідів білків $\sim 1640\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ [42].

Дуже важливо нормалізувати ІЧ-спектри, щоб врахувати такі фактори, що можуть спричинити плутанину, як зміна товщини зразка. Поширеними методами нормалізації є нормалізація піку амідів I/II та векторна нормалізація.

Нормалізація аміду I/II часто використовується після корекції базової лінії, тоді як векторна нормалізація – після диференціації спектрів (після корекції диференціацією у спектрах більше немає постійного піку аміду I/II, що дозволяє нормалізувати пік аміду I/II). Смука аміду I $\sim 1650 \text{ см}^{-1}$ використовується як внутрішній стандарт, оскільки білки присутні практично в усіх клітинах і їх концентрація змінюється повільніше, ніж концентрація інших біомолекул [43]. Ненормалізовані спектри для хімічної візуалізації або неконтрольованого кластеризації дозволяють виявити структури тканин, в першу чергу на основі інтенсивності поглинання, тоді як нормалізовані підкреслюють відмінності в біохімічній структурі.

Іншими, широко використовуваними методами попередньої обробки спектрів є мультиплікативна корекція та розрахунок стандартної нормальної варіації. Мультиплікативна корекція розсіювання спрямована на ефективне усунення впливу розсіювання та поліпшення спектральної інформації для отримання відносно ідеального спектра [44]. Розсіювання в тканинах зумовлене клітинними мембранами, ядрами та мітохондріями, які мають розміри, співставні з довжиною хвилі ІЧ-випромінювання, тому інтенсивність спектра може змінюватися незалежно від реального хімічного складу [45]. Стандартна нормальна варіація використовується для зменшення зміщення або нахилу базової лінії через розсіювання та зміну відстані світла [46]. Вона віднімає середню інтенсивність від спектральної інтенсивності для досягнення корекції зміщення, а потім ділить стандартне відхилення, щоб зменшити мультиплікативний ефект [47]. Таким чином стандартна нормальна варіація забезпечує можливість порівняння спектрів, отриманих від різних ділянок тканини або різних біологічних зразків.

Аналіз головних компонентів (Principal Component Analysis, PCA) є однією з найбільш широко використовуваних методів багатовимірного аналізу. Мета PCA полягає у скороченні даних до декількох характерних вимірів для візуалізації та аналізу [48]. Це досягається шляхом обчислення нового набору змінних, або головних компонентів, кожен з яких є лінійною

комбінацією вихідних змінних. Головні компоненти вибираються таким чином, щоб важлива інформація в даних зберігалася лише в декількох з цих нових змінних, ефективно узагальнюючи зразки або спостереження. У випадку FTIR-ATR-спектроскопії змінними виступають значення спектральні характеристики піків, тому один спектр може містити тисячі параметрів [49]. Після PCA зазвичай застосовують контрольовані методи класифікації які дозволяють віднести невідомий спектр до групи «норма» або «патологія». Для перевірки надійності моделі проводять перехресну валідацію, визначаючи чутливість, специфічність і загальну точність класифікації.

Дискримінантний аналіз методом часткових найменших квадратів (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) – це метод лінійної контрольованої класифікації, що поєднує регресію з частковими найменшими квадратами (Partial Least Squares, PLS) з лінійним дискримінантним аналізом (Linear discriminant analysis, LDA). Він може знаходити змінні та напрямки з багатовимірного простору для розрізнення категорій у калібрувальному наборі [50]. Метою методів зменшення розмірності, таких як PCA та PLS-DA, є досягнення лінійного перетворення, яке перетворює дані в простір меншої розмірності з якомога меншою похибкою [51].

Для одновимірної статистики зазвичай обчислюють кількість стандартних відхилень спостереження від центру набору даних і використовують це значення для визначення різних статистичних властивостей. Поширюючи це значення на багатовимірну ситуацію, П. Ч. Махаланобіс запропонував метрику відстані Δ (або D_M) від центру даних. Для кількох змінних відстань Махаланобіса можна візуалізувати як відстань від точки до центру набору даних у вигляді еліпсоїда, основний напрямок якого відповідає напрямку найбільшої дисперсії [52].

На відміну від класичної евклідової відстані, яка вимірює звичайну геометричну відстань між двома точками у просторі, відстань Махаланобіса враховує кореляцію між змінними. Математично квадрат відстані Махаланобіса між вектором спектроскопічного спостереження x та вектором

середніх значень класу μ обчислюється з використанням оберненої коваріаційної матриці S^{-1} [53]. Саме наявність коваріаційної матриці дозволяє алгоритму "розуміти" форму хмари даних. У контексті аналізу FTIR-спектрів біологічних тканин це має критичне значення. Спектроскопічні дані є високо мультиколінеарними (наприклад, інтенсивності поглинання на сусідніх хвильових числах в межах смуги Амід І сильно залежать одна від одної). Евклідова відстань сприймала б ці точки як незалежні, штучно збільшуючи загальну відстань. Натомість відстань Махаланобіса нівелює цю надлишковість. На практиці, під час багатовимірного аналізу спектрів (наприклад, у просторі балів PCA або PLS-DA), ця метрика використовується для двох головних цілей. Для виявлення зразків, які мають аномально велику відстань від центроїда групи через експериментальні помилки (наприклад, неякісний контакт тканини з ATR-кристалом). А для класифікації: невідомий спектр об'єктивно відноситься до тієї експериментальної групи, до центру якої його відстань Махаланобіса є статистично найменшою [51].

1.4. Біологічні моделі патологій

Завдяки філогенетичній спорідненості та фізіологічній схожості з людиною, простоті утримання та розведення в лабораторних умовах, а також наявності численних інбредних ліній, домашні миші (*Mus musculus*) вже давно використовуються як моделі для вивчення біології та захворювань людини [54]. Геномні дослідження виявили вражаючу генетичну подібність між цими двома видами [55]. Ці дослідження, разом із розробкою методів створення трансгенних мишей, мишей із нокаутними та нокаутними генами, надали додатковий імпульс і потужні інструменти для досліджень на мишах [56], а також призвели до різкого зростання використання мишей як модельних організмів. Дослідження на мишах зробили неоціненний внесок у наше розуміння біології людини. Для вивчення канцерогенезу

використовують різні моделі мишей, найчастіше саме сингенні моделі. Вони передбачають трансплантацію іморталізованих культур мишачих пухлинних клітин імунокомпетентним тваринам тієї ж інбредної генетичної лінії. Дані моделі створюються за допомогою процедури трансплантації або ін'єкції, під час якої клітини, тканини або органи однієї миші пересаджуються іншій. Оскільки донор і реципієнт є генетично ідентичними, сингенна трансплантація не викликає імунного відторгнення трансплантата та не потребує використання жодних імуносупресивних препаратів. Це дозволяє пухлині рости у природному мікрооточенні та активно взаємодіяти з Т-лімфоцитами, макрофагами й іншими імунними клітинами господаря.

Ксенотрансплантанти передбачають пряме перенесення зразків пухлини мишам з імунодефіцитом після хірургічної резекції або інших медичних операцій. Експресія генів у пухлинах може підтримуватися послідовними пасажами пухлин від миші до миші [57]. Пухлини імплантують у вигляді шматочків або суспензій клітин або окремо, або в деяких дослідженнях, покривають матрицею «Matrigel» або змішують з фібробластами людини чи мезенхімальними стовбуровими клітинами [58]. Найпоширенішим варіантом є ектопічна дорсальна імплантація – введення пухлинних клітин у місце, нетипове для даного типу пухлини (наприклад, підшкірна ін'єкція клітин меланоми у бік або спину). Водночас застосовують і ортотопічну імплантацію, за якої клітини вводять безпосередньо в орган походження пухлини – підшлункову залозу, ротову порожнину, яєчник, молочну залозу, жирову подушечку або мозок [59].

Використання мишей як модельних організмів дає змогу проводити їх генетичну модифікацію: вносити мутації, асоційовані з певним типом раку, і таким чином створювати моделі, що достовірно відтворюють гістопатологічні, молекулярні та клінічні особливості пухлин людини [56]. Двостадійні дослідження канцерогенезу шкіри з використанням генетично модифікованих моделей можуть виявити роль потенційних генів-модифікаторів ризику раку, протоонкогенів та генів-супресорів канцерогенезу [60].

Клітини мишачої меланоми B16F10 широко використовуються як модель для вивчення меланогенезу та депігментуючих агентів, оскільки вони мають більшість спільних механізмів меланогенезу з нормальними меланоцитами людини [61]. Меланома B16F10 характеризується низьким рівнем експресії МНС класу I [62], є високоагресивною, слабо імуногенною пухлиною, яка є стійкою до більшості імунотерапій [63]. Пухлини меланоми B16 демонструють підвищений рівень гліколізу, що призводить до створення кислого пухлинного мікрооточення, яке метаболічно обмежує ефекторні функції Т-клітин та сприяє уникненню імунної відповіді [64].

Клітинну лінію мишачої гепатоцелюлярної карциноми RIL-175 було виділено з пухлин печінки, створених у мишей C57BL/6 шляхом перенесення фетальних гепатобластів $p53^{-/-}$, трансдукованих HRasv¹² [65].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обладнання: сэмплери (Thermo Fisher Scientific, США), одноразові наконечники, мікропробірки типу Eppendorf (1,5 мл), біологічні пробірки (5 мл), пробірки типу Falcon (15 та 50 мл), шприци інсулінові, культуральні флакони, камера Горяєва та покривні скельця, гемоцитометр Bio-Rad TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories, США), мініцентрифуга-вортекс «Мікроспін» FV-2400 (Biosan, Латвія), центрифуга (ELMI CM-6M), центрифуга (Eppendorf 5424, Німеччина), магнітна мішалка з підігрівом MS400 (Bante), шейкер, термостат, CO₂-інкубатор CCL-170B-8 (ESCO, Сінгапур), ламінарна шафа, витяжна шафа, мікроскоп, FTIR спектрометр Nicolet iS50 з модулем ATR та NIR Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific, США).

Реактиви: Середовище DMEM (4,5 г/л глюкози), FBS (фетальна бича сироватка) 10 %, пеніцилін 100 ОД/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, трипсин-ЕДТА 0,05 % розчин, безсироваткове DMEM, Matrigel, трипановий синій (для тесту на виключення / оцінки життєздатності), PBS (фосфатно-сольовий буфер), DMSO (диметилсульфоксид), Kolliphor HS 15 (Колліфор HS 15), вода для ін'єкцій, атезолізумаб, ніволумаб, SG-094, «Сполука 1» та «Сполука 2» (комерційна таємниця), 2,2,2-трибромметанол 2,5 % розчин, етанол (70 %, 80 %, 90 %).

2.1. Тварини та умови утримання

У дослідженні використовували самок мишей лінії C57Bl/6J віком 11 тижнів. Тварин утримували в стандартних умовах віварію та при вільному доступі до корму.

2.2. Досліджувані групи

До контрольної групи увійшли 19 самок мишей, лінії C57Bl/6J, віком 11 тижнів.

Для моделювання меланоми було використано 21 самку мишей лінії C57Bl/6J, віком 11 тижнів, яким підшкірно вводили клітини лінії B16F10. Тварин розділили на три групи:

- Група 1 (Контроль) ($n = 7$);
- Група 2 («Сполука 1») ($n = 8$);
- Група 3 («Сполука 2») ($n = 6$).

Речовини вводили внутрішньочеревно через день протягом трьох тижнів у дозуванні 1 мг/кг. Кожен наступний день після введення препаратів візуально оцінювали стан тварин та зважували їх.

Для моделювання гепатокарциноми було використано 60 самок лінії мишей C57Bl/6J, яким вводили підшкірно клітини лінії RIL175. Тварин розділили на шість групи:

- Група 1 (Контроль) ($n = 10$);
- Група 2 (Ніволумаб + SG-094) ($n = 10$);
- Група 3 (Атезоліумаб + SG-094) ($n = 10$);
- Група 4 (SG-094) ($n = 10$);
- Група 5 (Атезоліумаб + Ніволумаб) ($n = 10$);
- Група 6 (Атезоліумаб + Ніволумаб + SG-094) ($n = 10$).

2.3. Створення моделей з пухлинами

Клітини B16F10 та RIL175 культивували в середовищі DMEM (4,5 г/л глюкози) з 10 % FBS, 100 ОД/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину при температурі 37 °C і концентрацією CO₂ 5 %. Клітини збирали за допомогою 0,05 % розчину трипсину-ЕДТА, центрифугували та суспендували в

безсироватковому DMEM. Кількість клітин та їх життєздатність оцінювали за допомогою гемоцитометра та тесту на виключення трипанового синього. Кінцеві суспензії клітин B16F10 у концентрації $1 \times 10^5/100$ мкл у суміші DMEM та Matrigel (3:1) зберігали на льоду перед ін'єкцією. Суспензію клітин B16F10 (1×10^5) в об'ємі 100 мкл підшкірно вводили у верхню частину стегна кожної миші. Середній об'єм пухлини на перший день лікування становив $99,08 \text{ мм}^3$ ($SD = 11,71 \text{ мм}^3$; $CV = 11,82 \%$). Кінцеві суспензії клітин RIL175 у концентрації $2 \times 10^6/100$ мкл у суміші PBS та Matrigel (3:1) зберігали на льоду перед ін'єкцією. Суспензію RIL175 (2×10^6) в об'ємі 100 мкл підшкірно вводили в бокову ділянку кожної тварини. На перший день лікування пухлинні вузли мали середній об'єм $148,41 \text{ мм}^3$ ($SD = 29,99 \text{ мм}^3$, $CV = 15,49 \%$).

2.4. Оцінка росту пухлин

Розміри пухлини вимірювали за допомогою цифрового штангенциркуля через добу, фіксуючи два перпендикулярні діаметри пухлини. Формула розрахунку (2.4):

$$V = \frac{W^2 \times L}{0.5} \quad (2.4)$$

де V – об'єм пухлини (мм^3)

W^2 – ширина пухлини (менший діаметр, мм)

L – довжина пухлини (більший діаметр, мм)

Мишей з пухлинами, які не відповідали параметру об'єму пухлини, було виключено з дослідження.

2.5. Введення препаратів

Досліджувані речовини вводили внутрішньочеревно через день протягом 21 доби. Лікування розпочинали на другий день після інокуляції.

Групам з моделлю меланоми (B10F16) усі препарати («Сполука 1» та «Сполука 2») застосовували у дозі 1 мг/кг. Групам з моделлю гепатоцелюлярної карциноми (RIL175) речовини вводили у дозуванні: Атезоліумаб – 10 мг/кг, Ніволумаб – 10 мг/кг, SG-094 – 90 нмоль/кг.

Речовини «Сполука 1» та «Сполука 2» – DMSO – Колліфор HS 15 – WFI (5 %:20 %:75 %; v:v:v). Атезоліумаб та Ніволумаб розчиняли в PBS. SG-094 – в суміші DMSO : Kolliphor HS15 : PBS (5% : 10% : 85%; v:v:v).

2.6. Оцінка стану тварин

Наступної доби після кожної ін'єкції проводили візуальну оцінку загального фізіологічного стану мишей (рухова активність, стан шерстного покриву) та вимірювання маси тіла для контролю динаміки ваги та оцінки можливого токсичного впливу препаратів.

2.7. Некропсія та забір органів і крові

Тварин виводили з експерименту шляхом евтаназії – методом цервікальної дислокації після інтраперитонеального введення 2,5 % розчину 2,2,2-тримбромметанолу в дозі 400 мг/кг з початком наркотичного сну. Після чого відбирали печінку.

2.8. Підготовка зразків та реєстрація спектрів FTIR-ATR

Для підготовки до FTIR-ATR-аналізу відібрані після некропсії органи одразу піддавали послідовній дегідратації: 70% етанол (24 год), 80% етанол (24 год) та 90% етанол (24 год). Після цього зразки висушували на предметному склі протягом двох діб.

Зразки наносились безпосередньо на кристал ATR. FTIR-спектри реєструвались в діапазоні $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$. Кожен орган вимірювали тричі. Перед реєстрацією спектрів записували фоновий спектр для усунення впливу водяної пари, CO_2 , температурного дрейфу та інших чинників навколишнього середовища.

2.9. Математична обробка спектрів

Перед введенням спектрів у статистичний аналіз було проведено їх попередню підготовку, що включала чотири послідовні процедури, не враховуючи віднімання фонового спектра (що здійснювалося автоматично приладом): (1) згладжування фільтром Савицького – Голя (вікно 11, поліном 3) на повному спектрі; (2) обрізка повних спектрів до $900\text{--}1720\text{ см}^{-1}$; (3) корекція базової лінії (метод «гумової стрічки» rubber band) на обрізаному спектрі; (4) нормалізація за глобальним максимумом обрізаного спектра. Згладжування на повному спектрі виключає крайові артефакти фільтра. Корекція базової лінії на обрізаній ділянці забезпечує обнулення на краях робочого вікна $900\text{ і }1720\text{ см}^{-1}$ і коректне збереження інтенсивності піків в області $900\text{--}1000\text{ см}^{-1}$.

Пошук спільних піків здійснювався на основі другої похідної за допомогою методу Савицького – Голя (вікно 11, поліном 2), що нормалізувався за L2-нормою, після чого визначалися мінімуми. Пік

вважався загальним, якщо він виявлявся не менше ніж у 25% спектрів пари груп порівняння. Близькі піки ($< 5 \text{ cm}^{-1}$) об'єднувалися.

Кожен спектр апроксимовано сумою функцій псевдо-Войта (лінійна комбінація гаусіана та лоренціана з вагою η). Для кожного піку визначено 5 параметрів: висота (height), ширина на піввисоті (FWHM), площа (area), абсолютна площа (area abs.) та коефіцієнт змішування (η).

2.10. Статистичний аналіз

Розміри пухлин описували за допомогою середнього арифметичного, стандартного відхилення та коефіцієнта варіації.

Було проведено порівняльний аналіз усіх виявлених піків за повним набором спектральних характеристик. Нормальність перевіряли за критерієм Шاپіро – Уїлка. При нормальному розподілі застосовували t -критерій Стюдента або Уелча залежно від рівності дисперсій, яка оцінювалась за F -критерієм Фішера. При вільному розподілі – критерій Манна – Уїтні. Ефект розмірності оцінювали за Коеном (d) або rank-biserial (r_b). Для всіх було проведено точково-бісеріальний кореляційний аналіз (r_p). FDR (False Discovery Rate) частота помилкових виявлень. Багаторазові порівняння коригували методом Бенджаміні – Хохберга.

Статистичний аналіз виконано мовою Python (версія 3.10) з використанням бібліотек: NumPy, pandas, SciPy, scikit-learn, statsmodels, matplotlib, boxsers.

2.11. Біоетичні аспекти

Усі дослідження на лабораторних тваринах були погоджені комітетом з біоетики ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

(протокол №3 від 23 лютого 2026 р.). Роботи з експериментальними тваринами Запланований дизайн експериментів та методики виконання досліджень не суперечать морально-етичним нормам і відповідають правилам належної лабораторної практики (GLP), рекомендованої ВООЗ, вимогам Європейської Конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою метою (Страсбург, 1986), Директиви ЄС 2010/63/EU, статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р., «Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах», затвердженому Наказом Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України № 249 від 21.03.2012 р., «Загальним етичним принципам експериментів на тваринах», схваленим V Національним конгресом по біоетиці (Київ, 2013).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Після отримання масиву спектральних даних, було проведено первинну оцінку вихідних спектрів. На рис. (3.1) представлено необроблені FTIR-ATR-спектри тканин печінки мишей усіх трьох груп після усереднення повторних вимірів у повному діапазоні хвильових чисел. Незважаючи на наявність індивідуальної варіабельності, спектри демонструють спільний характерний профіль із вираженими смугами поглинання у ділянках амідів I ($\sim 1638\text{--}1652\text{ cm}^{-1}$), амідів II ($\sim 1540\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$), деформаційних коливань CH_2/CH_3 -груп ліпідів ($\sim 1443\text{--}1469\text{ cm}^{-1}$) та коливань цукрово-фосфатного ланцюга нуклеїнових кислот ($\sim 916\text{--}1054\text{ cm}^{-1}$), що відповідає типовому спектральному відбитку тканин органів.

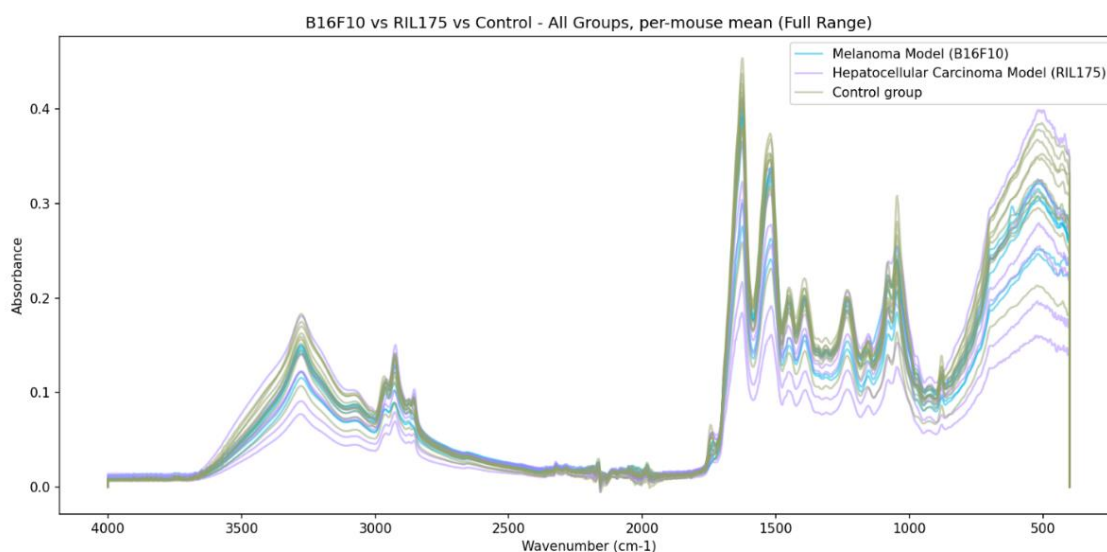


Рис. 3.1. Вихідні FTIR-ATR-спектри трьох груп у повному діапазоні після усереднення

На рис. (3.2) – усереднені по мишах спектри у діапазоні ($900\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$) після математичної обробки.

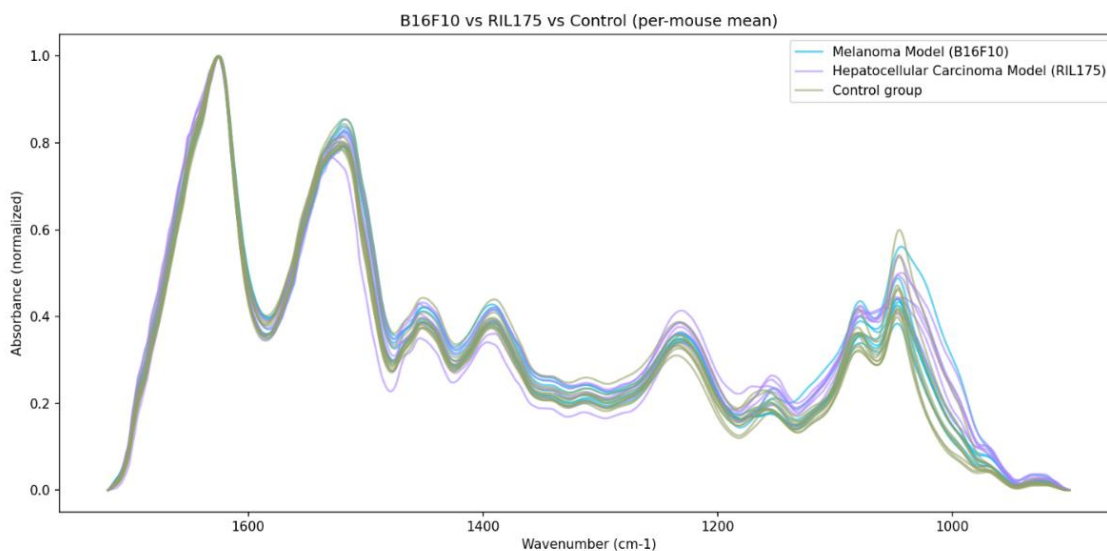


Рис. 3.2. Усереднені нормалізовані спектри ($900\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$) після математичної обробки

3.1. Порівняння спектрів печінки моделі меланоми та контрольної групи

Для кожної пари груп проводили пошук консенсусних піків методом голосування за другою похідною. Для пулу усереднених спектрів кожної пари обчислювали нормовану другу похідну (методом Савіцького – Голя), і за наявністю піку в конкретній точці спектру нараховувався «голос». Пік вважався консенсусним, якщо набрав щонайменше 35 % голосів від загальної кількості спектрів у пулі. Близькі піки ($\leq 5\text{ cm}^{-1}$) об'єднувалися шляхом усереднення положень.

Для пари B16F10/Контроль (пул $n = 17$) виявлено 56 консенсусних піків. Рис. (3.1.1; 3.1.2) відображають результати голосування та порівняння спектрів для цієї пари.

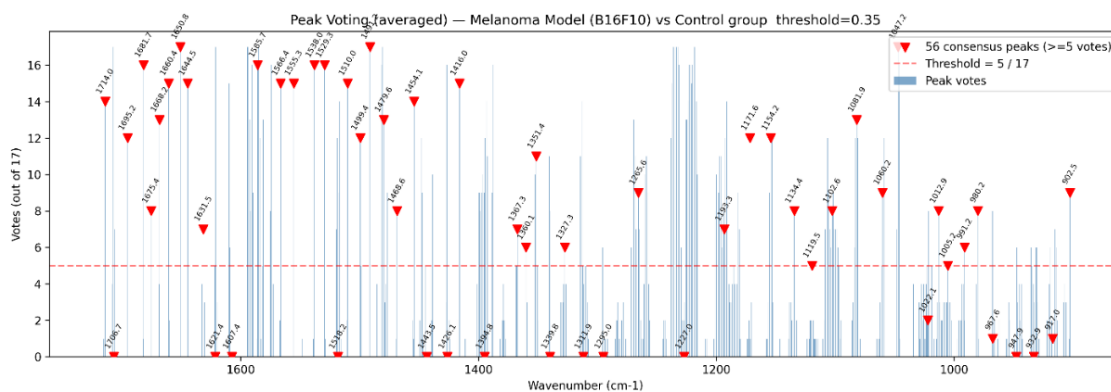


Рис. 3.1.1. Гістограма голосів: групи B16F10 та контрольна група. Консенсусних піків – 56

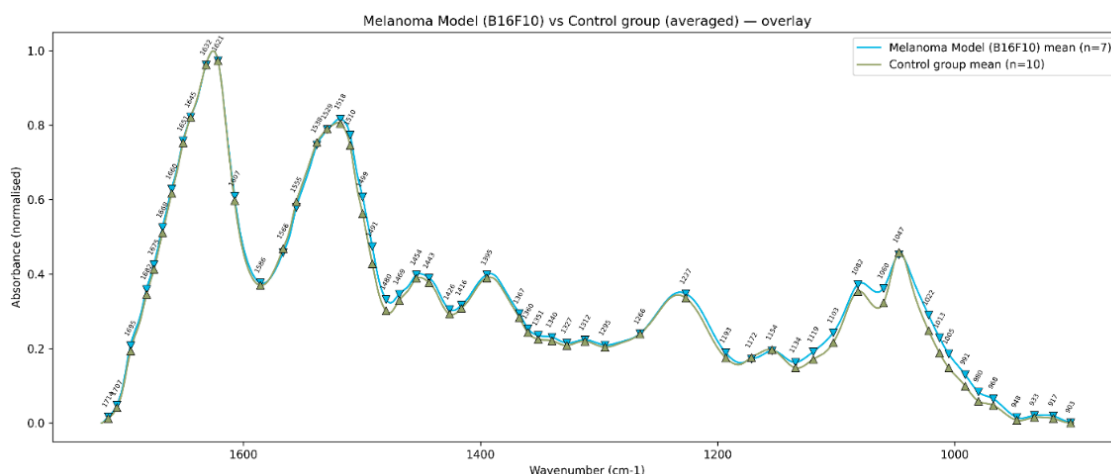


Рис. 3.1.2. Середні спектри групи B16F10 та контрольна група з відміченими консенсусними піками

Кожен усереднений спектр апроксимували лінійною суперпозицією функцій псевдо-Фойгта, по одній компоненті на кожен спільний пік. Початкові параметри отримували з апроксимації середнього спектра пулу. Якість апроксимації для пари порівняння становила $R^2_{\text{середнє}} = 0,999999$.

Такий рівень якості підгонки підтверджує коректність набору консенсусних піків та адекватність моделі псевдо-Фойгта для опису FTIR-ATR-спектрів біологічних тканин.

На рис. (3.1.3) показано апроксимацію середніх спектрів пулу для кожної пари. Верхні панелі демонструють вихідний спектр (синя лінія), суперпозиція

(червона лінія) та окремі псевдо-Фойгт компоненти (пунктирні лінії). Нижні панелі відображають залишки.

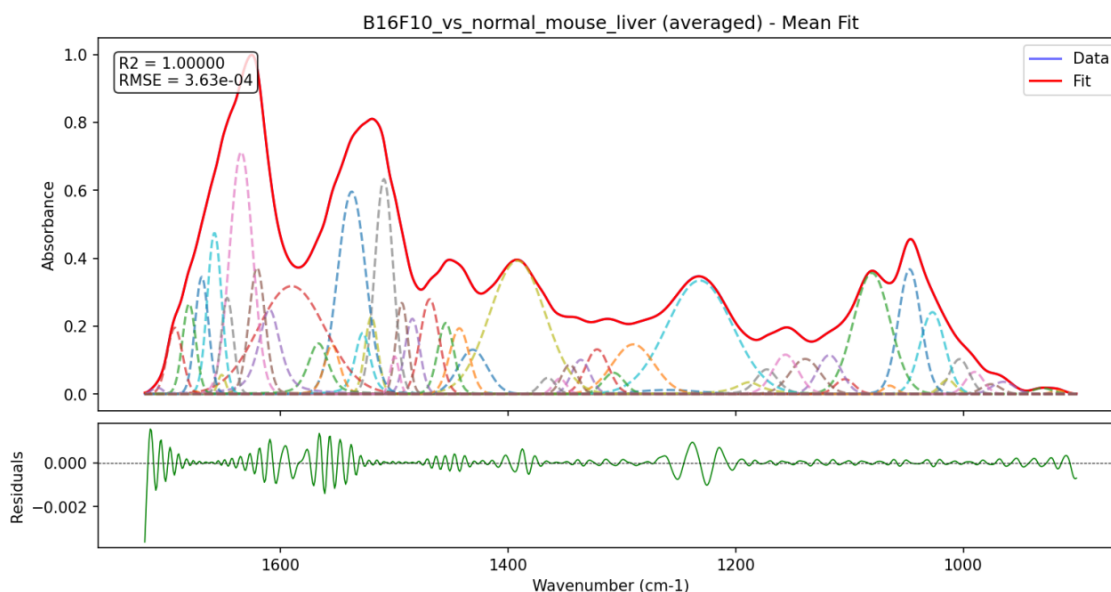


Рис. 3.1.3 Апроксимація середнього спектра пулу групи B16F10 та контрольної групи (56 компонент, $R^2 = 1,000000$)

При порівнянні групи з пухлинною лінією B16F10 та контролем жоден пік, після застосування FDR-корекції, не досяг рівня статистичної значущості ($BH\ p < 0,05$) (рис. 3.1.4). Вихідні p -значення вказують на окремі тенденції (до 13 піків з $p < 0,05$ за висотою піку), однак після поправки на множинні порівняння всі вони виявились статистично незначущими. Це може бути зумовлено невеликим розміром вибірки або слабким ступенем спектральних відмінностей у тканинах печінки за моделюванням меланоми та норми.

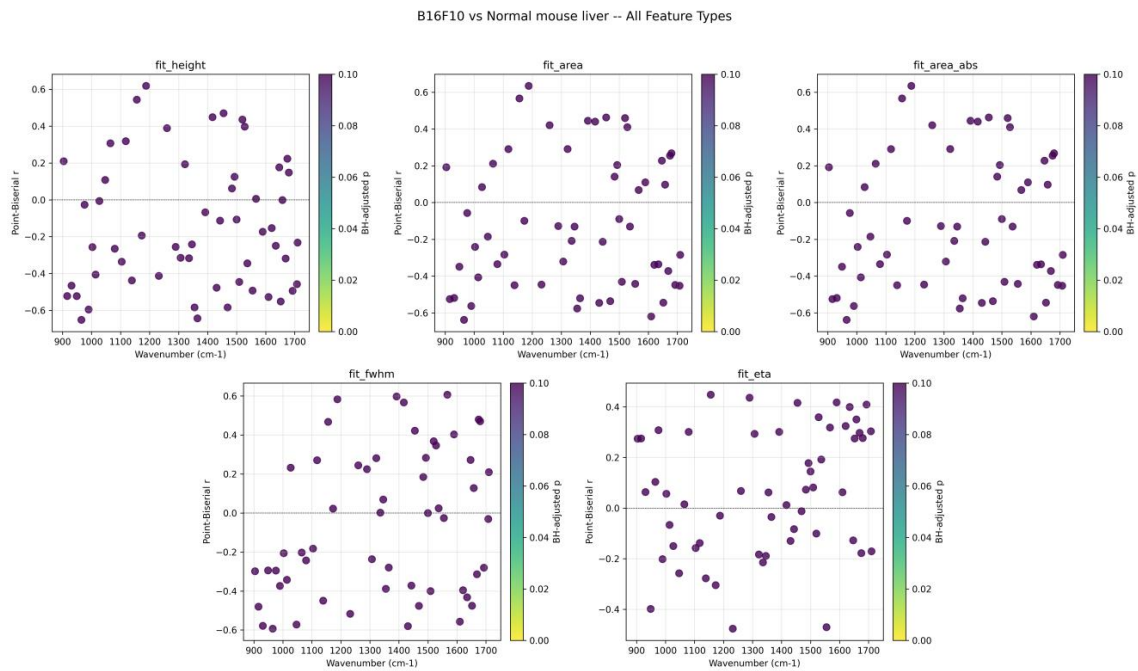


Рис. 3.1.4. Точково-бісеріальна кореляція: група B16F10 проти контролю (FDR-скоригований p)

3.2. Порівняння спектрів печінки моделі гепатоцелюлярної карциноми та контрольної групи

Під час порівняльного аналізу других похідних спектрів тканин печінки, отриманих у моделі гепатоцелюлярної карциноми, зі зразками контрольної групи вдалося ідентифікувати 56 пікових положень рис (3.2.1; 3.2.2), спільних для обох груп.

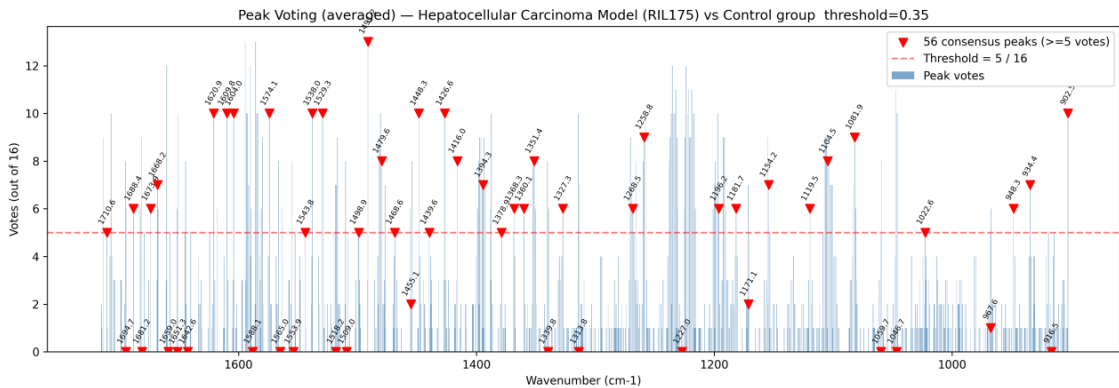


Рис. 3.2.1. Гістограма голосів: група RIL175 та контрольна група

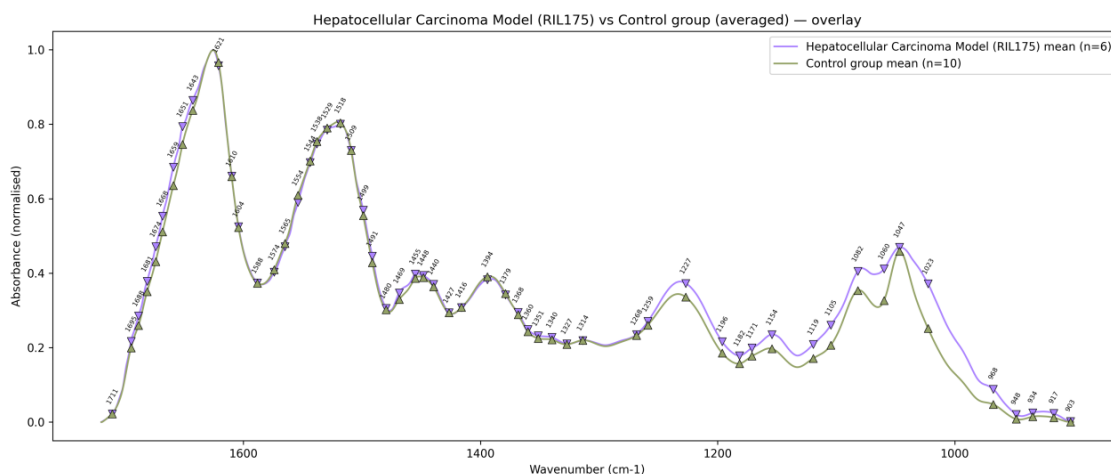


Рис. 3.2.2. Середні спектри групи RIL175 та контролю з відміченими консенсусними піками

Кожен усереднений спектр апроксимували лінійною суперпозицією функцій псевдо-Фойгта, по одній компоненті на кожен спільний пік. Початкові параметри отримували з апроксимації середнього спектра пулу. Якість апроксимації для пари порівняння становила $R^2_{\text{середнє}} = 0,999955$.

Такий рівень якості підгонки підтверджує коректність набору консенсусних піків та адекватність моделі псевдо-Фойгта для опису FTIR-ATR-спектрів біологічних тканин.

На рис. (3.2.3) показано апроксимацію середніх спектрів пулу для кожної пари. Верхні панелі демонструють вихідний спектр (синя лінія), суперпозицію (червона лінія) та окремі псевдо-Фойгт компоненти (пунктирні лінії). Нижні панелі відображають залишки.

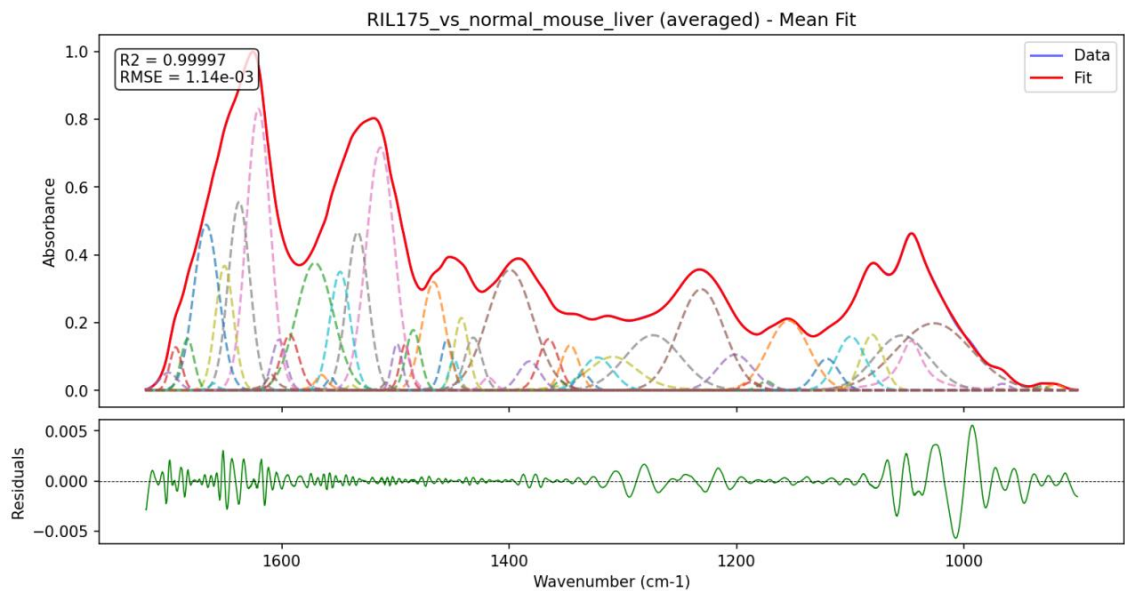


Рис. 3.2.3. Апроксимація середнього спектра пулу групи RIL175 та Контрольної групи (56 компонент, $R^2 = 0,99998$)

У групах порівняння відмінності між моделлю гепатоцелюлярної карциноми та контрольної групи були найбільш вираженими – 48 значущих піків після FDR-корекції рис (3.2.4) та табл. (3.2).

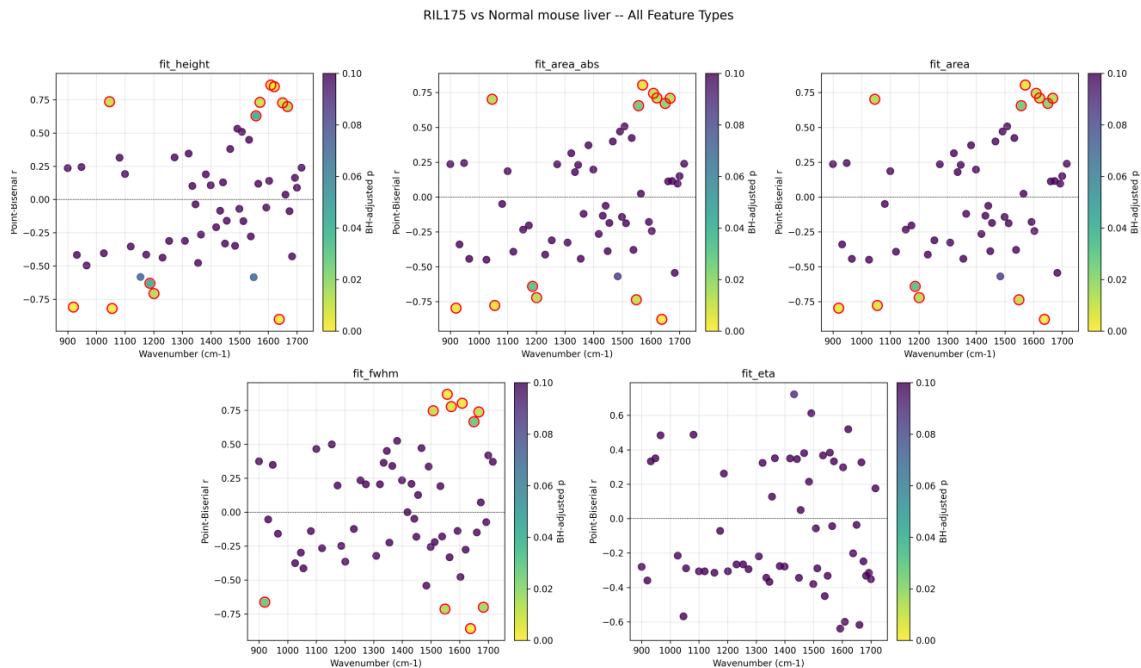


Рис. 3.2.4. Точково-бісеріальна кореляція по всіх ознаках: група RIL175 та контроль (FDR-скоригований p)

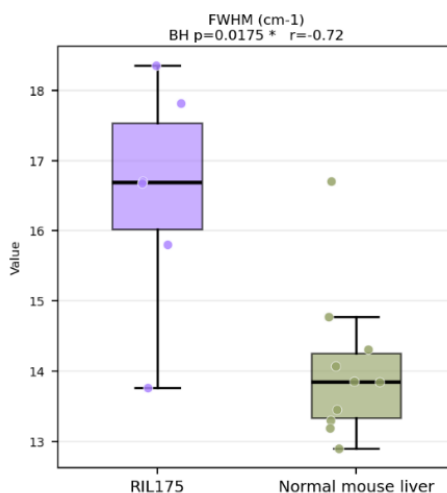


Рис. 3.2.5. Розподіл значень ширини на піввисоті (FWHM) для смуги поглинання 1683 cm^{-1} у групі RIL175 та контролю. На діаграмі розмаху горизонтальні лінії позначають перший кuartиль (нижня межа), медіану (середина) та третій кuartиль (верхня межа), вуса тягнуться від мінімуму до максимуму з виділенням екстремальних значень за $1,5 \times IQR$

* – різниця статистично значуща за $p = 0,05$

Смуга на довжині хвилі 1683 cm^{-1} пов'язана з симетричними коливаннями карбонільної групи $\text{C}=\text{O}$ [66; 67], що спостерігаються у кетонів, зокрема у спряжених кетонів [67], та карбонових кислот [68]. Деякі автори пропонують відносити цей пік також до β -поворотів вторинної структури білка [69].

У групі RIL175 спостерігається збільшення ширини на піввисоті піку при 1683 cm^{-1} порівняно з контролем, що свідчить про розширення спектрального профілю в цій області. Це може вказувати на посилення оксидативного стресу (включаючи ліпопероксидний і карбонільний) та збільшення представленості β -поворотів у білках протеому печінки. При цьому за даними ІЧ-спектроскопії неможливо однозначно встановити, чи зумовлені ці зміни конформаційними перебудовами існуючих білків або порушеннями в складі протеому.

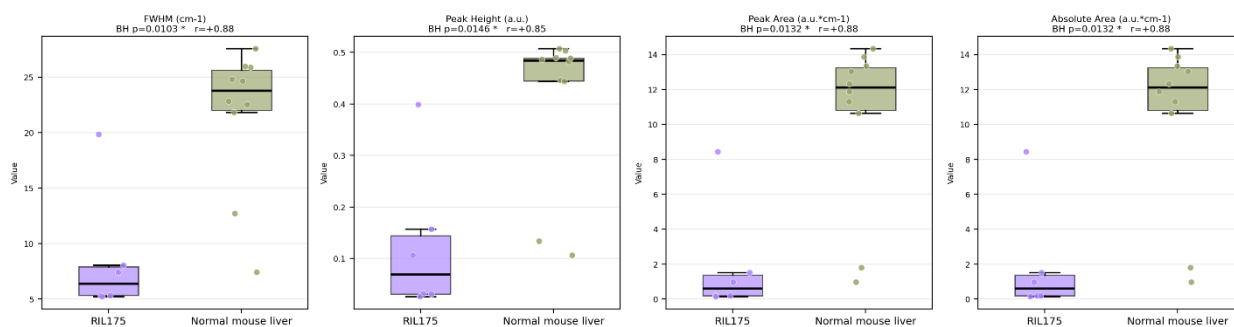


Рис. 3.2.6. Спектральні характеристики піку 1667 см⁻¹ для групи RIL175 та контролю

* – різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Смуга при довжині хвилі 1667 см⁻¹ включає внесок валентних коливань C=C ненасичених олефінів [70], коливань розтягування C=O альдегідів [71], а також C=N імінів та оксимів [72].

У контрольній групі спостерігаються вищі значення ширини на піввисоті, висоти, площі та абсолютної площі піку порівняно з групою RIL175, що вказує на зниження інтенсивності та звуження спектрального профілю даної смуги при пухлинному процесі. Це дає підстави припустити порушення метаболізму ліпідів, а саме зниження кількості ненасичених жирних кислот у печінці пухлинної моделі, що сприяє швидкому розмноженню ракових клітин.

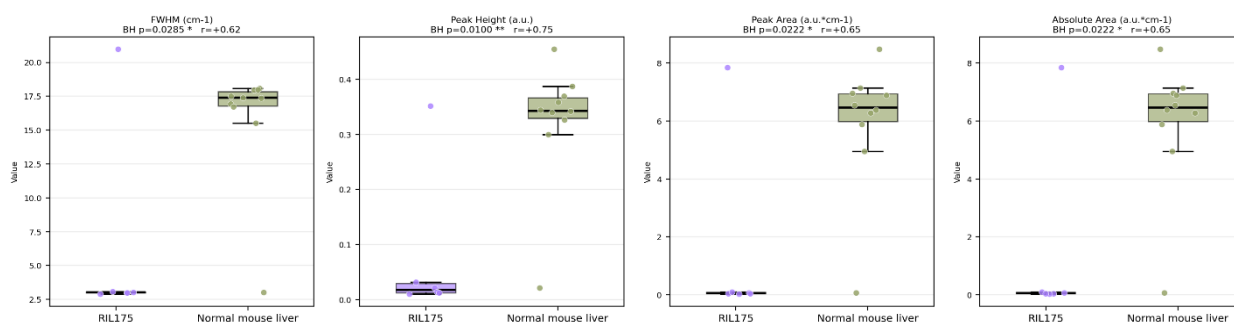


Рис. 3.2.7. Спектральні характеристики піку 1650 см⁻¹ для групи RIL175 та контролю

* – різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Пік 1650 cm^{-1} відповідає білкам і визначається смугами аміда I (валентне коливання C=O) [8], і відповідає α -спіралі [73]. У контрольній групі спостерігаються вищі значення ширини на піввисоті, висоти, площі та абсолютної площі піку порівняно з групою RIL175, що вказує на більш виражений внесок білкових (амідних) та карбонільних коливань у даній області порівняно з пухлинною тканиною. Це свідчить про зниження вмісту білків з α -спіралями у онкомоделі. Примітно, що у групі RIL175 ті ж спектральні характеристики довжини хвилі 1638 cm^{-1} , що відповідає паралельним β -листам білків. Зменшення кількості білків з α -спіралями та збільшення білків з β -структурами є характерним для патологій широкого спектру.

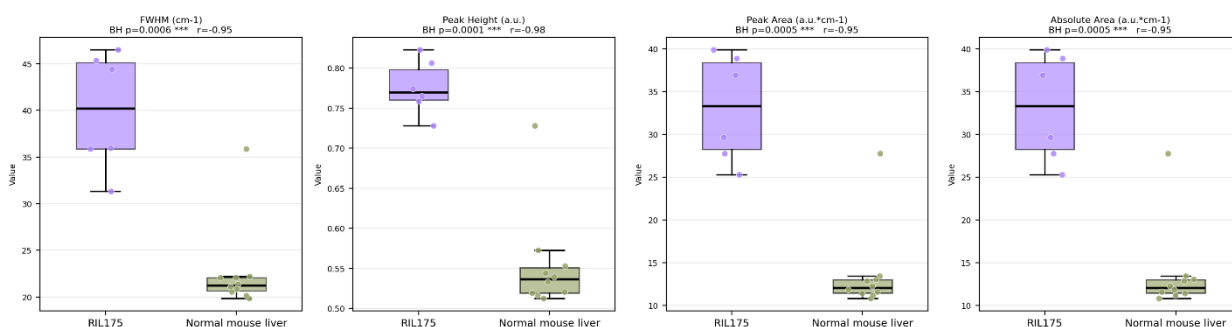


Рис. 3.2.8. Спектральні характеристики піку 1638 cm^{-1} для групи RIL175 та контролю

* – різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Примітно, що у групі RIL175 істотно збільшуються значення ширини на піввисоті, висоти, площі та абсолютної площі піку при довжині хвилі 1638 cm^{-1} , що відповідає паралельним β -листам білків. Перехід від α -спіралі до β -структури є характерним для амілоїдних відкладень і часто пов'язаний зі зміною фізіологічної функції на патологічну [8].

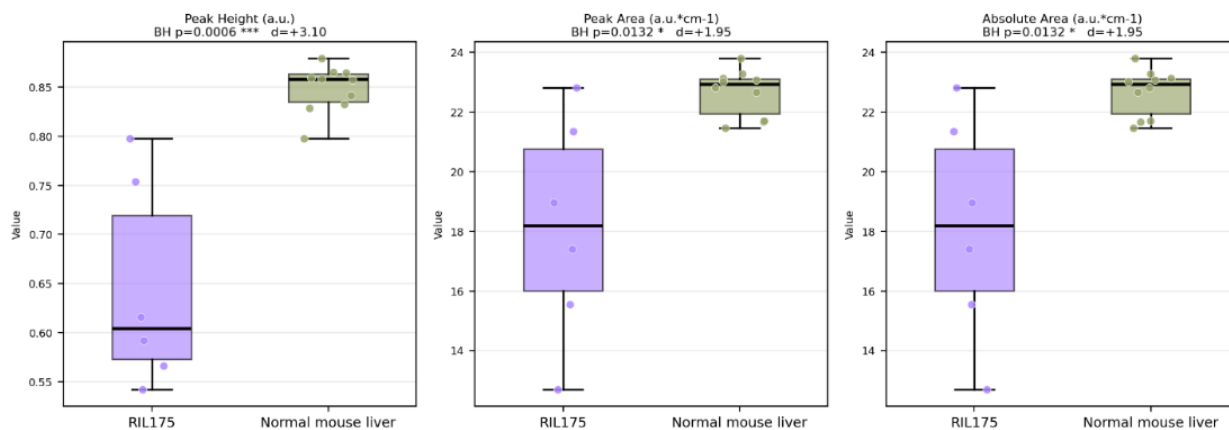


Рис. 3.2.9. Спектральні характеристики піку 1621 см⁻¹ для групи RIL175 та контролю

*– різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Однак привертає увагу зниження висоти, площі та абсолютної площі при довжині хвилі 1621 см⁻¹ у моделях раку. Поглинання при цьому піку властиве міжмолекулярним [73] антипаралельним β-листам [75]. Зникнення спеціалізованих ферментів позбавляє спектр від внеску специфічних амінокислотних радикалів (насамперед аргініну) та нативних β-структур [76].

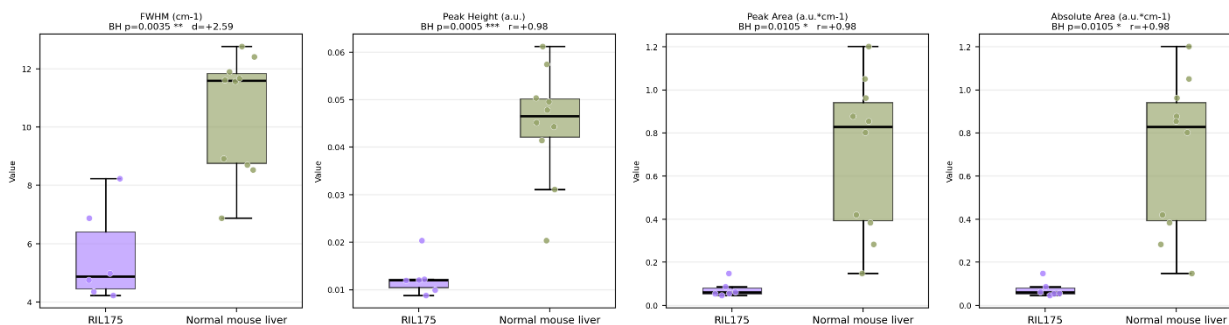


Рис. 3.2.10. Спектральні характеристики піку 1609 см⁻¹ для групи RIL175 та контролю

*– різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Подібні результати були отримані й щодо спектральних характеристик піку 1609 см⁻¹. Контрольна група характеризувалася вищими значеннями ширини на піввисоті, висоти, площі та абсолютної площі піку, властивого

міжмолекулярним антипаралельним β -листам [73]. Можна припустити, що відбувається зниження активності ферментів, відповідальних за катаболізм ароматичних амінокислот: тирозин, фенілаланін та триптофан [75].

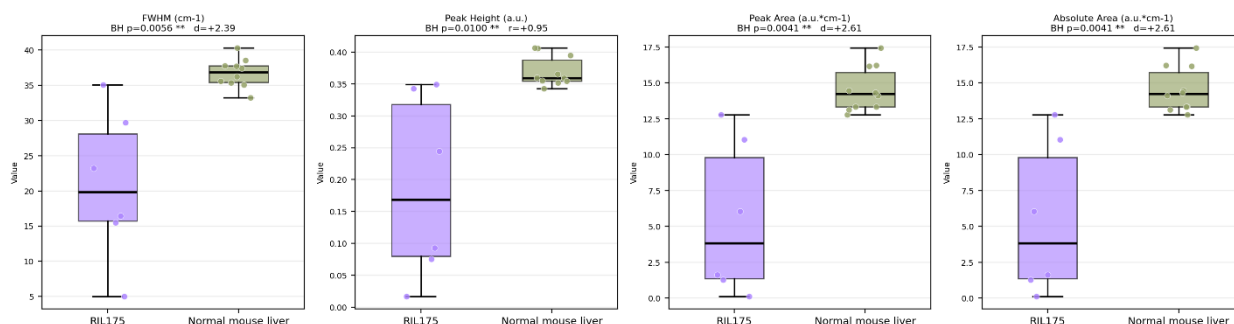


Рис. 3.2.11. Спектральні характеристики піку 1571 cm^{-1} для групи RIL175 та контролю

*— різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Пік при 1574 cm^{-1} є одним із найскладніших для інтерпретації. Основними структурами, що поглинають випромінювання на цій довжині хвилі, є структури аміду II: структури β -листів, а також аспартат і глутамат, про що свідчить поглинання при 1523 і 1571 cm^{-1} [77], коливань N–H-груп середньої та слабкої інтенсивності у вторинних амінах (можуть маскуватися коливаннями ароматичного кільця C=C) [78]. Також слід мати на увазі, що сильне поглинання при 1574 cm^{-1} може свідчити про коливальні вібрації C=N у основах Шиффа, які виступають лігандами в координаційній сполуці або, що більш імовірно, іміногрупи в порфіринових кільцях гемоглобінових гемів. Тканини печінки мишей з онкомоделлю характеризувалися меншими значеннями ширини на піввисоті, висоти, площі та абсолютної площі порівняно з контрольною групою.

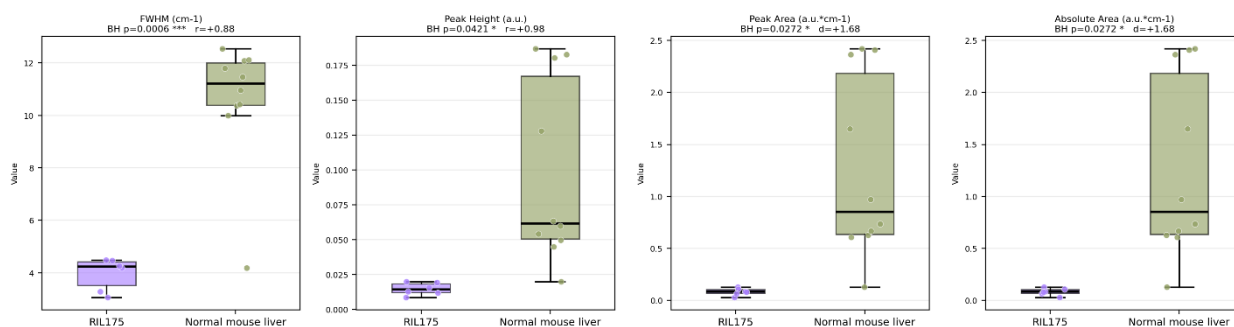


Рис. 3.2.12. Спектральні характеристики піку 1557 см⁻¹ для групи RIL175 та контролю

*— різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Щодо піку при 1557 см⁻¹, який можна віднести до згинальних коливань N—H у поєднанні з валентними коливаннями C—N білків і, на думку деяких авторів, до основ Шиффа [79], слід зазначити менші значення ширини на піввисоті, висоти, площі та абсолютної площі в групі з моделлю пухлини.

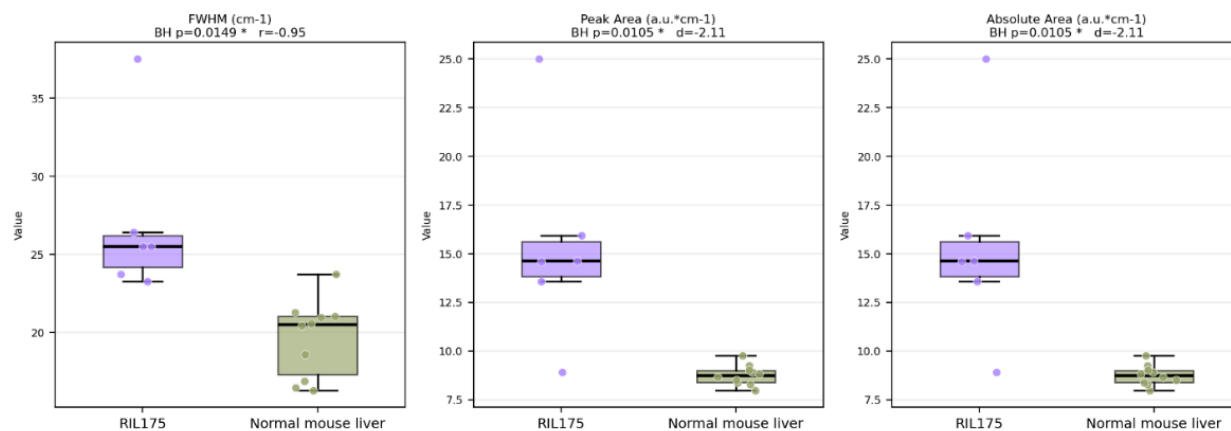


Рис. 3.2.13. Спектральні характеристики піку 1549 см⁻¹ для групи RIL175 та контролю

*— різниця статистично значуща за $p < 0,05$

На довжині хвилі 1549 см⁻¹, властивому —NH₂ Аміді II [80], і, що цікаво, триазинова група також характеризується поглинанням у цій області. Тканини печінки моделей мали великі значення ширини на піввисоті, площі та абсолютної площі даного піку. RIL175, перебуваючи в умовах

метаболического стрессу, масивно накопичує неправильно згорнуті білки, які утворюють стабільні нерегулярні агрегати [65].

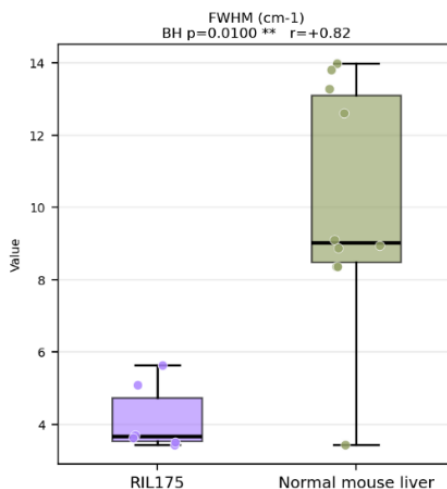


Рис. 3.2.14. Спектральні характеристики піку 1508 cm^{-1} для групи RIL175 та контролю

*— різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Пік при 1508 cm^{-1} відповідає компоненту смуги Амиду II і відображає переважно коливання C–N та згинання N–H білків [68]. Його посилення та зміщення вказують на зміни конформації та можливу деградацію білка, а також на внесок розтягування C=C в ароматичному кільці [71;75]. Група з пухлинною моделлю відрізнялася меншим значенням ширини на піввисоті, порівняно з контролем.

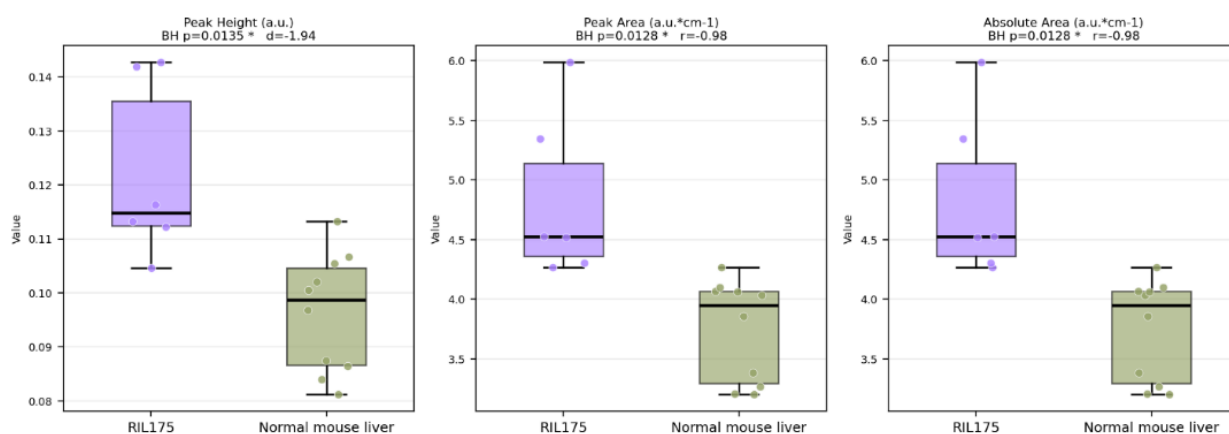


Рис. 3.2.15. Спектральні характеристики піку 1201 cm^{-1} для групи RIL175 та контролю

*— різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Коливання розтягування зв'язку C–O, характерні для вуглеводів, органічних кислот і фенольних сполук, характеризуються піком 1201 см^{-1} валентного розтягування $\nu\text{C–O–C}$ зв'язків [73] на цій довжині хвилі також виявляються коливальні коливання гідроксильної групи та деформаційні коливання C–H зв'язків ($\rho\text{ OH}$; $\delta\text{ CH}$) [70]. Тканини моделей характеризувалися більшими значеннями висоти, площі та абсолютної площі, порівняно з контролем.

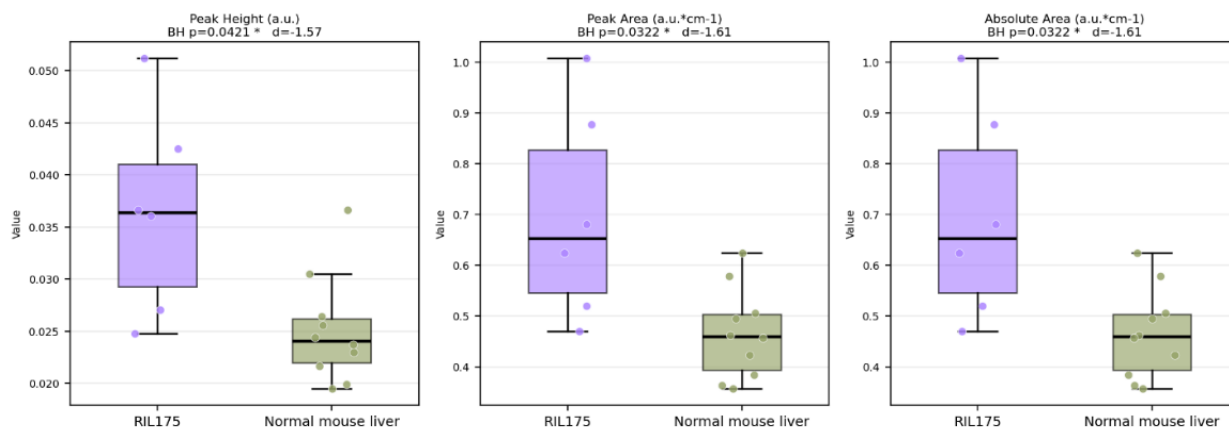


Рис. 3.2.16. Спектральні характеристики піку 1187 см^{-1} для групи RIL175 та контролю

*— різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Аналогічні результати були отримані й для піку 1187 см^{-1} , що відображає коливання того самого νCOC -зв'язку [68]; [70].

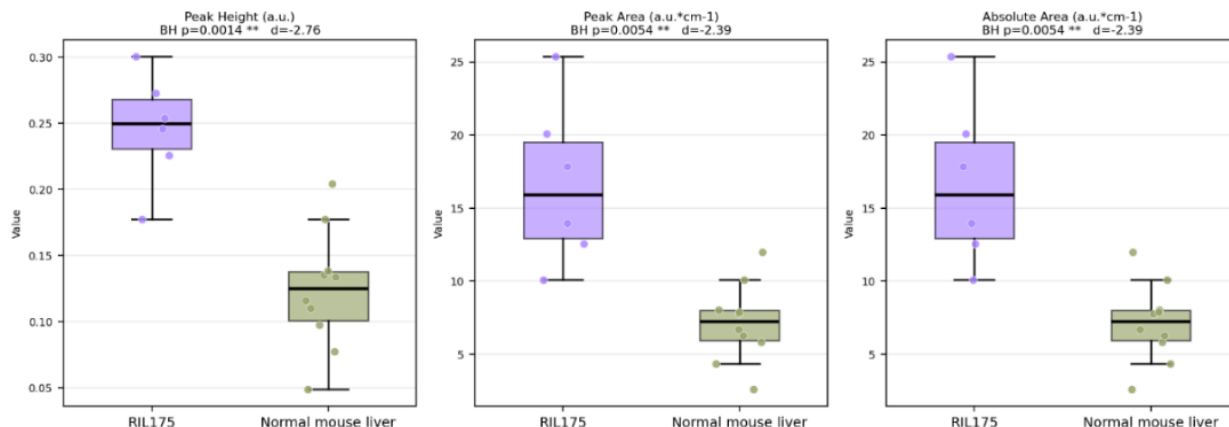


Рис. 3.2.17. Спектральні характеристики піку 1055 см^{-1} для групи RIL175 та контролю

*— різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Зв'язки на довжині хвилі 1055 см^{-1} що формуються за рахунок валентних коливань зв'язків C–O та C–OH мембранозв'язаних олігосахаридів, а також симетричних валентних коливань фосфодіефірних груп (PO_2^-) і складних ефірів фосфорної кислоти, що входять до складу мембранних фосфоліпідів [72] RIL175 відрізняється підвищеними значеннями висоти, площі та абсолютної площі в групі з моделлю, ніж у контрольній. То ж це індикатор стану глікопротеїнів, гліколіпідів, загалом, ліпідного бішару.

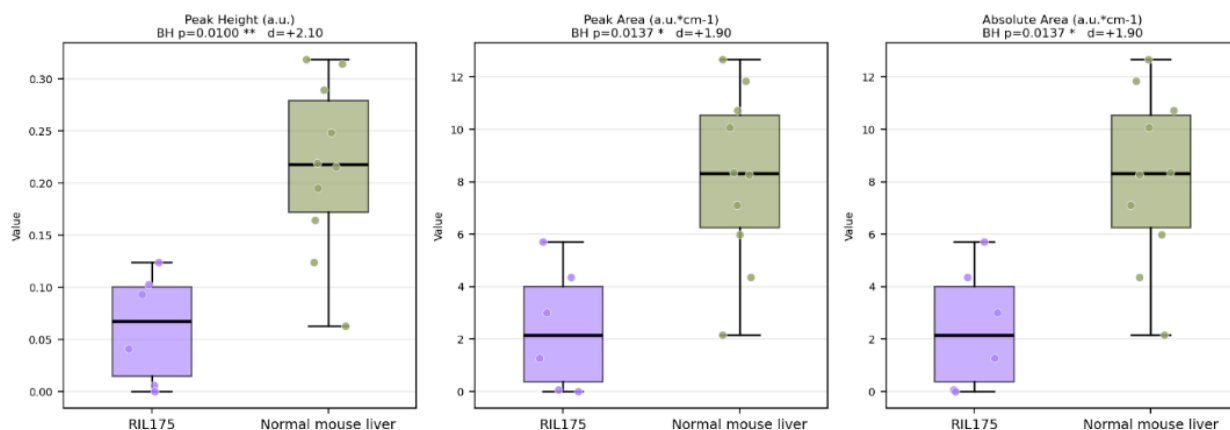


Рис. 3.2.18. Спектральні характеристики піку 1046 см^{-1} для групи RIL175 та контролю

*— різниця статистично значуща за $p < 0,05$

На довжині хвилі 1046 см^{-1} фіксують симетричні валентні коливання C–O спиртів [64] і цукрів; останнє можна розглядати як індикатор глікозилювання. Асиметричне розтягнення C–O–C пов'язане з глікозидними (ефірними) зв'язками [78]. Також у спектрах може спостерігатися смуга симетричного валентного коливання іонів NO_3^- , що відповідає симетричному розтягуванню зв'язків N–O у нітратних групах [67]. Моделі пухлини характеризувалися зниженими значеннями висоти, площі та абсолютної площі у групі з моделлю, ніж у контрольній.

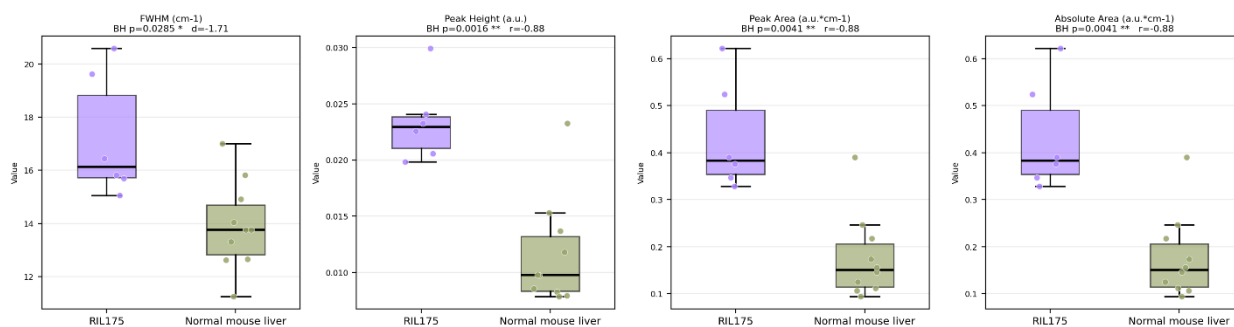


Рис. 3.2.19. Спектральні характеристики піку 920 см⁻¹ для групи RIL175 та контролю

*– різниця статистично значуща за $p < 0,05$

920 см⁻¹ – коливання розтягування C–O, C–C цукру в нуклеїнових кислотах [8] коливання рибозного кільця [70] у групі моделі більша ширина на піввисоті, висота та площа, а також абсолютна площа, ніж у контролі. У сукупності це може свідчити про порушення вуглеводного обміну, однак не вказує на зниження вмісту рибози; навпаки, отримані дані можуть свідчити про її відносне підвищення, і, навіть, про інтенсифікацію синтезу РНК.

Таблиця 3.2

Піки зі статистично значущими відмінностями після FDR-корекції (RIL175 vs Контроль, BH $p < 0,05$).

Пік (см ⁻¹)	Спектральна ознака	r pb	p (BH)	Стат.	p (тест)	Розмір ефекту	RIL175 M ± SD	Контроль M ± SD
920	Площа піку	-0.797	0.0041**	U = 56.5	0.0048**	r rb = -0.883	0.4311 ± 0.1058	0.1767 ± 0.0850
	Абсолютна площа	-0.797	0.0041**	U = 56.5	0.0048**	r rb = -0.883	0.4311 ± 0.1058	0.1767 ± 0.0850
	FWHM (напівширина)	-0.663	0.0285*	t = 3.317	0.0051**	d = -1.713	17.2043 ± 2.1103	13.9147 ± 1.5783
	Висота піку	-0.809	0.0016**	U = 56.5	0.0048**	r rb = -0.883	0.0234 ± 0.0033	0.0116 ± 0.0046
1046	Площа піку	+0.702	0.0137*	t = -3.684	0.0025**	d = 1.903	2.3945 ± 2.1416	8.1468 ± 3.1696
	Абсолютна площа	+0.702	0.0137*	t = -3.684	0.0025**	d = 1.903	2.3945 ± 2.1416	8.1468 ± 3.1696
	Висота піку	+0.735	0.0100**	t = -4.061	0.0012**	d = 2.097	0.0610 ± 0.0482	0.2151 ± 0.0785
1055	Площа піку	-0.778	0.0054**	t = 4.632	3.88e-04***	d = -2.392	16.6531 ± 5.0948	7.1614 ± 2.5429
	Абсолютна площа	-0.778	0.0054**	t = 4.632	3.88e-04***	d = -2.392	16.6531 ± 5.0948	7.1614 ± 2.5429
	Висота піку	-0.820	0.0014**	t = 5.351	1.02e-04***	d = -2.763	0.2459 ± 0.0385	0.1239 ± 0.0430
1187	Площа піку	-0.641	0.0322*	t(W) = 2.584	0.0408*	d = -1.613	0.6967 ± 0.1901	0.4652 ± 0.0846
	Абсолютна площа	-0.641	0.0322*	t(W) =	0.0408*	d = -1.613	0.6967 ±	0.4652 ±

				2.584			0.1901	0.0846
	Висота піку	-0.630	0.0421*	t = 3.037	0.0089**	d = -1.568	0.0364 ± 0.0089	0.0251 ± 0.0049
1201	Площа піку	-0.722	0.0128*	U = 59.5	0.0016**	r _{rb} = -0.983	4.8245 ± 0.6307	3.7437 ± 0.4057
	Абсолютна площа	-0.722	0.0128*	U = 59.5	0.0016**	r _{rb} = -0.983	4.8245 ± 0.6307	3.7437 ± 0.4057
	Висота піку	-0.708	0.0135*	t = 3.747	0.0022**	d = -1.935	0.1218 ± 0.0149	0.0964 ± 0.0104
1508	FWHM (напівширина)	+0.747	0.0100**	U = 5.5	0.0092**	r _{rb} = 0.817	4.1659 ± 0.8667	10.0773 ± 3.1536
1549	Площа піку	-0.737	0.0105*	t(W) = 3.101	0.0264*	d = -2.107	15.4406 ± 4.8086	8.7529 ± 0.4870
	Абсолютна площа	-0.737	0.0105*	t(W) = 3.101	0.0264*	d = -2.107	15.4406 ± 4.8086	8.7529 ± 0.4870
	FWHM (напівширина)	-0.715	0.0149*	U = 58.5	0.0024**	r _{rb} = -0.950	26.9902 ± 4.8284	19.6330 ± 2.3383
1557	Площа піку	+0.656	0.0272*	t(W) = -4.250	0.0021**	d = 1.678	0.0837 ± 0.0319	1.2579 ± 0.8278
	Абсолютна площа	+0.656	0.0272*	t(W) = -4.250	0.0021**	d = 1.678	0.0837 ± 0.0319	1.2579 ± 0.8278
	FWHM (напівширина)	+0.868	5.82e-04***	U = 3.5	0.0048**	r _{rb} = 0.883	3.9649 ± 0.5674	10.5966 ± 2.2820
	Висота піку	+0.629	0.0421*	U = 0.5	0.0016**	r _{rb} = 0.983	0.0146 ± 0.0040	0.0969 ± 0.0621
1571	Площа піку	+0.804	0.0041**	t(W) = -3.999	0.0085**	d = 2.610	5.4864 ± 4.9338	14.5283 ± 1.4802
	Абсолютна площа	+0.804	0.0041**	t(W) = -3.999	0.0085**	d = 2.610	5.4864 ± 4.9338	14.5283 ± 1.4802
	FWHM (напівширина)	+0.777	0.0056**	t(W) = -3.564	0.0151*	d = 2.386	20.8292 ± 9.8661	36.7193 ± 1.9205
	Висота піку	+0.731	0.0100**	U = 1.5	0.0024**	r _{rb} = 0.950	0.1869 ± 0.1318	0.3696 ± 0.0223
1609	Площа піку	+0.744	0.0105*	U = 0.5	0.0016**	r _{rb} = 0.983	0.0760 ± 0.0352	0.6988 ± 0.3412
	Абсолютна площа	+0.744	0.0105*	U = 0.5	0.0016**	r _{rb} = 0.983	0.0760 ± 0.0352	0.6988 ± 0.3412
	FWHM (напівширина)	+0.802	0.0035**	t = -5.024	1.86e-04***	d = 2.595	5.5745 ± 1.4772	10.4946 ± 1.9300
	Висота піку	+0.861	5.22e-04***	U = 0.5	0.0016**	r _{rb} = 0.983	0.0126 ± 0.0037	0.0449 ± 0.0113
1621	Площа піку	+0.711	0.0132*	t(W) = -2.934	0.0305*	d = 1.954	18.1328 ± 3.4111	22.6680 ± 0.7460
	Абсолютна площа	+0.711	0.0132*	t(W) = -2.934	0.0305*	d = 1.954	18.1328 ± 3.4111	22.6680 ± 0.7460
	Висота піку	+0.848	6.10e-04***	t(W) = -4.666	0.0047**	d = 3.097	0.6447 ± 0.0962	0.8485 ± 0.0225
1638	Площа піку	-0.877	4.54e-04***	U = 58.5	0.0024**	r _{rb} = -0.950	33.0849 ± 5.7077	13.6356 ± 4.7897
	Абсолютна площа	-0.877	4.54e-04***	U = 58.5	0.0024**	r _{rb} = -0.950	33.0849 ± 5.7077	13.6356 ± 4.7897
	FWHM (напівширина)	-0.858	5.82e-04***	U = 58.5	0.0024**	r _{rb} = -0.950	39.9089 ± 5.7590	22.6282 ± 4.4788
	Висота піку	-0.901	1.05e-04***	U = 59.5	0.0016**	r _{rb} = -0.983	0.7759 ± 0.0312	0.5539 ± 0.0607
1650	Площа піку	+0.672	0.0222*	U = 10.5	0.0392*	r _{rb} = 0.650	1.3564 ± 2.9044	5.9591 ± 2.1442
	Абсолютна площа	+0.672	0.0222*	U = 10.5	0.0392*	r _{rb} = 0.650	1.3564 ± 2.9044	5.9591 ± 2.1442
	FWHM (напівширина)	+0.666	0.0285*	U = 11.5	0.0507	r _{rb} = 0.617	5.9938 ± 6.7008	15.8491 ± 4.3364
	Висота піку	+0.727	0.0100**	U = 7.5	0.0169*	r _{rb} = 0.750	0.0736 ± 0.1245	0.3244 ± 0.1084
1667	Площа піку	+0.709	0.0132*	U = 3.5	0.0048**	r _{rb} = 0.883	1.9078 ± 2.9626	10.3551 ± 4.6092
	Абсолютна площа	+0.709	0.0132*	U = 3.5	0.0048**	r _{rb} = 0.883	1.9078 ± 2.9626	10.3551 ± 4.6092
	FWHM (напівширина)	+0.738	0.0103*	U = 3.5	0.0048**	r _{rb} = 0.883	8.5403 ± 5.1836	21.6146 ± 6.1210
	Висота піку	+0.699	0.0146*	U = 4.5	0.0067**	r _{rb} = 0.850	0.1253 ± 0.1314	0.4090 ± 0.1458
1683	FWHM (напівширина)	-0.701	0.0175*	U = 51.5	0.0226*	r _{rb} = -0.717	16.5196 ± 1.4824	14.0405 ± 1.0351

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. r_{pb} – точково-бісеріальний коефіцієнт; d – Cohen's d;

r_{rb} – рангово-бісеріальний r; Welch t – критерій Велча.

3.3. Порівняння спектрів печінки моделі меланому та гепатоцелюлярної карциноми

Для груп пари порівнянь B16F10 та RIL175 (пул $n = 13$) ідентифіковано 54 консенсусних піки. На рис. (3.3.1) показано гістограму голосів та позначення консенсусних піків. Рис. 3.3.2 демонструє середні спектри обох груп із відміченими консенсусними піками.

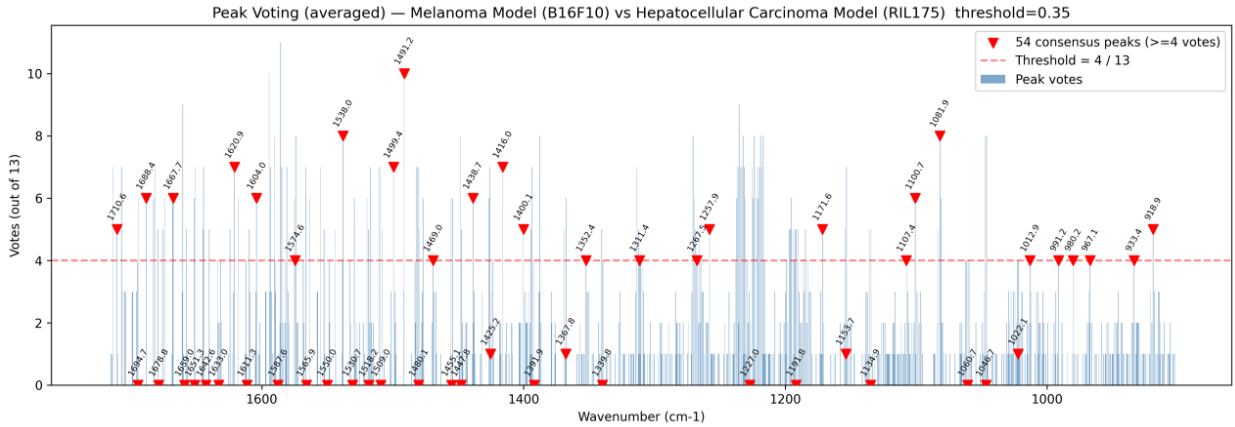


Рис. 3.3.1. Гістограма голосів за другою похідною груп B16F10 та RIL175. Червоні маркери – консенсусні піки ($\geq 35\%$ голосів)

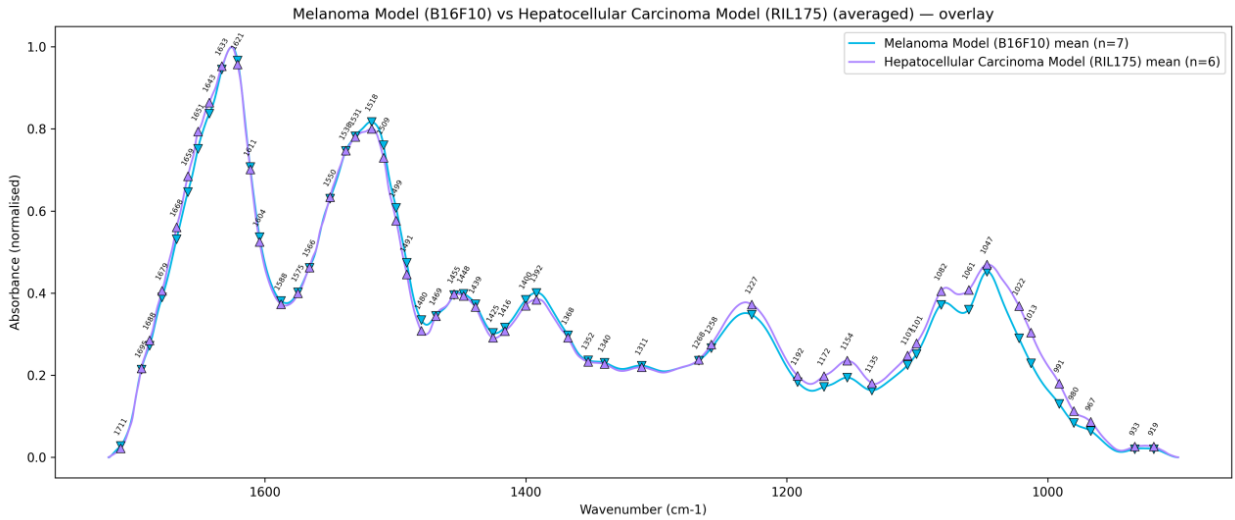


Рис. 3.3.2. Середні спектри груп B16F10 та RIL175 з відміченими консенсусними піками

На рис. (3.3.3) показано апроксимацію середніх спектрів пулу для кожної пари порівнянь. Верхні панелі демонструють вихідний спектр (синя лінія), суперпозицію (червона лінія) та окремі псевдо-Фойгт компоненти (пунктирні лінії). Нижні панелі відображають залишки.

Кожен усереднений спектр апроксимували лінійною суперпозицією функцій псевдо-Фойгта, по одній компоненті на кожен спільний пік. Початкові параметри отримували з апроксимації середнього спектра пулу. Якість апроксимації для пари порівняння становила $R^2_{\text{середнє}} = 0,999982$.

Такий рівень якості підгонки підтверджує коректність набору консенсусних піків та адекватність моделі псевдо-Фойгта для опису FTIR-ATR-спектрів біологічних тканин.

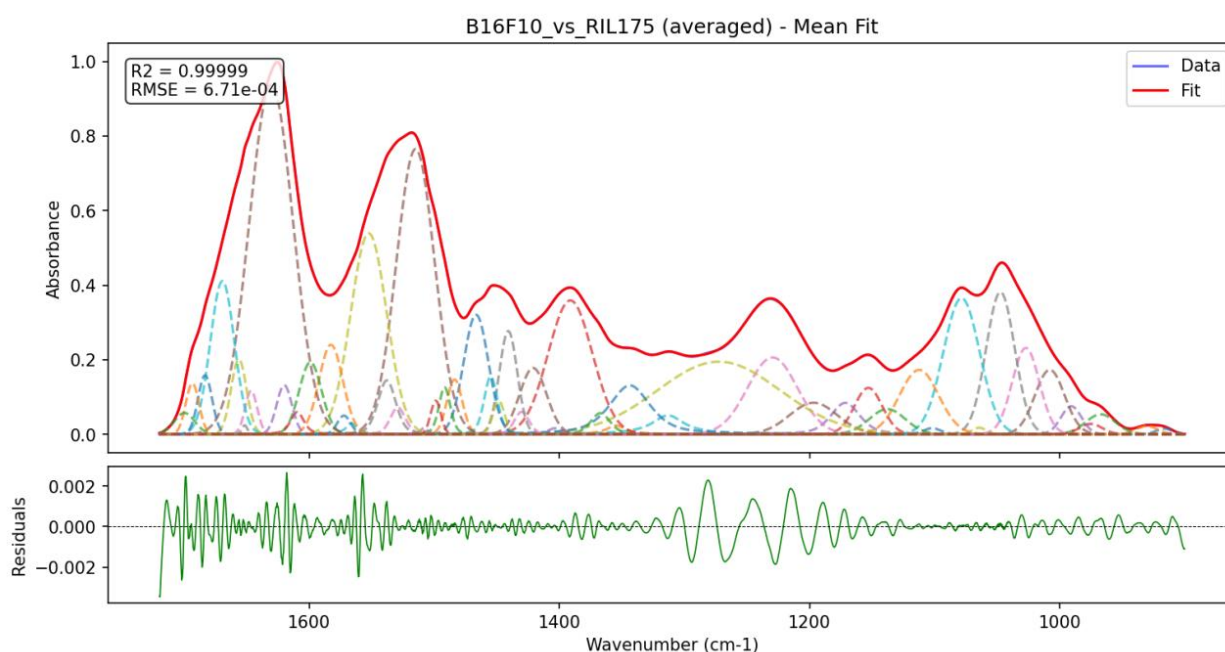


Рис. 3.3.3. Апроксимація середнього спектра пулу груп B16F10 та RIL175 функцією псевдо-Фойгта (54 компоненти, $R^2 = 0,99999$)

Між моделями меланоми та гепатоцелюлярної карциноми виявлено 16 піків, що значущо відрізняються після FDR-корекції рис (3.3.4) та (табл. 3.3).

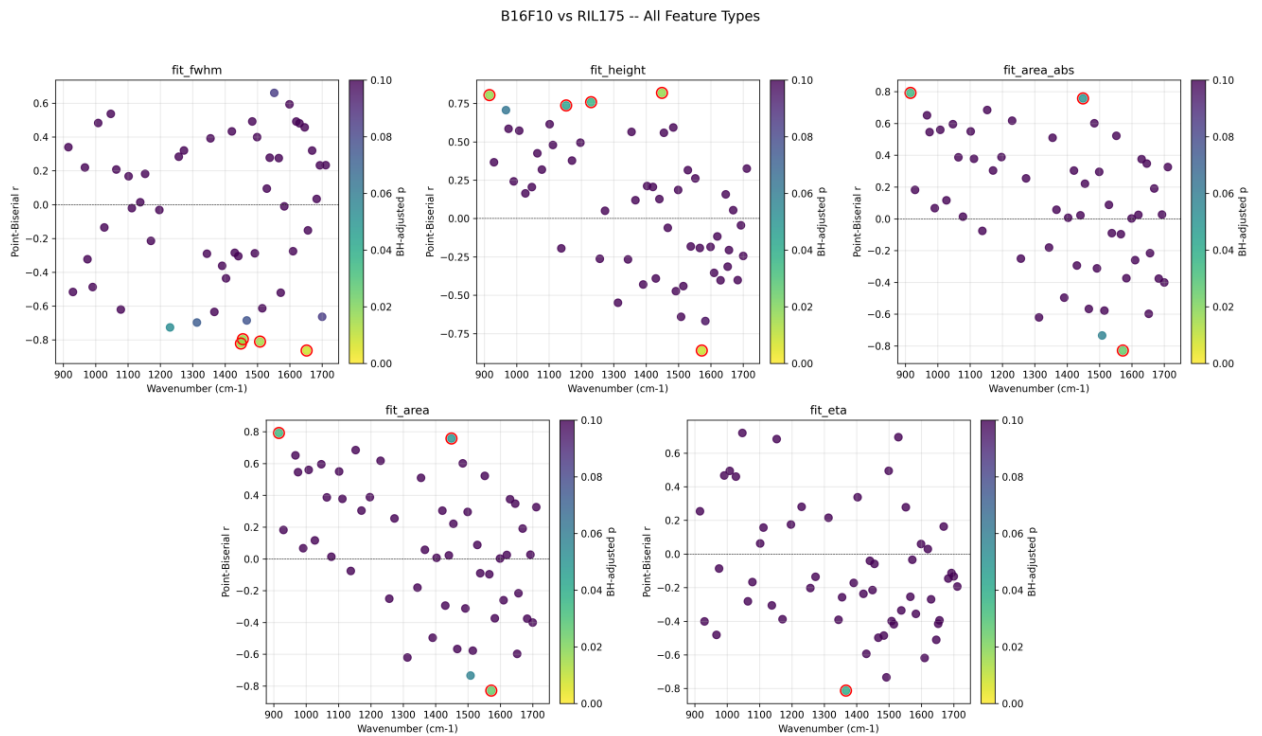


Рис. 3.3.4. Точково-бісеріальна кореляція по всіх ознаках груп: B16F10 та RIL175 (FDR-скоригований p)

Таблиця 3.3

Піки зі статистично значущими відмінностями після FDR-корекції (модель меланоми та гепатоцелюлярної карциноми, $BH\ p < 0,05$)

Пік (см ⁻¹)	Спектральна ознака	r_pb	p (raw)	p (BH)	Тест	Стат.	p (тест)	Розмір ефекту	B16F10 M ± SD	RIL175 M ± SD
916	Площа піку	+0.792	0.0013**	0.0338*	Student t	t = -4.303	0.0013**	d = 2.394	0.1849 ± 0.0443	0.2855 ± 0.0308
	Абсолютна площа	+0.792	0.0013**	0.0338*	Student t	t = -4.303	0.0013**	d = 2.394	0.1849 ± 0.0443	0.2855 ± 0.0308
	Висота піку	+0.804	9.17e-04***	0.0165*	Student t	t = -4.490	9.17e-04***	d = 2.498	0.0121 ± 0.0023	0.0179 ± 0.0019
1153	Висота піку	+0.737	0.0041**	0.0439*	Mann-Whitney	U = 3.0	0.0082**	r_rb = 0.857	0.1048 ± 0.0147	0.1416 ± 0.0190
1230	Висота піку	+0.758	0.0027**	0.0361*	Student t	t = -3.855	0.0027**	d = 2.145	0.1990 ± 0.0091	0.2181 ± 0.0070
1367	Параметр η (Лоренц/Гаус)	-0.813	7.29e-04***	0.0394*	Welch t	t(W) = 4.323	0.0052**	d = -2.576	0.6345 ± 0.0282	0.4608 ± 0.0861
1449	Площа піку	+0.757	0.0027**	0.0491*	Student t	t = -3.845	0.0027**	d = 2.139	0.9322 ± 0.1134	1.2396 ± 0.1512
	Абсолютна площа	+0.757	0.0027**	0.0491*	Student t	t = -3.845	0.0027**	d = 2.139	0.9322 ± 0.1134	1.2396 ± 0.1512
	FWHM (напівширина)	-0.822	5.72e-04***	0.0142*	Student t	t = 4.779	5.72e-04***	d = -2.659	11.1879 ± 0.1855	10.6639 ± 0.1763
	Висота піку	+0.819	6.23e-04***	0.0165*	Student t	t = -4.727	6.23e-04***	d = 2.630	0.0782 ± 0.0092	0.1089 ± 0.0124
1455	FWHM (напівширина)	-0.796	0.0011**	0.0153*	Student t	t = 4.361	0.0011**	d = -2.426	13.1835 ± 0.5214	11.7997 ± 0.5285
1508	FWHM (напівширина)	-0.810	7.88e-04***	0.0142*	Student t	t = 4.582	7.88e-04***	d = -2.549	9.8347 ± 1.2455	5.2674 ± 2.0187
1572	Площа піку	-0.829	4.59e-04***	0.0248*	Student t	t = 4.917	4.59e-04***	d = -2.736	1.0826 ± 0.2446	0.5166 ± 0.0931

	Абсолютна площа	-0.829	4.59e-04***	0.0248*	Student t	t = 4.917	4.59e-04***	d = -2.736	1.0826 ± 0.2446	0.5166 ± 0.0931
	Висота піку	-0.860	1.62e-04***	0.0087**	Student t	t = 5.594	1.62e-04***	d = -3.112	0.0736 ± 0.0124	0.0388 ± 0.0070
1652	FWHM (напівширина)	-0.863	1.46e-04***	0.0079**	Mann-Whitney	U = 41.0	0.0023**	r _{rb} = -0.952	6.9130 ± 0.6694	4.2793 ± 0.8710

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. r_{pb} – точково-бісеріальний коефіцієнт; d – Cohen's d ; r_{rb} – рангово-бісеріальний r ; Welch t – критерій Велча.

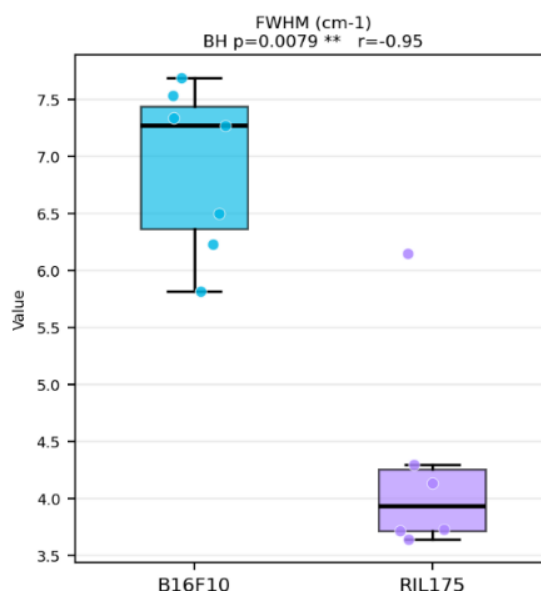


Рис. 3.3.5. Спектральні характеристики піку 1652 cm^{-1} для груп B16F10 та RIL175

* – різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Звужений пік у моделі RIL175 при 1650 cm^{-1} вказує на наявність білків із високовпорядкованою α -спіральною архітектурою. Тоді як більш широкий – у групи B16F10 зумовлений високою гетерогенністю білкового складу меланоми та, ймовірно, більшою дисперсією міцності водневих зв'язків. Ця різниця пояснюється саме базовими відмінностями в протеомі клітин різного генезу, а не ізольованими конформаційними перебудовами. Відмінність також зумовлена валентними коливаннями карбонілу. У меланоми підвищена кількість кислих амінокислот аспартату та глутамату [71].

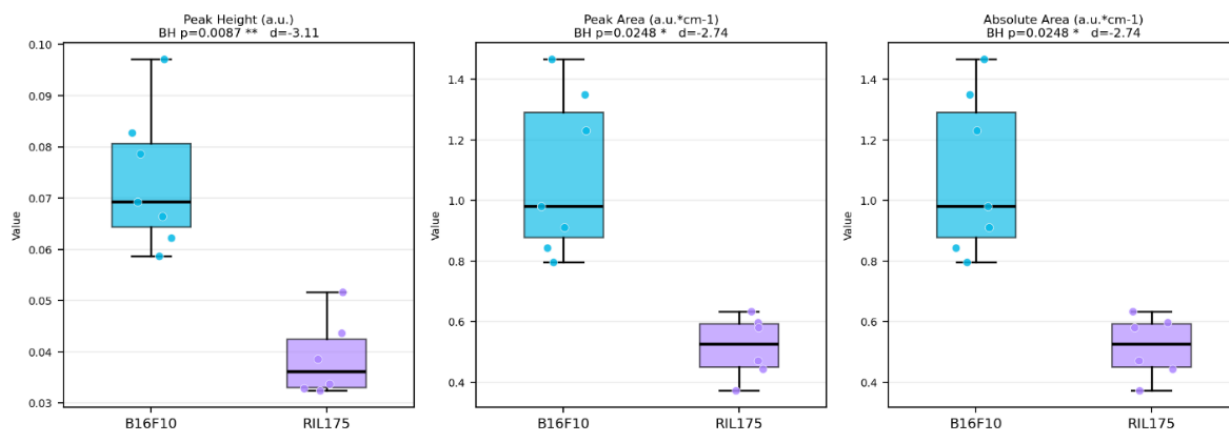


Рис. 3.3.6. Спектральні характеристики піку 1572 см⁻¹ для груп B16F10 та RIL175

*– різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Збільшення площі та висоти піку при 1572 см⁻¹ у клітинах меланому B16F10 порівняно з гепатоцелюлярною карциномою RIL175 зумовлене тим, що вона має високу залежність від глютаміну та активно використовує глютамат як аутокринний фактор росту [75]. Накопичення маркерних протеїнів S100, які високо експресуються у меланомі збільшують кількість карбоксилат-іонів у зразку [79].

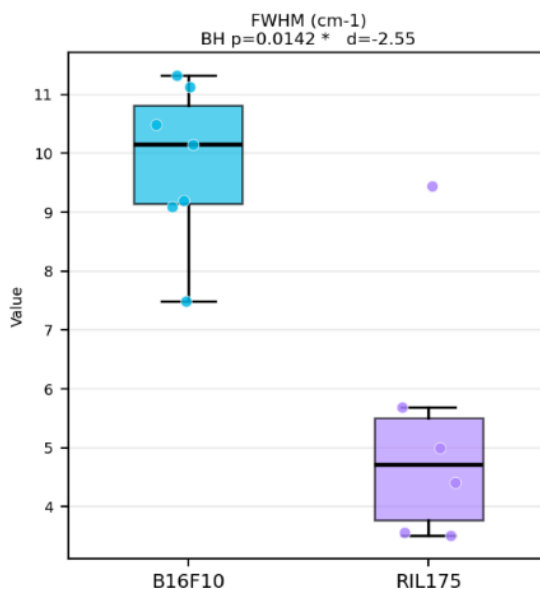


Рис. 3.3.7. Спектральні характеристики піку 1508 см⁻¹ для груп B16F10 та RIL175

*– різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Тирозин, що прослідковується при 1508 см^{-1} є обов'язковим попередником меланінів. У клітинах меланоми високоактивний тирозиназний шлях призводить до складних і динамічних взаємодій тирозину та його метаболітів [69]. Отримані результати можуть вказувати на метастазування меланоми в печінку, що супроводжується підвищенням ширини на піввисоті на цій довжині хвилі порівняно з карциномою.

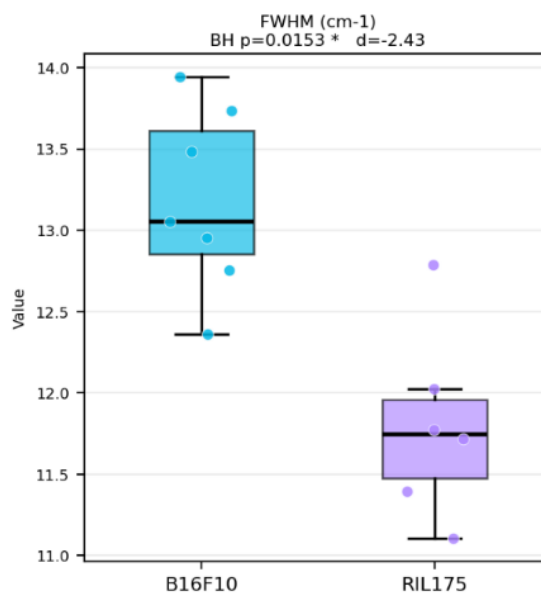


Рис. 3.3.8. Спектральні характеристики піку 1455 см^{-1} для груп B16F10 та RIL175

*– різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Смуга поглинання 1455 см^{-1} приписується асиметричним деформаційним коливанням метильних та метиленових груп, присутніх переважно в аліфатичних ланцюгах ліпідів [5]. Розширення цих смуг вказує на збільшення частки гош-конформерів та вищу плинність мембран клітин печінки моделі меланоми.

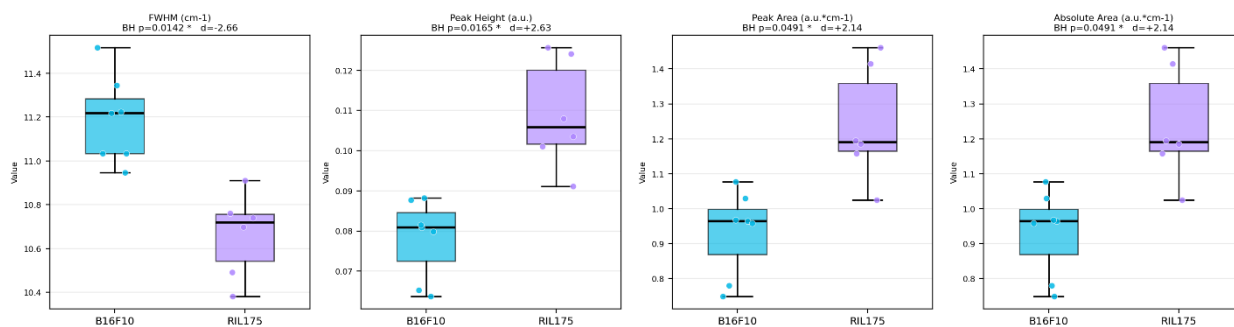


Рис. 3.3.9. Спектральні характеристики піку 1449 cm⁻¹ для груп B16F10 та RIL175

*– різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Смуга при 1455 cm⁻¹ відноситься до деформаційних коливань CH₂ ацильних ланцюгів ліпідів та асиметричних деформаційних коливань CH₃ білків [5]. В моделі меланоми порівняно з моделлю карциноми спостерігається суттєве збільшення ширини на піввисоті при одночасному зниженні висоти, площі та абсолютної площі піка. Гепатоцелюлярна карцинома часто асоціюється зі значними порушеннями ліпідного обміну, що характеризуються посиленням накопиченням ліпідів [81].

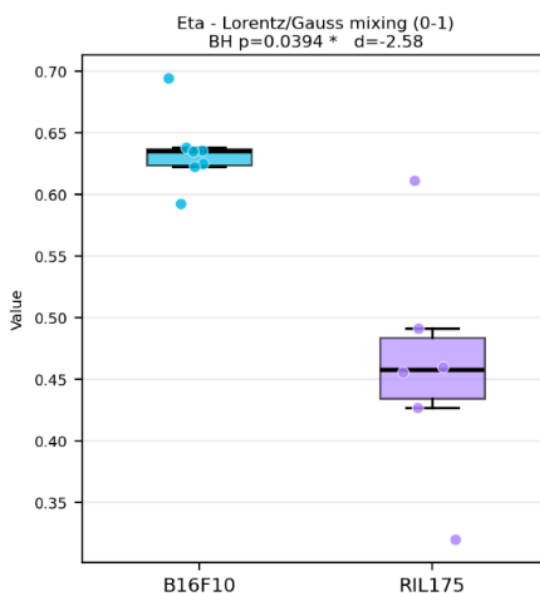


Рис. 3.3.10. Спектральні характеристики піку 1367 cm⁻¹ для груп B16F10 та RIL175

*– різниця статистично значуща за $p < 0,05$

На довжині хвилі 1367 см^{-1} можемо прослідкувати розтягнення C-O, деформацію C-H та N-H [5]. Клітини метастатичного раку мають підвищену плинність мембран та вищий ступінь ненасиченості ліпідів порівняно з їхніми неметастатичними аналогами, що сприяє рухливості клітин та інвазії, що виражено у B10F16. Тим часом для клітин RIL175 характерна Лоренцова форма, ліпідні та білкові структури мають значно жорсткішу просторову архітектуру, що обмежує їхній тепловий рух і зумовлює формування статичного Гаусового контуру.

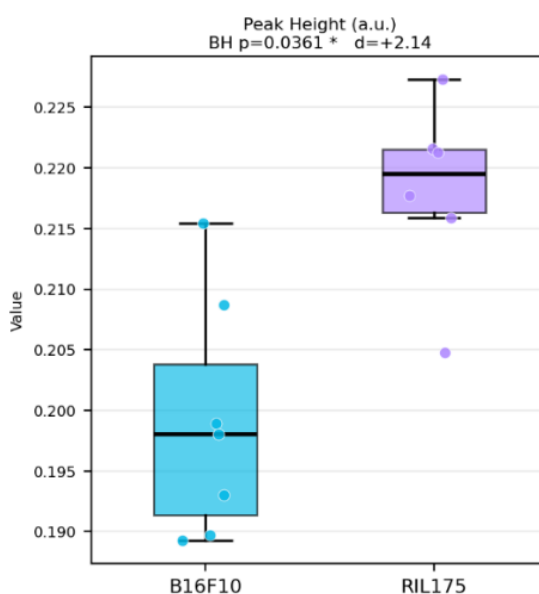


Рис. 3.3.11. Спектральні характеристики піку 1230 см^{-1} для груп B16F10 та RIL175

* – різниця статистично значуща за $p < 0,05$

Смуга при $\sim 1230\text{ см}^{-1}$ пов'язана з асиметричними коливаннями розтягування фосфодіестерних (PO_2^-) груп, які переважно розташовані в основній ланцюзі нуклеїнових кислот (ДНК і РНК) [5]. Відмінності в інтенсивності смуг нуклеїнових кислот зазвичай пов'язані зі змінами співвідношення ядра до цитоплазми та загальною транскрипційною активністю клітин. Під час канцерогенезу печінки ступінь поліплоїдії часто зростає, що призводить до сильно збільшених ядер з примноженим вмістом

ДНК. Значну частину цитоплазматичного простору меланоми займають внутрішньоклітинні органели – меланосоми. Забезпечення метастатичної міграції вимагає формування потужної мережі актинового цитоскелета, що суттєво збільшує загальний об'єм цитоплазми та білкову масу клітини. Збільшення цитоплазми компартмента призводить до відносного зменшення ядерно-цитоплазматичного співвідношення [81].

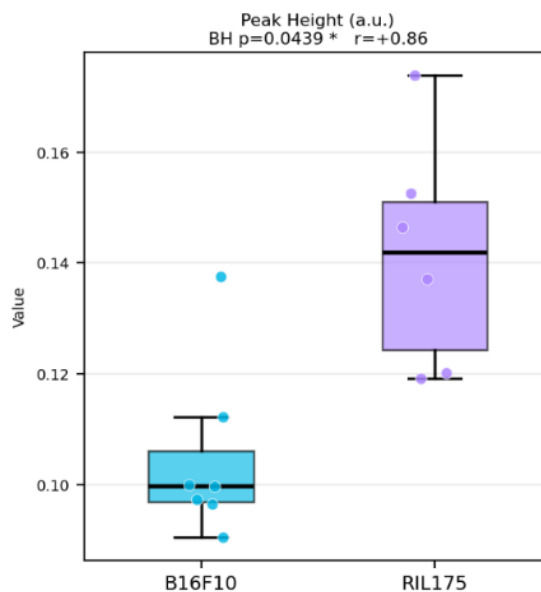


Рис.3.3.12. Спектральні характеристики піку 1153 cm^{-1} для груп B16F10 та RIL175

* – різниця статистично значуща за $p < 0,05$

При 1153 cm^{-1} можна оцінити розтягувальні коливання водневих зв'язків груп С–О притаманні вуглеводам, точніше глікогену [5]. Накопичення глікогену є морфологічною та метаболічною ознакою гепатоцелюлярної карциноми [81]. Меланома ж активно розщеплює глюкозу аби швидко отримувати енергію для проліферації та міграції.

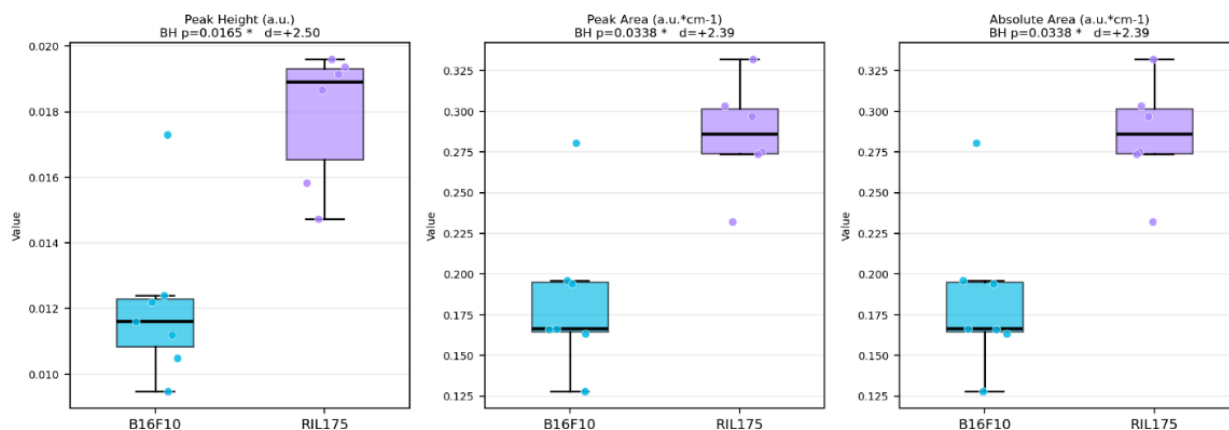


Рис.3.3.13. Спектральні характеристики піку 920 cm^{-1} для груп B16F10 та RIL175

* – різниця статистично значуща за $p < 0,05$

920 cm^{-1} – так само відповідає зв'язку C–H у вуглеводах. Характерне збільшення поглинання свідчить про інтенсивніший синтез вуглеводних попередників РНК в тканинах моделі карциноми.

3.4. Оцінка біохімічних та молекулярно-біологічних змін в тканинах печінки при лікуванні

У попарному порівнянні Групи 1 з іншими групами статистично значущих відмінностей після корекції на множинні порівняння не виявлено.

Під час порівняння Групи 1 і Групи 2 (61 спільний пік) за некоригованими значеннями ($p < 0,05$) виявлено відмінності за висотою піків при 1067 і 919 cm^{-1} , обидва вищі у Групі 2, однак після поправки Бенджаміні-Хохберга значущість не зберігалася.

У парі Група 1 та Група 3 (59 спільних піків) відзначено лише тенденцію до збільшення ширини на піввисоті (FWHM) піка 1332 cm^{-1} у Групі 1, яка не досягла значущості після FDR-корекції.

Порівняння Групи 1 і Групи 4 (59 спільних піків) показало за некоригованими даними відмінності для піка 936 cm^{-1} (висота і площа вищі у

Групі 1) та піка 1486 см^{-1} (площа і абсолютна площа вищі у Групі 4), після корекції значущі відмінності були відсутні.

Найбільшу кількість відмінностей за некоригованими значеннями виявлено при порівнянні Групи 1 і Групи 5 (61 спільний пік): за параметром η – для піків 1455 , 1491 і 1608 см^{-1} (вищі у Групі 1), за FWHM – для 1317 см^{-1} (вищий у Групі 1) і 1200 см^{-1} (вищий у Групі 5). за висотою (1337 см^{-1}) і площею (1384 см^{-1}) – вищі у Групі 5. Загалом виявлено 8 відмінностей при $p < 0,05$, однак жодна не зберігала значущості після поправки Бенджаміні–Хохберга.

У порівнянні Групи 1 і Групи 6 (54 спільні піки) виявлено єдину тенденцію: підвищення висоти піка 1544 см^{-1} у Групі 6 ($p < 0,05$), яка не підтвердилася після FDR-корекції.

Таким чином, у жодному з проведених попарних порівнянь жоден пік не досяг статистичної значущості після поправки Бенджаміні–Хохберга ($BH\ p < 0,05$).

ВИСНОВКИ

Проведене дослідження продемонструвало високу інформативність та універсальність FTIR-ATR-спектроскопії як для вивчення фундаментальних молекулярно-біологічних процесів, так і для проведення прикладних аналізів, зокрема оцінки біохімічних та молекулярно-біологічних змін в тканинах печінки при лікуванні.

1. Відпрацьовано методологію пробопідготовки, отримання та реєстрації інфрачервоних спектрів гомогенатів біологічних тканин.

2. Розроблено та оптимізовано алгоритм математичної і статистичної обробки спектральних даних, що забезпечує високу точність локалізації та аналізу маркерних піків.

3. Проведено порівняльний аналіз спектрів тканин печінки дослідних груп з контролем та між собою. Метод дозволив ідентифікувати специфічні характеристики тканин печінки для моделей меланоми та гепатоцелюлярної карциноми у порівнянні з контролем та між собою.

4. Спектральний аналіз не показав біохімічних та молекулярно-біологічних зрушень в тканинах печінки за умов лікування досліджуваними препаратами («Сполука 1», «Сполука 2», Атезоліумаб, Ніволумаб, SG-094).

5. Опановано сучасні методи створення моделей онкологічних захворювань. Здобуто практичні навички роботи зі спеціалізованим програмним забезпеченням (OMNIC, OMNIC Specta, TQ Analyst) та створення власних скриптів мовою Python для аналізу спектрів.

6. Відпрацьовано методологію пробопідготовки, отримання та реєстрації інфрачервоних спектрів гомогенатів біологічних тканин. Розроблено та оптимізовано алгоритм математичної і статистичної обробки спектральних даних, що забезпечує високу точність локалізації та аналізу маркерних піків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Brachtel, E. and Yagi, Y. (2012). Digital imaging in pathology: Current applications and challenges. *Journal of Biophotonics*, 5(4), pp. 327–335.
2. Pang, N., Yang, W., Yang, G., Yang, C., Tong, K., Yu, R. and Jiang, F. (2024). The utilization of blood serum ATR-FTIR spectroscopy for the identification of gastric cancer. *Discover Oncology*, [online] 15(1), p. 350. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12672-024-01231-6> [Accessed 11 May 2026].
3. Ashraf, G. M., Greig, N. H., Khan, T. A., Hassan, I., Tabrez, S., Shakil, S., Sheikh, I. A., Zaidi, S. K., Akram, M., Jabir, N. R., Firoz, C. K., Naeem, A., Alhazza, I. M., Damanhour, G. A. and Kamal, M. A. (2014). Protein misfolding and aggregation in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 13(7), pp. 1280–1293.
4. Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., Gardner, P. and Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols*, 9(8), pp. 1771–1791.
5. Movasaghi, Z., Rehman, S. and ur Rehman, I. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), pp. 134–179.
6. Magalhães, S., Goodfellow, B. J. and Nunes, A. (2021). FTIR spectroscopy in biomedical research: how to get the most out of its potential. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(8–10), pp. 869–907.
7. Pan, T., Huang, W. J. and Yin, H. (2012). FTIR/ATR Spectroscopy with Stability for Determination of HGB in Human Whole Blood. *Advanced Materials Research*, 468–471, pp. 163–166.
8. Crocco, M. C., Moyano, M. F. H., Annesi, F., Bruno, R., Pirritano, D., Del Giudice, F., Condino, F. and Guzzi, R. (2023). ATR-FTIR spectroscopy of plasma supported

- by multivariate analysis discriminates multiple sclerosis disease. *Scientific Reports*, [online] Volume 13, p. 2565. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29804-0> [Accessed 11 May 2026].
9. Béjar-Grimalt, J., Sánchez-Illana, Á., de la Guardia, M., Garrigues, S., Catalá-Vilaplana, I., Bermejo-Ruiz, J. L., Priego-Quesada, J. I. and Pérez-Guaita, D. (2024). Dryfilm-ATR-FTIR analysis of urinary profiles as a point-of-care tool to evaluate aerobic exercise. *Analytical Methods*, 16(35), pp. 5982–5989.
 10. Mahdavinejad, A., Shadnia, S., Farhadinejad, K., Farnam, G., Arefi, S. and Shirazi, F. H. (2025). Rapid diagnosis of alprazolam poisoning by Fourier transform infrared spectroscopy on saliva samples. *Scientific Reports*, [online] 15(1), p. 292. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-15188-1> [Accessed 11 May 2026].
 11. Nagase, Y., Yoshida, S. and Kamiyama, K. (2005). Analysis of human tear fluid by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biopolymers*, 79(1), pp. 18–27.
 12. Untereiner, V., Dhruvananda Sockalingum, G., Garnotel, R., Gobinet, C., Ramaholimihaso, F., Ehrhard, F., Diebold, M.-D. and Thiéfin, G. (2014). Bile analysis using high-throughput FTIR spectroscopy for the diagnosis of malignant biliary strictures: a pilot study in 57 patients. *Journal of Biophotonics*, 7(3–4), pp. 241–253.
 13. Xie, L., Wang, N., Yin, Q., Zhang, X., Chen, L., Hao, C., Liu, T., Wang, S., Duan, J., Du, K., Haque, M. D. and Shen, X. (2024). Rapid monitoring of T-lymphocyte CD4+/CD8+ ratio in patient immune management by infrared spectroscopy of whole leukocytes. *Microchemical Journal*, 204, p. 111–135.
 14. Mata-Miranda, M. M., Vazquez-Zapien, G. J., Rojas-Lopez, M., Sanchez-Monroy, V., Perez-Ishiwara, D. G. and Delgado-Macuill, R. J. (2017). Morphological, molecular and FTIR spectroscopic analysis during the differentiation of kidney cells from pluripotent stem cells. *Biological Research*, [online] 50, pp. 11–12. Available at: <http://doi.org/10.1186/s40659-017-0119-6> [Accessed 11 May 2026].

15. Rosdi, M., Md Jelas, N., Jusoh, B., Padlan, N., Salin, N., Amanah, A., Khawory, M. and Mohd Abd Razak, M. (2026). In vitro antiviral potential of Syzygium species extracts against dengue virus serotype 2. *Biomedicines*, 14(6), 1354.
16. Tomar, D., Kaur, H., Kaur, H., Rana, B., Talegaonkar, K., Maharana, V. and Jena, K. C. (2019). ATR-FTIR Spectroscopy and Its Relevance to Probe the Molecular-Level Interactions Between Amino Acids and Metal-Oxide Nanoparticles at Solid/Aqueous Interface. In: *Advances in Spectroscopy: Molecules to Materials*. Singapore: Springer. pp. 3–21.
17. Kaur, H., Rana, B., Tomar, D., Kaur, S. and Jena, K. C. (2021). Fundamentals of ATR-FTIR spectroscopy and its role for probing in-situ molecular-level interactions. In: *Modern techniques of spectroscopy*. Singapore: Springer Nature Singapore. pp. 3–37.
18. Kazarian, S. G. and Chan, K. L. A. (2013). ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. *The Analyst*, 138(7), pp. 3–48.
19. Averett, L. A., Griffiths, P. R. and Nishikida, K. (2008). Effective path length in attenuated total reflection spectroscopy. *Analytical chemistry*, 80(8), pp. 45–49.
20. Berthomieu, C. and Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis research*, 101(2–3), pp. 157–170.
21. Steiner, G. and Koch, E. (2009). Trends in Fourier transform infrared spectroscopic imaging. *Anal Bioanal Chem*, 394(3), pp. 671–678.
22. Wang, T. D., Triadafilopoulos, G., Crawford, J. M., Dixon, L. R., Bhandari, T., Sahbaie, P., Friedland, S., Soetikno, R. and Contag, C. H. (2007). Detection of endogenous biomolecules in Barrett's esophagus by Fourier transform infrared spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [online] 104(40), pp. 15864–15869. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0707587104> [Accessed 11 May 2026].
23. Tiernan, H., Byrne, B. and Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta*

- Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, [online] 241, p. 118636. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118636> [Accessed 11 May 2026].
24. Tamm, L. K. and Tatulian, S. A. (1997). Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Quarterly reviews of biophysics*, 30(4), pp. 365–429.
 25. Gross, P. C. and Zeppezauer, M. (2010). Infrared Spectroscopy for Biopharmaceutical Protein Analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 53(1), pp. 29–36.
 26. Tatulian, S. A. (2013). Structural characterization of membrane proteins and peptides by FTIR and ATR-FTIR spectroscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 974, pp. 177–218.
 27. Tintor, Đ., Ninković, K., Milošević, J. and Polović, N. Đ. (2024). Gaining insight into protein structure via ATR-FTIR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, [online] 134, p. 103726. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2024.103726> [Accessed 11 May 2026].
 28. Kaneko, F., Katagiri, C., Sazaki, G. and Nagashima, K. (2018). ATR FTIR Spectroscopic Study on Insect Body Surface Lipids Rich in Methylene-Interrupted Diene. *The Journal of Physical Chemistry B*, [online] 122(51), pp. 12322–12330. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b08705> [Accessed 11 May 2026].
 29. Portaccio, M., Faramarzi, B. and Lepore, M. (2023). Probing Biochemical Differences in Lipid Components of Human Cells by Means of ATR-FTIR Spectroscopy. *Biophysica*, [online] 3(3), pp. 524–538. Available at: <https://doi.org/10.3390/biophysica3030038> [Accessed 11 May 2026].
 30. Pachetti, M., Zupin, L., Venturin, I., Mitri, E., Boscolo, R., D'amico, F., Vaccari, L., Crovella, S., Ricci, G. and Pascolo, L. (2020). FTIR Spectroscopy to Reveal Lipid and Protein Changes Induced on Sperm by Capacitation: Bases for an Improvement of Sample Selection in ART. *Int. J. Mol. Sci.*, [online] 21(22), pp. 4–5. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21228536> [Accessed 11 May 2026].
 31. Laugel, C., Yagoubi, N. and Baillet, A. (2005). ATR-FTIR spectroscopy: a chemometric approach for studying the lipid organisation of the stratum corneum. *Chemistry and physics of lipids*, 135(1), pp. 55–68.

32. Banyay, M., Sarkar, M. and Gräslund, A. (2003). A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophysical Chemistry*, 104(2), pp. 477–488.
33. Han, Y., Han, L., Yao, Y., Li, Y. and Liu, X. (2018). Key factors in FTIR spectroscopic analysis of DNA: the sampling technique, pretreatment temperature and sample concentration. *Anal Methods*, 10(21), pp. 2436–2443.
34. Heidari, A. (2016). An Analytical and Computational Infrared Spectroscopic Review of Vibrational Modes in Nucleic Acids. *Austin J Anal Pharm Chem*, [online] 3(1), p. 1058. Available at: <https://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v3-id1058.php> [Accessed 11 May 2026].
35. Sarić, A., Rajić, J., Tolić, A., Dučić, T. and Vidaković, M. (2023). Synchrotron-based FTIR microspectroscopy reveals DNA methylation profile in DNA-HALO structure. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, [online] 302, p. 123090. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123090> [Accessed 11 May 2026].
36. Guo, Q., Ai, L. and Cui, S. W. (2018). Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for Carbohydrate Analysis. In: *Methodology for Structural Analysis of Polysaccharides*. Cham: Springer. pp. 69–71.
37. Mayers, J. J., Flynn, K. J. and Shields, R. J. (2013). Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Bioresource technology*, 148, pp. 215–220.
38. Hu, J., Ma, X., Liu, L., Wu, Y. and Ouyang, J. (2017). Rapid Evaluation of the Quality of Chestnuts Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Food Chem*, 231, pp. 141–147.
39. Blum, M.-M. and John, H. (2012). Historical perspective and modern applications of Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR). *Drug Testing and Analysis*, 4, p. 298.
40. Lasch, P. (2012). Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 117, pp. 100–114.

41. Shi, T., Liu, H., Chen, Y., Fei, T., Wang, J. and Wu, G. (2017). Spectroscopic Diagnosis of Arsenic Contamination in Agricultural Soils. *Sensors (Basel, Switzerland)*, [online] 17(5), p. 1036. Available at: <https://doi.org/10.3390/s17051036> [Accessed 11 May 2026].
42. Shen, X., Xu, L., Ye, S., Hu, R., Jin, L., Xu, H. and Liu, W. (2018). Automatic baseline correction method for the open-path Fourier transform infrared spectra by using simple iterative averaging. *Opt. Express*, 26, pp. A609–A614.
43. Fatima, U., Sharma, S. and Guptasarma, P. (2010). Structures of Differently Aggregated and Precipitated Forms of gamma B Crystallin: An FTIR Spectroscopic and EM Study. *Protein & Peptide Letters*, 17(9), pp. 1155–1162.
44. Kohler, A., Zimonja, M., Segtnan, V. and Martens, H. (2009). Standard normal variate, multiplicative signal correction and extended multiplicative signal correction preprocessing in biospectroscopy. In: *Comprehensive Chemometrics*. Amsterdam: Elsevier.
45. Zhang, Z., Shang, H., Wang, H., Zhang, Q., Yu, S., Wu, Q. and Tian, J. (2019). Hyperspectral Imaging for the Nondestructive Quality Assessment of the Firmness of Nanguo Pears Under Different Freezing/Thawing Conditions. *Sensors (Basel, Switzerland)*, [online] 19(14), p. 3124. Available at: <https://doi.org/10.3390/s19143124> [Accessed 11 May 2026].
46. Manfredi, M., Robotti, E., Quasso, F., Mazzucco, E., Calabrese, G. and Marengo, E. (2018). Fast classification of hazelnut cultivars through portable infrared spectroscopy and chemometrics. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 189, pp. 427–435.
47. Mishra, P., Marini, F., Biancolillo, A. and Roger, J. M. (2021). Improved prediction of fuel properties with near-infrared spectroscopy using a complementary sequential fusion of scatter correction techniques. *Talanta*, 223(Part 1), pp. 9–10.
48. Greenacre, M., Groenen, P. J. F., Hastie, T., Iodice D'Enza, A., Markos, A. and Tuzhilina, E. (2022). Principal component analysis. *Nat Rev Methods Primers*, [online] 2, p. 100. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00184-w> [Accessed 11 May 2026].

49. Ivoisev, G., Burton, L. and Bonner, R. (2008). Dimensionality Reduction and Visualization in Principal Component Analysis. *Analytical Chemistry*, 80(13), pp. 7–10.
50. Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K. and Narasimhan, G. (2020). So you think you can PLS-DA? *BMC bioinformatics*, [online] 21(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3310-7> [Accessed 11 May 2026].
51. Firmani, P., De Luca, S., Bucci, R., Marini, F. and Biancolillo, A. (2019). Near infrared (NIR) spectroscopy-based classification for the authentication of Darjeeling black tea. *Food Control*, 100, pp. 292–299.
52. Brereton, R. G. (2015). The Mahalanobis Distance and Its Relationship to Principal Component Scores. *J. Chemometrics*, 29, pp. 143–145.
53. De Maesschalck, R., Jouan-Rimbaud, D. and Massart, D. L. (2000). The Mahalanobis distance. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 50(1), pp. 1–18.
54. Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E. et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, pp. 520–562.
55. Brown, S. D. M. and Hancock, J. M. (2006). The mouse genome. In: J.-N. Volff, ed. *Vertebrate Genomes*. Basel: Karger. pp. 33–45.
56. Kersten, K., de Visser, K. E., van Miltenburg, M. H. and Jonkers, J. (2017). Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol Med*, 9, pp. 137–153.
57. Xu, C., Li, X., Liu, P., Li, M. and Luo, F. (2019). Patient-derived xenograft mouse models: A high fidelity tool for individualized medicine. *Oncology letters*, 17(1), pp. 3–10.
58. Zhou, J., Sun, L., Han, X., Zhao, S., Sun, L., Cheng, X., Zhang, W., Chen, S., Wang, H. and Zhang, J. (2025). High-performance microalgae-based biophotoelectrochemical cells: Mechanism, optimization, and applications. *Journal of Magnesium and Alloys*, 13(1), pp. 1–18.
59. Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., Budinská, E., Byrne, A. T., Caldas, C., Clarke, R. B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G. M., Roman-Roman, S.,

- Seoane, J., Trusolino, L. and Villanueva, A. (2014). Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer discovery*, 4(9), pp. 998–1013.
60. Abel, E. L., Angel, J. M., Kiguchi, K. and DiGiovanni, J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nature protocols*, 4(9), pp. 1350–1362.
 61. Chung, S., Lim, G. J. and Lee, J. Y. (2019). Quantitative analysis of melanin content in a three-dimensional melanoma cell culture. *Sci Rep*, [online] 9, p. 3. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37055-y> [Accessed 11 May 2026].
 62. Sun, X., Watanabe, T., Oda, Y., Shen, W., Ahmad, A., Ouda, R., de Figueiredo, P., Kitamura, H., Tanaka, S. and Kobayashi, K. S. (2024). Targeted demethylation and activation of NLRC5 augment cancer immunogenicity through MHC class I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [online] 121(6), p. 13. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2310821121> [Accessed 11 May 2026].
 63. Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H. and Allison, J. P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), pp. 4275–4280.
 64. Wistuba, I. I., Woodman, S. E. and Peng, W. (2018). Increased Tumor Glycolysis Characterizes Immune Resistance to Adoptive T Cell Therapy. *Cell metabolism*, 27(5), pp. 977–987.
 65. Kapanadze, T., Gamrekelashvili, J., Ma, C., Chan, C., Zhao, F., Hewitt, S., Zender, L., Kapoor, V., Felsher, D. W., Manns, M. P., Korangy, F. and Greten, T. F. (2013). Regulation of accumulation and function of myeloid derived suppressor cells in different murine models of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 59(5), pp. 1007–1013.
 66. Sokal, A., Wrzalik, R., Klimontko, J., Chrobak, E., Bębenek, E. and Kadela-Tomanek, M. (2023). 5,8-Quinolinedione Attached to Quinone Derivatives: XRD

- Diffraction, Fourier Transform Infrared Spectra and Computational Analysis. *Molbank*, [online] 2023(4), pp 1–12. Available at: <https://doi.org/10.3390/M1682> [Accessed 11 May 2026].
67. Bosman, A. J., Ross, G. M. S., Freitag, S., Sulyok, M., Krska, R., Salentijn, G. I. J. and Ruggeri, F. S. (2026). Selective paper-enhanced infrared spectroscopy for molecular detection of deoxynivalenol in wheat. *Food Chemistry*, [online] p. 149360. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.149360> [Accessed 11 May 2026].
 68. Gupta, B. S., Jelle, B. P. and Gao, T. (2015). Application of ATR-FTIR Spectroscopy to Compare the Cell Materials of Wood Decay Fungi with Wood Mould Fungi. *International Journal of Spectroscopy*, [online] 2015(1), p. 521938. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/521938> [Accessed 11 May 2026].
 69. Abbas, L. M. and Ahmed, G. A.-R. (2020). ATR-FTIR spectroscopy for discrimination of gelatin from different sources: a comparative study. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 11(4), pp. 135–144.
 70. Nurrulhidayah, A. F., Che Man, Y. B., Amin, I., Arieff Salleh, R., Farawahidah, M. Y., Shuhaimi, M. and Khatib, A. (2015). FTIR-ATR spectroscopy based metabolite fingerprinting as a direct determination of butter adulterated with lard. *International Journal of Food Properties*, 18(2), pp. 372–379.
 71. Sultan, M., Ibrahim, H., El-Masry, H. M. and Hassan, Y. R. (2024). Antimicrobial gelatin-based films with cinnamaldehyde and ZnO nanoparticles for sustainable food packaging. *Scientific Reports*, [online] 14(1), p. 22499. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73392-x> [Accessed 11 May 2026].
 72. D'Amelia, R. P., Gentile, S., Nirode, W. F. and Huang, L. (2016). Quantitative analysis of copolymers and blends of polyvinyl acetate (PVAc) using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and elemental analysis (EA). *World Journal of Chemical Education*, 4(2), pp. 25–31.
 73. Sadat, A. and Joye, I. J. (2020). Peak fitting applied to Fourier transform infrared and Raman spectroscopic analysis of proteins. *Applied Sciences*, [online] 10(17), p. 5918. Available at: <https://doi.org/10.3390/app10175918> [Accessed 11 May 2026].

74. Campanale, C., Savino, I., Massarelli, C. and Uricchio, V. F. (2023). Fourier transform infrared spectroscopy to assess the degree of alteration of artificially aged and environmentally weathered microplastics. *Polymers*, [online] 15(4), p. 911. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym15040911> [Accessed 11 May 2026].
75. Yan, Z. W., Li, Q. and Zhang, P. (2017). Soy protein isolate and glycerol hydrogen bonding using two-dimensional correlation (2D-COS) attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR FT-IR) spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 71(11), pp. 2437–2445.
76. De Meutter, J. and Goormaghtigh, E. (2021). Amino acid side chain contribution to protein FTIR spectra: impact on secondary structure evaluation. *European Biophysics Journal*, 50(3-4), pp. 641–651.
77. Varotsis, C., Papageorgiou, M., Tselios, C., Yiannakkos, K. A., Adamou, A. and Nicolaidis, A. (2020). Bacterial colonization on the surface of copper sulfide minerals probed by Fourier transform infrared micro-spectroscopy. *Crystals*, [online] 10(11), p. 1002. Available at: <https://doi.org/10.3390/cryst10111002> [Accessed 11 May 2026].
78. Piergies, N., Paluszkiwicz, C. and Kwiatek, W. M. (2019). Vibrational fingerprint of erlotinib: FTIR, RS, and DFT studies. *Journal of Spectroscopy*, [online] 2019, p. 9191328. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/9191328> [Accessed 11 May 2026].
79. Sarker, B., Papageorgiou, D. G., Silva, R., Zehnder, T., Gul-E-Noor, F., Bertmer, M., Kaschta, J., Chrissafis, K., Detsch, R. and Boccaccini, A. R. (2014). Fabrication of alginate-gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(11), pp. 1470–1482.
80. Bangaol, R., Santillan, A., Angeles, L. M., Abanilla, L., Lim, A. Jr., Ramos, M. C., Fellizar, A., Guevarra, L. Jr. and Albano, P. M. (2020). ATR-FTIR spectroscopy as adjunct method to the microscopic examination of hematoxylin and eosin-stained tissues in diagnosing lung cancer. *PLoS One*, [online] 15(5), p. e0233626.

Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233626>

[Accessed 11 May 2026].

81. Tu, D. Y., Peng, R., Jin, S. J., Su, B. B., Fan, S. S., Zhang, J. H., Wang, S. Y., Miao, Y. Y., Jiang, G. Q., Zhang, C., Cao, J. and Bai, D. S. (2025). MARCH8 suppresses hepatocellular carcinoma by promoting SREBP1 degradation and modulating fatty acid de novo synthesis. *Cell Death & Disease*, [online] 16(1), p. 391. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07391-w> [Accessed 11 May 2026].