

אוניברסיטת בן גוריון בנגב

הפקולטה למדעי הטבע

המחלקה לפיסיקה

שימוש בשיטות ספקטרוסקופיות באינפרא-אדום

(FTIR-MSP) למעקב אחר הטיפול במחלת

הלוקמיה בילדים

חיבור לשם קבלת תואר "מגיסטר" בפקולטה למדעי הטבע

מאת חן לוי

מרץ 2003

אדר תשס"ג

שימוש בשיטות ספקטרוסקופיות באינפרא-אדום

(FTIR-MSP) למעקב אחר הטיפול במחלת

הלוקמיה בילדים

חיבור לשם קבלת תואר "מגיסטר" בפקולטה למדעי הטבע

מאת חן לוי

שם המנחה: פרופ' שאול מרדכי

המחלקה לפיסיקה

הפקולטה למדעי הטבע

אוניברסיטת בן גוריון בנגב

_____ תאריך	_____ חתימת המחבר
_____ תאריך	_____ חתימת המנחה
_____ תאריך	_____ אישור יו"ר הועדה המחלקתית

הבעת תודה

בראש ובראשונה ברצוני להודות לפרופ' שאול מרדכי שהנחה אותי במחקר זה על ההנחיה המסורה, הסבלנות והתמיכה לאורך כל המחקר.

לפרופ' יוסי קפילושניק על שתוף הפעולה הפורה והעזרה.

לשלושת הילדים שנבדקו במחקר זה ולמשפחותיהם על שנתנו את הסכמתם להשתתפות במחקר, בברכת רפואה שלמה.

לד"ר מחמוד חליחל, ד"ר ויטלי ירוחימוביץ ומרינה טלישינסקי מהמכון למחקר ישומי

לצוות הרפואי במחלקה ההמוטואונקולוגית ילדים במרכז הרפואי סורוקה על שסיפקו את דגימות הדם.

לאגודה הישראלית למלחמה בסרטן עבור תמיכתם במחקר זה.

כמו כן, תודתי נתונה לכל חברי המעבדה לפיסיקה רפואית על האווירה הטובה ושיתוף הפעולה.

תוכן עניינים

7	1. תקציר
10	2. מבוא
10	2.1. רקע ביולוגי
10	2.1.1. רכיבי הדם
13	2.1.2. לוקמיה
15	2.2. רקע פיסיקלי
15	2.2.1. הספקטרום האלקטרומגנטי
16	2.2.2. אינטראקציה של גלים אלקטרומגנטיים עם חומר
22	2.2.3. עקרונות קוונטיים בסיסיים
28	2.2.4. ספקטרוסקופיה באינפרא אדום
30	2.2.5. ספקטרומטר FTIR-MSP
38	2.3. מחקרים קודמים בספקטרוסקופיה של הדם
40	3. ביצוע המחקר
40	3.1. הכנת הדוגמאות
40	3.1.1. לקיחת הדוגמאות הביולוגיות
40	3.1.2. תהליך הפרדת הדם למרכיביו
41	3.1.3. הכנת הדוגמאות ומדידתן
42	3.2. ביצוע המדידות וניתוח ראשוני של התוצאות
44	3.2.1. תיקון קו הבסיס

45	נרמול	3.2.2
46	אנליזות נוספות	3.2.3
49	תוצאות	4
49	ספירת התאים הסרטניים	4.1
50	מיקרוספקטרוסקופיה ב – FTIR	4.2
51	חולה לוקמיה מסוג B	4.2.1
51	חולה לוקמיה מסוג T1	4.2.2
52	חולה לוקמיה מסוג T2	4.2.3
57	סמנים ביולוגיים	4.3
64	Cluster Analysis	4.4
64	חולה לוקמיה מסוג B	4.4.1
65	חולה לוקמיה מסוג T1	4.4.2
65	חולה לוקמיה מסוג T2	4.4.3
70	דיון בתוצאות	5
76	מסקנות	6
77	פרסומים מדעיים שהתקבלו ממחקר זה	7
78	נספח I – רשימת קיצורים	8
79	נספח II – המבנה המולקולרי והספקטרה של התרופות הכימותרפיות העיקריות	9
82	נספח III – השוואת קווי הבליעה העיקריים בין סוגי סרטן שונים	10
84	ביבליוגרפיה	11

רשימת גרפים

- גרף 2.1 – הספקטרום האלקטרומגנטי 15
- שרטוט 2.2 – (a) פיזור רמאן סטוקס (b) פיזור רמאן אנטי-סטוקס 19
- גרף 2.3 – אופני הויברציה של מולקולה ליניארית (CO_2) ומולקולה לא ליניארית (H_2O)
..... 28
- תמונה 2.4 – ספקטרומטר FTIR-MSP מדגם EQUINOX 55/S של חברת Bruker .. 31
- שרטוט 2.5 – תאור סכמתי של הספקטרומטר FTIR-MSP 32
- גרף 2.6 – ספקטרום פליטה אופייני של מנורת Globar והשוואה למקורות אחרים)
(Hg-Arc, Tungsten, Xe-Arc) 33
- שרטוט 2.7 – תאור סכמתי של האינטרפרומטר של מיכלסון 35
- גרף 2.8 – אינטרפרוגרמה המייצגת את עוצמת האור הנמדדת בגלאי כפונקציה של מיקום
המראה הניידת 36
- גרף 2.9 – ספקטרום ההעברה המתקבל לאחר ביצוע טרנספורם פורייה על האינטרפרוגרמה
המוצגת בגרף 2.8 38
- שרטוט 3.1 – תאור סכמתי של שכבות מרכיבי הדם המתקבלות במבחנה לאחר צנטריפוגציה
ב – 300g לחצי שעה 41
- גרף 3.2 – ספקטרום העברה של מדידת הרקע ומדידת הדוגמא 43
- גרף 3.3 – הספקטרום המתקבל לאחר חלוקת ספקטרום הדוגמא בספקטרום הרקע 43
- גרף 3.4 – ספקטרום בליעה לפני תיקון קו הבסיס ואחרי התיקון 45

גרף 3.5 – דנדוגרמה המייצגת את תוצאות חישוב ה- Cluster analysis בשיטת השונות

המינימלית של Ward 48

גרף 4.1 – אחוז התאים הסרטניים בדם כפונקציה של ימי הטיפול 49

גרף 4.2 – (a) ספקטרה עבור חולה לוקמיה מסוג B לפני הטיפול הכימותרפי אחרי שני ימי

טיפול ואחרי שבוע (b) הנגזרת השניה של הספקטרה עבור יום אפס ויום 7 53

גרף 4.3 – (a) ספקטרה עבור חולה לוקמיה מסוג T (T1) לפני הטיפול הכימותרפי אחרי

יום טיפול ואחרי שלושה ימי טיפול (b) הנגזרת השניה של הספקטרה עבור יום אפס

ויום 3 54

גרף 4.4 – (a) ספקטרה עבור חולה לוקמיה מסוג T (T2) לפני הטיפול הכימותרפי אחרי יום

טיפול ואחרי שבוע (b) הנגזרת השניה של הספקטרה עבור יום אפס ויום 7 55

גרף 4.5 – ספקטרה עבור (a) חולה B – ימים: 0, 2 - 7 (b) חולה T1 – ימים: 0, 1 - 3

(c) חולה T2 – ימים: 0, 1 - 7 56

גרף 4.6 – עוצמת קו הבליעה ב- 1084cm^{-1} המייצגת את רמת הפוספטים בדוגמא (a)

חולה הלוקמיה מסוג B (b) חולה הלוקמיה מסוג T (T1) (c) חולה הלוקמיה מסוג T

(T2) 60

גרף 4.7 – יחס קווי הבליעה $1045/1545\text{cm}^{-1}$ המייצג את רמת הפחמימות בדוגמא (a)

חולה הלוקמיה מסוג B (b) חולה הלוקמיה מסוג T (T1) (c) חולה הלוקמיה מסוג T

(T2) 61

גרף 4.8 - יחס קווי הבליעה $1121/1020\text{cm}^{-1}$ המייצג את היחס RNA/DNA בדוגמא (a)

חולה הלוקמיה מסוג B (b) חולה הלוקמיה מסוג T (T1) (c) חולה הלוקמיה מסוג T

62.....(T2)

גרף 4.9 – יחס האינטגרציות של קווי הבליעה (אמיד II) / (אמיד I) (a) חולה הלוקמיה

מסוג B (b) חולה הלוקמיה מסוג T (T1) (c) חולה הלוקמיה מסוג T (T2) 63

גרף 4.10 – דנדוגרמות שהתקבלו מחישובי Cluster Analysis על הספקטרה של חולה

הלוקמיה מסוג B. (a) $1000-1150\text{cm}^{-1}$ (b) $1180-1300\text{cm}^{-1}$ (c) $1000-$

67..... 1300cm^{-1}

גרף 4.11 – דנדוגרמות שהתקבלו מחישובי Cluster Analysis על הספקטרה של החולה

הראשון בלוקמיה מסוג T (1T). (a) $1000-1150\text{cm}^{-1}$ (b) $1180-1300\text{cm}^{-1}$ (c)

68..... $2800-3000\text{cm}^{-1}$

גרף 4.12 – דנדוגרמות שהתקבלו מחישובי Cluster Analysis על הספקטרה של החולה

השני בלוקמיה מסוג T (T2). (a) $1000-1150\text{cm}^{-1}$ (b) $1180-1300\text{cm}^{-1}$ (c)

69..... $1000-1300\text{cm}^{-1}$

גרף 9.1 – (a) המבנה הכימי של Cyclophosphamide (b) ספקטרום הבליעה של

80..... $900-1800\text{cm}^{-1}$ Cyclophosphamide בתחום

גרף 9.2 – (a) המבנה הכימי של Doxorubicin (b) ספקטרום הבליעה של Doxorubicin

81..... $900-1800\text{cm}^{-1}$ בתחום

רשימת טבלאות

- טבלה 2.1 – רכיבי הדם השונים ותפקידם הביולוגי 10
- טבלה 2.2 – סוגי תאי הדם הלבנים 12
- טבלה 2.3 – סוגי הקרינה האלקטרומגנטית וצורת הבליעה שלהן בחומר 17
- טבלה 2.4 – מספר דוגמאות של קשרים ביוכימיים וחלק מתדירויות הבליעה האופייניות שלהם 29
- טבלה 10.1 – קווי הבליעה הבולטים בהם נתגלו ההבדלים המשמעותיים ביותר בין דוגמאות סרטניות לדוגמאות בריאות על פי סוג הסרטן 83

שימוש בשיטות ספקטרוסקופיות באינפרא-אדום (FTIR-MSP) למעקב

אחר הטיפול במחלת הלוקמיה בילדים

מאת חן לוי

עבודת גמר לשם קבלת התואר "מגיסטר" בפקולטה למדעי הטבע

אוניברסיטת בן-גוריון

מרץ 2003

1. תקציר

Fourier Transform Infrared (FTIR) הינו ספקטרומטר אינפרא-אדום המבוסס על האינטרפרומטר של מיכלסון. על ידי הקרנת פס תדרים רחב בתחום האינפרא-אדום ניתן לקבל אינטרפרוגרמה המייצגת את עוצמת האות (של סך כל התדרים) המתקבל בגלאי כפונקציה של הפרש הדרכים האופטיות באינטרפרומטר. לאחר מכן ניתן להשתמש בטרנספורם פורייה על מנת לעבור ממרחב המיקום למרחב התדר ולקבל ספקטרום המייצג את עוצמת האות הנקלט כפונקציה של מספר הגל (wavenumber). FTIR-MSP הינו מכשיר FTIR חדיש המצויד במיקרוסקופ אינפרא-אדום, דבר המאפשר מדידת ספקטרום בליעה או החזרה של **דוגמאות מיקרוסקופיות**. ספקטרומטר מסוג זה מאפשר שימושים רבים בתחום הרפואה שקודם היו בלתי אפשריים.

לוקמיה לימפובלסטית חריפה (ALL) הנה מחלה שמתבטאת בהתרבות בלתי מבוקרת של כדוריות דם לבנות שמקורם במח העצם, מחלה זו הנה אחת השכיחות בין מחלות הסרטן בילדים.

מחקר זה התבצע על ידי איסוף דגימות דם מילדים חולי לוקמיה לפני הטיפול הכימותרפי ובמהלכו, והפקה של לימפוציטים מדגימות הדם, מיקום הלימפוציטים על משטח ZnSe, יבוש הדוגמא ומדידת הדוגמא ב – FTIR-MSP. מתוך מדידות אלו קיבלנו את ספקטרום הבליעה של הלימפוציטים בתחום האינפרא-אדום. דגימות הדם נלקחו על ידי הצוות הרפואי, מהמחלקה ההמטולוגית אונקולוגית ילדים בבית החולים האוניברסיטאי סרוקה, אשר היו שותפים למחקר זה.

מאחר וקשרים מולקולריים בולעים רק תדרים ספציפיים של קרינה אלקטרומגנטית בתחום האינפרא-אדום, בהתאם לרמות האנרגיה הויברציוניות שלהם, ניתן לשייך את תדרי הבליעה לקשרים מולקולריים ומכאן למולקולות המרכיבות את התאים. הספקטרום שנמדד הוא בתחום $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ והוא עשיר בתוצאות לגבי המרכיבים הביוכימיים בתאי הדם (נורמליים וסרטניים).

לאחר איסוף הספקטרה (עבור כל יום בזמן מתן הטיפול הכימותרפי), בצענו אנליזה ספקטרלית של התוצאות של ילדים חולים תוך השוואתם לתוצאות שנלקחו מילדים בריאים כקבוצת ביקורת. כמו כן בדקנו את השינויים הביוכימיים בהרכב התאים כפונקציה של ימי הטיפול הכימותרפי שניתן על ידי הצוות הרפואי.

תוצאות המחקר מראות שאכן קיים שינוי רב ברמת הפוספטים של התאים ורמת הפחמימות בתאים כתוצאה מהטיפול הכימותרפי. שינויים אלו נבדקו והתבצעה השוואה בין שיטה זו

לבין השיטות המקובלות כיום ברפואה כגון cell count (ספירת אחוז התאים הממאירים על ידי צביעת התאים הבזופילים (basophils) וספירה ויזואלית של מספר התאים הבריאים ומספר התאים הממאירים למיקרוליטר), flow cell cytometry (אפיון התאים על פי עוצמת הריאקציה הציטוכימית שלהם עם אנזימים (למשל peroxidase)) ומורפולוגיה (אפיון והבחנה של תאי הדם על פי גודלם, צורתם וצורת גרעין התא).

מטרת המחקר היא פיתוח שיטות אופטיות שיהיו לעזר במעקב אחר הטיפול הכימותרפי במחלת הלוקמיה בילדים. כאמור כיום המעקב אחר הטיפול נעשה בעזרת שיטות ספירה של התאים הממאירים (blasts). היתרון בשימוש בשיטות אופטיות הוא בכך שניתן לבצע מעקב ברמה המולקולרית (במקום ברמה התאית) אחר המחלה, דבר שעשוי לתרום להבנה טובה יותר של התהליכים הפיסיקליים והביומולקולריים המתחוללים בתאים הסרטניים במהלך הטיפול הכימותרפי.

מחקרים קודמים בעזרת ספקטרוסקופיה באינפרא אדום (FTIR) שבוצעו בנושא (1,2) הציגו תוצאות טובות המאפשרות להבדיל בין התאים הסרטניים לתאים בריאים בשיטות מתמטיות שונות (כגון אינטגרציה או Cluster analysis), אולם מחקר זה הוא הראשון הבודק את השינויים הביוכימיים המתחוללים בתאים במהלך הטיפול הכימותרפי.

2. מבוא

2.1. רקע ביולוגי

2.1.1. רכיבי הדם

הדם מהווה כ- 7% ממשקל הגוף שהם במוצע כחמישה ליטרים אצל אדם בוגר. כ- 45% מנפח זה מהווים תאי הדם האדומים שתפקידם לשאת חמצן ו- CO_2 , כ- 1% מהווים תאי הדם הלבנים על סוגיהם השונים (טבלה 2.2) שמתפקדים כחלק מהמערכת החיסונית ואת שאר הנפח תופס נוזל הדם, הפלסמה, שבין היתר אחראי על העברת מים ותוצרים מומסים (כגון רכיבי מזון ממערכת העיכול, תוצרי פירוק מהרקמות וכדומה). כמו כן הדם מכיל את טסיות הדם המשתתפות בתהליך קרישת הדם (3).

טבלה 2.1 – רכיבי הדם השונים ותפקידם הביולוגי (3)

ריכוז אופייני בדם	צורה וגודל	תפקיד עיקרי	
כ- 54% מנפח הדם	90% מים והשאר חלבונים ומומסים שונים	נשיאת התאים, איזון טמפרטורה, הובלת חלבונים ומומסים שונים בגוף	פלסמה
$5 \cdot 10^{12}$ תאים לליטר	דיסקית קעורה משני צדדיה בקוטר של כ- $7.5 \mu\text{m}$	נשיאת O_2 ו- CO_2	תאי דם אדומים
$9 \cdot 10^9$ תאים לליטר	תאים עגולים בקוטר משתנה של כ- 6 - 15 μm בהתאם לסוג התא	שותפים במערכת החיסון	תאי דם לבנים

טסיות דם	שותפים בתהליך קרישת הדם	דיסקית אליפטית בקוטר של כ - 4µm - 2	$10^{11} * 3$ טסיות לליטר
----------	-------------------------	-------------------------------------	---------------------------

למרות שבדם קיימים סוגי תאים שונים ישנם מספר קווי דמיון בנוגע למחזור החיים של כל תאי הדם. כל תאי הדם נוצרים מתאי גזע (stem cells) זהים הנמצאים במח העצם, לכולם תקופת חיים מוגבלת (הנעה בין מספר ימים ועד מספר שנים) וכולם ממשיכים להיות מיוצרים במהלך כל חייו. לעומת זאת בעוד תאי הדם האדומים מתפקדים רק בתוך מערכת כלי הדם, תאי הדם הלבנים נעזרים בדם בעיקר כאמצעי תחבורה על מנת להגיע אל המקום בו הם נדרשים והם מסוגלים אפילו לעזוב את כלי הדם ולעבור אל הנוזל הבין-תאי. מאחר ותאי הדם האדומים מאבדים את גרעין התא כאשר הם בוגרים אין להם את היכולת להתחלק ולכן גם אינם חשופים למחלת הסרטן. תאי הדם הלבנים לעומת זאת שומרים על גרעין התא ועל היכולת להתרבות בצורה מבוקרת, אך בניגוד לתאים אחרים בגוף הם אינם מתחלקים בצורה סדירה (כאמור יצור תאי הדם נעשה מתאי הגזע במח העצם) אלא הם מתחלקים רק כאשר הדבר נדרש על מנת להלחם בזיהום כלשהו.

תאי הדם הלבנים מתחלקים לשלוש קבוצות עיקריות על פי צורתם: גרנולוציטים, מונוציטים ולימפוציטים, כמו כן כל קבוצה מתחלקת לתת קבוצות על פי התפקוד הביולוגי של התא. הסוגים השונים של תאי הדם הלבנים מוצגים בטבלה הבאה.

טבלה 2.2 – סוגי תאי הדם הלבנים (3)

קבוצת התאים	סוג התא	גודל אופייני (קוטר)	תפקיד עיקרי	ריכוז אופייני בדם
גרנולוציטים	נויטרופילים	12 - 14 μm	לבלוע ולהשמיד חיידקים	$5 \cdot 10^9$ תאים לליטר
	אאוזינופילים	$\sim 14 \mu\text{m}$	להשמיד טפילים ולווסת את התגובה הדלקתית אלרגית	$2 \cdot 10^8$ תאים לליטר
	באזופילים	10 - 15 μm	שחרור היסטמין (ולפעמים סרוטונין) בתגובות אלרגיות	$4 \cdot 10^7$ תאים לליטר
מונוציטים		12 - 15 μm	מעכלים ומסלקים מיקרואורגניזמים וגופים זרים ברקמות כמו גם תאים מזדקנים ומזיקים	$4 \cdot 10^8$ תאים לליטר
לימפוציטים	תאי B	6 - 16 μm	מייצרים נוגדנים	$2 \cdot 10^9$ תאים לליטר
	תאי T	6 - 16 μm	משמידים תאים שנפגעו מוירוס ומוסטים את כמות שאר תאי הדם הלבנים	$1 \cdot 10^9$ תאים לליטר
	רוצחים טבעיים (Natural Killer Cell)	6 - 16 μm	משמידים תאים שנפגעו מוירוס וחלק מהתאים בגידולים ממאירים	$1 \cdot 10^8$ תאים לליטר

2.1.2. לוקמיה

תאים סרטניים מוגדרים על ידי שני פרמטרים. הפרמטר הראשון הוא התרבות בלתי מבוקרת והפרמטר השני הוא פלישה ותפיסת מקומם של תאים אחרים. כאשר תא סרטני מתרבה בצורה לא מבוקרת הוא יוצר גידול (מסה גדלה והולכת של תאים סרטניים). כל זמן שהגידול נשאר כמסה אחת מאוחדת הגידול נקרא גידול שפיר (benign) וניתן בדרך כלל לרפא את הסרטן לחלוטין על ידי הוצאת הגידול בתהליך כירורגי, לעומת זאת כאשר חלק מהתאים הסרטניים מצליחים לעזוב את הגידול המקורי ולהתפשט לרקמות סמוכות, הגידול נקרא גידול ממאיר (malignant). רק חולה שנתגלה אצלו גידול ממאיר יחשב כחולה סרטן.

קיימים סוגי סרטן שונים המסווגים בצורה ראשונית על פי סוג הרקמות או התאים שהפכו לסרטניים, למשל, קרצינומה (carcinoma) - גידול הנוצר בתאים האפיתליאליים (תאים הנמצאים על השכבה החיצונית של הקרומים הריריים כמו הפה, הראות, מערכת העיכול וכדומה), סרקומה (sarcoma) - גידול הנוצר ברקמות החיבור ובשרירים, הלימפומה (lymphoma) והלוקמיה (leukemia) - סוגי סרטן הנוצרים במערכת החיסון כאשר הלימפומה הוא סרטן הנוצר בבלוטות הלימפה והלוקמיה הוא סרטן הדם (3).

כפי שצוין בפרק 2.1.1 תאי הדם האדומים הבוגרים הם חסרי גרעין ולכן אינם יכולים להתחלק ואינם חשופים לסרטן. סרטן הדם, אם כן, הוא סרטן הנוצר בתאי הדם הלבנים והוא מתחלק למספר סוגים על פי סוג התאים הלבנים בו הוא נוצר.

המחקר המוצג בעבודה זו מתרכז בסוג אחד של סרטן הדם, הלוקמיה הלימפובלסטית החריפה - Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), שהוא סרטן הנוצר בלימפוציטים.

הלוקמיה הלימפובלסטית החריפה מהווה כשליש מכלל סוגי הסרטן בילדים והיא המחלה הממארת השכיחה ביותר בילדים, שכיחות הופעת המחלה אצל ילדים עד גיל 15 נעה בין 0.9 ל – 4.7 מקרים ל – 100,000 במדינות שונות, כאשר בארץ המספר עומד על 3.6 מקרים ל – 100,000. שיא הופעת המחלה הוא בילדים בני 6 – 2 שנים (4,5). בשנים האחרונות הייתה התקדמות משמעותית בטיפול ב – ALL וכיום למעלה מ – 80% מהילדים החולים מבריאם לעומת כ – 1% בלבד ב – 1965.

הטיפול הקיים היום ללוקמיה כולל תרופות כימותרפיות שמטרתם להוריד את מספר הלימפוציטים בדם לאפס (הסרטניים והנורמליים כאחד) בתקווה שהלימפוציטים החדשים שייצר הגוף יהיו בריאים. במקרים של חזרת המחלה מתבצעת השתלת מח עצם על מנת לספק לגוף תאי גזע בריאים שיוכלו לייצר לימפוציטים בריאים. משך הטיפול הוא בין שנתיים לשלוש במהלכן עובר החולה טיפולים כימותרפיים ותקופות התאוששות לסירוגין. כאמור למעלה מ – 80% מהחולים בלוקמיה מבריאם בעקבות הטיפול, אולם ב – 20% - 10% מהמקרים המחלה חוזרת לאחר ההחלמה, בדרך כלל במהלך השנה הראשונה לאחר סיום הטיפול (4). זיהוי התאים הסרטניים והמעקב אחר יעילות הטיפול מתבצעים על ידי טכניקות רפואיות ידועות כגון (4-9):

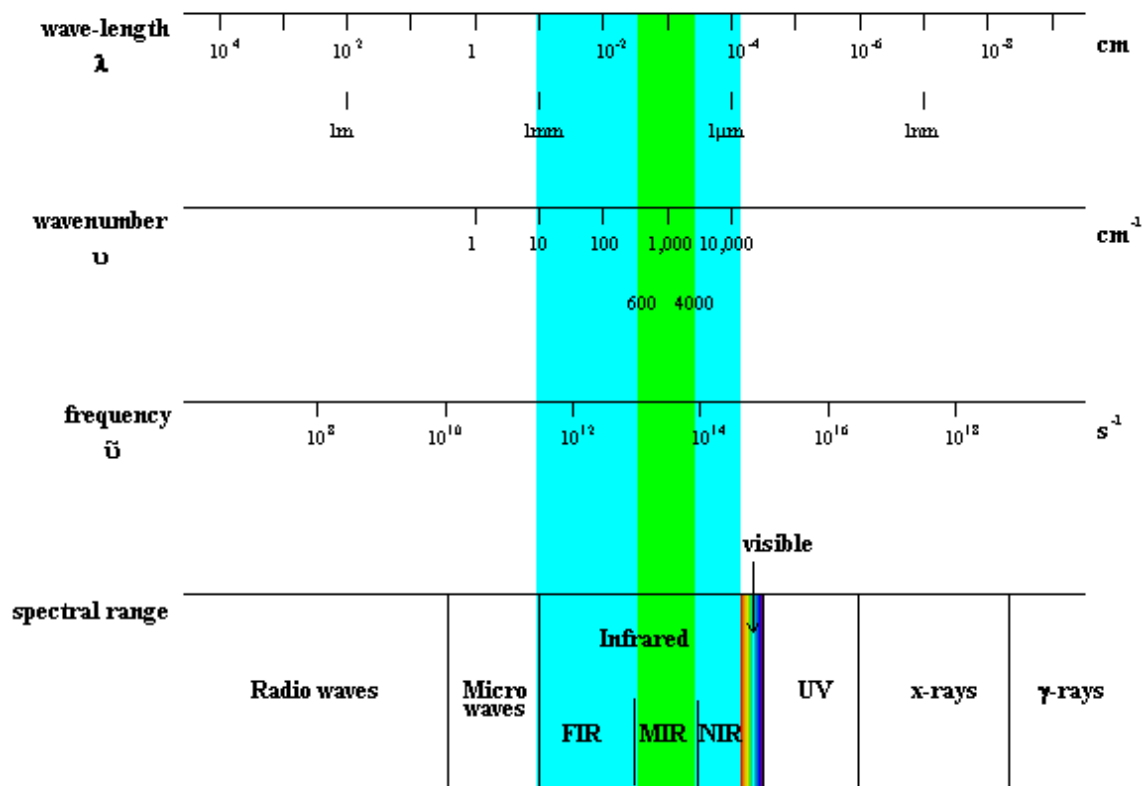
- ספירת תאים - תהליך שבו מתבצעת צביעה היסטוכימית וספירה ויזואלית של מספר התאים הבריאים והסרטניים למיקרוליטר
- Flow cell cytometry - אפיון והבחנה של תאי הדם על פי עוצמת הריאקציה הציטוכימית שלהם עם אנזימים מסוימים
- מורפולוגיה – אפיון והבחנה של תאי הדם על פי גודלם, צורתם וצורת גרעין התא

- Polymerase Chain Reaction – PCR, טכניקה להגברה של מקטעים ספציפיים
- ב – DNA על ידי הכפלת מקטע ידוע מראש בצורה מחזורית מספר רב של פעמים עד אשר מתקבלים מליוני מקטעים זהים אשר אותם ניתן לזהות בשיטות אחרות (9).
- שיטה זו משמשת לבדיקת מחלה שיורית מינימלית (Minimal Residual Disease) כלומר, בדיקה האם נותרו תאים סרטניים בדם.

2.2. רקע פיסיקלי

2.2.1. הספקטרום האלקטרומגנטי

הספקטרום האלקטרומגנטי והחלוקה שלו לתחומים מופיעים בגרף 2.1.



גרף 2.1 – הספקטרום האלקטרומגנטי (10)

לקרינה האלקטרומגנטית שימושים רבים בטיפול ובדיאגנוסטיקה ברפואה המודרנית. מאחר והאינטראקציה בין הקרינה האלקטרומגנטית והחומר (אטומים או מולקולות) יכולה להתבצע במספר דרכים, כפי שמתואר בסעיף 2.2.2 ובטבלה 2.3, כמעט לכל תחום תדרים קיים שימוש כלשהו ברפואה, החל מטיפול בקרינה שמתבצע בתחום גלי הגמא דרך צילומי רנטגן ו- CT בתחום גלי ה- X ועד להדמיה בעזרת תהודה מגנטית (MRI) בתחום גלי הרדיו. במחקר זה עבדנו בתחום האינפרא-אדום האמצעי (MIR) אשר מודגש בגרף 2.1 בצבע ירוק. בסעיף 2.2.3 אדון ביתרונות של תחום תדרים זה.

2.2.2 אינטראקציה של גלים אלקטרומגנטיים עם חומר

אינטראקציה בין קרינה אלקטרומגנטית לחומר יכולה להתבטא בבליעה של הקרינה (פוטונים) על ידי החומר, בפזורה הקרינה על ידי החומר או בפליטה של קרינה מהחומר (10,11).

2.2.2.1 בליעה

המעבר של אטום או מולקולה מרמת אנרגיה נמוכה לרמת אנרגיה גבוהה (סעיף 2.2.3) תוך מעבר אנרגיה מהקרינה לחומר נקרא בליעה. מתוך עקרונות קוונטים, אשר ידונו בהמשך, תהליך הבליעה לא יתקיים עבור כל תדר של הקרינה הפוגעת אלא רק עבור תדרים מסוימים אשר האנרגיה שלהם מתאימה להפרש בין שתי רמות אנרגיה באטום או במולקולה. האנרגיה המועברת מהקרינה האלקטרומגנטית יכולה להיבלע במספר דרכים בהתאם לסוג הקרינה הפוגעת, למשל, קרינה בתחום האולטרא סגול תגרום לאלקטרונים לעבור לרמת אנרגיה גבוהה יותר, קרינה בתחום האינפרא אדום תבלע בצורת ויברציות במולקולה וקרינה בתחום

גלי המיקרו תבלע בצורת רוטציות של המולקולה הבולעת. טבלה 2.3 מציגה את סוגי הקרינות וצורת הבליעה שלהן בחומר.

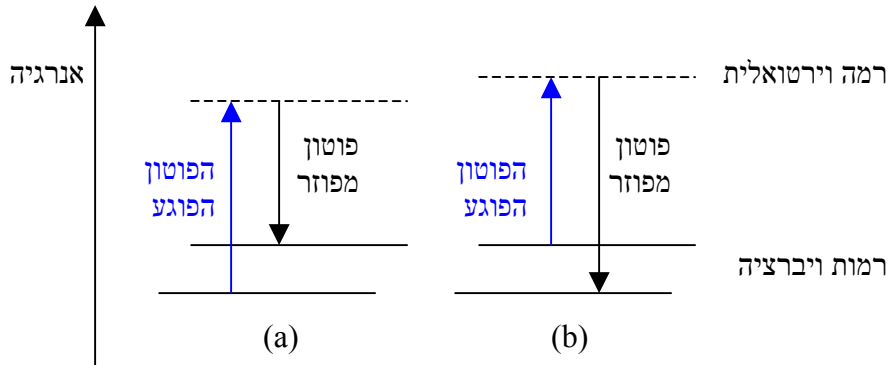
טבלה 2.3 – סוגי הקרינה האלקטרומגנטית וצורת הבליעה שלהן בחומר (10)

סוג הקרינה	תדירות (Hz)	אורך הגל	אנרגיה (eV)	צורת הבליעה
קרינת גמא	$10^{20} - 10^{24}$	$<1_{\text{pm}}$	$4.1 \times 10^5 - 4.1 \times 10^9$	נוקלאונים בגרעין האטום
קרינת X	$10^{17} - 10^{20}$	$1_{\text{nm}} - 1_{\text{pm}}$	$414 - 4.1 \times 10^5$	אלקטרונים פנימיים
אולטרא סגול	$7.5 \times 10^{14} - 10^{17}$	$400_{\text{nm}} - 1_{\text{nm}}$	$3.1 - 414$	אלקטרונים חיצוניים
האור הנראה	$4 - 7.5 \times 10^{14}$	$750_{\text{nm}} - 400_{\text{nm}}$	$1.7 - 3.1$	אלקטרונים חיצוניים
אינפרא אדום קרוב (near IR)	$10^{12} - 4 \times 10^{14}$	$2.5_{\mu\text{m}} - 750_{\text{nm}}$	$4.1 \times 10^{-3} - 1.7$	אלקטרונים חיצוניים ויברציות מולקולריות
אינפרא אדום	$10^{11} - 10^{12}$	$25_{\mu\text{m}} - 2.5_{\mu\text{m}}$	$4.1 \times 10^{-4} - 4.1 \times 10^{-3}$	ויברציות מולקולריות, ויברציה-רוטציה
גלי מיקרו	$10^8 - 10^{11}$	$1_{\text{mm}} - 25_{\mu\text{m}}$	$4.1 \times 10^{-7} - 4.1 \times 10^{-4}$	רוטציות מולקולריות ושינוי האנרגיה המגנטית של האלקטרון
גלי רדיו	$10^0 - 10^8$	$>1_{\text{mm}}$	$4.1 \times 10^{-14} - 4.1 \times 10^{-7}$	שינוי האנרגיה המגנטית של הספין הגרעיני של האטום

2.2.2.2. פיזור

שינוי כיוון ההתקדמות של הקרינה כתוצאה מאינטראקציה בינה לבין חומר כלשהו נקרא פיזור (Scattering). במהלך הפיזור יכולה להתרחש גם העברת אנרגיה מהקרינה לחומר או להפך, כלומר, אורך הגל המפוזר ואורך הגל הפוגע יכולים להיות זהים, כאשר אין העברת אנרגיה, או שונים כאשר מתבצעת העברת אנרגיה. קיימים סוגים שונים של פיזורים (10,11):

- פיזור רמאן (Raman) – הקרינה מפוזרת עקב ויברציות במולקולות בהן היא פוגעת. בפיזור רמאן מספר הגל של הקרינה המפוזרת יכול להיות מוסט עד 4000cm^{-1} ממספר הגל של הקרינה הפוגעת. בניגוד לתהליך הבליעה האלקטרומגנטית, פיזור רמאן קיים גם על מולקולות הומוגניות כגון O_2 , N_2 וכדומה.
- קיימים שני סוגים של פיזור רמאן: פיזור רמאן סטוקס אשר בו הפוטון הפוגע מעורר את המולקולה לרמת אנרגיה וירטואלית, נפלט פוטון פחות אנרגטי (תדר נמוך יותר) והמולקולה עוברת לרמת אנרגיה גבוהה יותר ופיזור רמאן אנטי-סטוקס אשר בו הפוטון הפוגע מעורר את המולקולה לרמת אנרגיה וירטואלית, נפלט פוטון אנרגטי יותר (תדר גבוה יותר) והמולקולה עוברת לרמת אנרגיה נמוכה יותר. שני סוגי הפיזור מוצגים בשרטוט הבא.



שרטוט 2.2 – (a) פיזור רמאן סטוקס (b) פיזור רמאן אנטי-סטוקס

פיזור זה הינו תהליך חלש בהרבה בהשוואה לתהליך הבליעה ולכן תרומתו בספקטרה שנמדדו במחקר זה זעומה.

- פיזור ריילי (Rayleigh) – הקרינה מפוזרת מחלקיקים הקטנים מאורך הגל של הקרינה הפוגעת. הקרינה המפוזרת בדרך כלל זהה בתדירותה לקרינה הפוגעת, כלומר, רק כיוון התקדמות הקרינה משתנה (למעט הסחה קטנה בתדירות הקרינה כתוצאה מרתיעת האטום או המולקולה בפיזור). כיוון הפיזור תלוי ישירות באורך הגל של הקרינה הפוגעת (ככל שאורך הגל קטן יותר הפיזור רב יותר) ועוצמת הקרינה המפוזרת פרופורציונלית ל- $1/\lambda^4$ כפי שניתן לראות במשוואה 2.1. פיזור ריילי הוא פיזור אלסטי של הקרינה.

$$I = I_0 \frac{8\pi^4 N \alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (2.1)$$

I - עוצמת הקרינה המפוזרת

I_0 - עוצמת הקרינה הפוגעת

N - מספר הפיזורים

α - יכולת הקיטוב של המולקולה

θ - זווית הפיזור

λ - אורך הגל של הקרינה הפוגעת

R - המרחק בין נקודת המדידה לחלקיק המפזר

• פיזור Mie – הקרינה מפוזרת מספירה דיאלקטרית והומוגנית (כגון טיפת מים) אשר גדולה מאורך הגל של הקרינה הפוגעת. את התנהגות הקרינה בפיזור זה ניתן להבין מתוך עקרונות האופטיקה הגאומטרית. במקרה זה פיזור הקרינה הוא קדמי ואינו תלוי באורך הגל של הקרינה הפוגעת. הקרינה המפוזרת זהה בתדירותה לקרינה הפוגעת. זהו פיזור אלסטי של הקרינה.

• פיזור ברילואן (Brillouin) – הקרינה מפוזרת ממוצק שקוף עקב ויברציות במוצק (פונונים). בפיזור ברילואן מספר הגל (wavenumber) של הגל המפוזר מוסט בדרך כלל ב $0.1 - 1 \text{ cm}^{-1}$ ממספר הגל של הגל הפוגע. ההסטה בתדר מוצגת במשוואה הבאה:

$$\Delta\omega = \frac{2\pi V}{\lambda} (\sin \theta_i + \sin \theta_s) \quad (2.2)$$

$\Delta\omega$ - ההפרש בין תדר הקרינה המפוזרת לתדר הקרינה הפוגעת

V - מהירות הפונונים במוצק

λ - אורך הגל של הקרינה הפוגעת

θ_i - זווית הפגיעה של הקרינה

θ_s - זווית הפיזור של הקרינה

- פיזור קומפטון – הקרינה מפוזרת מחלקיקים טעונים. השינוי במספר הגל המפוזר לעומת מספר הגל הפוגע תלוי רק בזווית הפיזור ובמסת החלקיק המפזר בהתאם למשוואת קומפטון.

$$\Delta\lambda = \frac{h}{mc}(1 - \cos\theta) \quad (2.3)$$

$\Delta\lambda$ - ההפרש בין אורך הגל המפוזר לאורך הגל הפוגע

h - קבוע פלאנק

m - מסת החלקיק המפזר

c - מהירות האור בריק

θ - זווית הפיזור

2.2.2.3. פליטה

פליטה מתבצעת כאשר אטום או מולקולה עוברים מרמת אנרגיה גבוהה לרמת אנרגיה נמוכה יותר ופולטים את הפרש האנרגיה בצורת קרינה אלקטרומגנטית. כמו במקרה של הבליעה גם כאן, רק תדרים מסוימים אשר מתאימים להפרש רמות האנרגיה באטום או במולקולה יכולים להיפלט בתהליך. תדירות הקרינה הנפלטת תהיה תלויה בסוג מעבר האנרגיה שהתבצע בדיוק כמו בתהליך הבליעה (טבלה 2.3), למשל כאשר אלקטרון יעבור מרמת אנרגיה גבוהה לרמת אנרגיה נמוכה יותר תיפלט קרינה בתחום האולטרא סגול או כאשר מולקולה תעבור מרמת אנרגיה ויברציונית גבוהה לרמת אנרגיה ויברציונית נמוכה יותר תיפלט קרינה בתחום האינפרא אדום.

2.2.3 עקרונות קוונטיים בסיסיים

כפי שציינתי, הן בתהליך הבליעה והן בתהליך הפליטה מתבצע מעבר בין רמות האנרגיה באטום או במולקולה. רמות אנרגיה אלו יכולות להיות רמות האנרגיה של האלקטרונים באטום, רמות ויברציה או רוטציה של המולקולה או רמות הקשורות בספין הגרעיני או האלקטרוני. מאחר ובמחקר זה עסקנו בספקטרוסקופיה בתחום האינפרא-אדום האמצעי רמות האנרגיה הרלוונטיות הן רמות הויברציה במולקולה (טבלה 2.3) ובהן נדון בהמשך. על פי תורת הקוונטים, רמות האנרגיה הן רמות בדידות, כלומר המולקולה יכולה להימצא רק ברמות אנרגיה מסוימות ולכן בתהליך הבליעה רק תדרים אשר האנרגיה שלהם מתאימה להפרש בין שתי רמות אנרגיה במולקולה יבלעו. לדוגמא נדון במקרה הפשוט ביותר של מולקולה דו-אטומית. ניתן להתייחס אל המולקולה כאל שתי מסות הקשורות ביניהן על ידי קפיץ חסר מסה. על פי חוק הוק (Hooke) השינוי במיקום המסות יחסית למרכז המסה נתון על ידי המשוואה הבאה:

$$\mu \frac{d^2 R}{dt^2} = -kR \quad (2.4)$$

R – המרחק הכולל בין שתי המסות

k – קבוע האוסילטור ההרמוני שמייצג את חוזק הקשר הכימי בין האטומים

μ – המסה המצומצמת*

* המעבר למסה מצומצמת מאפשר לנו להתייחס אל הבעיה כאל בעיה של מסה יחידה

הפועלת תחת השפעה של כוח מרכזי. המסה המצומצמת מוגדרת במשוואה 2.5:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2.5)$$

$m_{1,2}$ - שתי המסות במולקולה הזו אטומית

במקרה של מולקולה בעלת יותר משני אטומים ניתן להרחיב את משוואה 2.5 ל $n -$ מסות על פי משוואה 2.6. כמובן שבמקרה כזה נקבל מספר קבועים אוסילטוריים (k), בהתאם לסוגי האטומים המשתתפים בקשר ולסוג הקשר, דבר אשר הופך את הבעיה למעט יותר מורכבת.

$$\frac{1}{\mu} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{m_i} \quad (2.6)$$

הפתרון של משוואה 2.4 הוא פתרון קלאסי של אוסילטור הרמוני. על מנת לקבל קוונטיזציה של רמות האנרגיה של האוסילטור הרמוני נציב את ההמילטוניאן של האוסילטור הרמוני:

$$\hat{H} = \frac{\hat{p}^2}{2\mu} + \frac{k\hat{R}^2}{2} \quad (2.7)$$

\hat{H} - אופרטור ההמילטוניאן

\hat{p} - אופרטור התנע

\hat{R} - אופרטור המקום

במשוואת שרדינגר:

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi(R,t) = \hat{H}\Psi(R,t) \quad (2.8)$$

\hbar - קבוע פלאנק (Planck) מחולק ב 2π

Ψ - פונקצית הגל של האוסילטור

מתוך הנחה כי השינויים לפי הזמן ולפי המקום הם בלתי תלויים ניתן לבצע הפרדת משתנים ולקבל קוונטיזציה של רמות האנרגיה של האוסילטור ההרמוני, כלומר את רמות האנרגיה הויברציוניות של המולקולה (12,13):

$$E_n = (n + \frac{1}{2})\hbar\omega \quad (2.9)$$

E_n - האנרגיה של הרמה ה- n

n - מספר קוונטי המייצג את רמת האנרגיה, שווה למספר טבעי או לאפס

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{- התדירות הזוויתית של האוסילטור}$$

מתוך התדירות הזוויתית של האוסילטור ניתן למצוא את תדירות התנועה בעזרת הקשר:

$$\nu = \frac{\omega}{2\pi} \quad (2.10)$$

ν - תדירות האוסילטור

כאמור, תהליך הבליעה יתבצע על ידי המולקולה רק עבור קרינה בתדרים שהאנרגיה שלהם מתאימה להפרש בין רמות האנרגיה של המולקולה, תנאי זה הוא תנאי הכרחי אך אינו מספיק. על מנת שמולקולה תבלע קרינה בתחום האינפרא-אדום חייב להיות לה גם מומנט

דיפול חשמלי. מומנט הדיפול החשמלי מוגדר במשוואה 2.11:

$$\mu = qd \quad (2.11)$$

μ - מומנט הדיפול החשמלי

q - גודל המטען החלקי (חיובי או שלילי) של הדיפול

d - המרחק בין שני קטבי הדיפול בכל רגע נתון

אם בזמן הויברציה של המולקולה משתנה המומנט הדיפולי שלה, עקב האינטראקציה עם המרכיב החשמלי של הקרינה האלקטרומגנטית (בתנאי כמובן שהיא בתדר המתאים), הדבר יגרום למולקולה לשנות את רמת האנרגיה הויברציונית שלה, כלומר לבלוע קרינה. משוואה 2.11 מתאימה למקרה הפשוט של מומנט דיפול חשמלי הנוצר משני מטענים בלבד, כאשר קיימים למעלה משני מטענים (גרעיני אטומים ואלקטרונים) ניתן להרחיב את משוואה 2.11 למקרה הכללי ולקבל:

$$\bar{\mu} = \sum_i q_i \bar{r}_i \quad (2.12)$$

$\bar{\mu}$ - מומנט הדיפול החשמלי

q_i - גודל המטען של החלקיק ה- i (אלקטרון או גרעין)

\bar{r}_i - וקטור המיקום של החלקיק ה- i

בפיתוח קוונטי ניתן להתייחס אל $\bar{\mu}$ כאל אופרטור ולקבל בעזרתו את מומנט המעבר הויברציוני המגדיר את מעבר המולקולה מרמת אנרגיה ויברציונית אחת לשניה (14):

$$\bar{R}_n = \int \psi'_n * \bar{\mu} \psi''_n dx \quad (2.13)$$

\bar{R}_n - מומנט המעבר מרמת אנרגיה אחת לשניה

ψ'_n - פונקצית הגל הויברציונית של רמת האנרגיה הראשונה

ψ''_n - פונקצית הגל הויברציונית של רמת האנרגיה השניה

$x = r - r_e$ - ההעתקה בוקטור המיקום לעומת מצב שיווי המשקל

עבור מולקולה דו-אטומית הומוגנית (כגון N_2, O_2 וכדומה) $\bar{\mu} = 0$ ולכן $\bar{R}_n = 0$ וכל מעברי האנרגיה הויברציוניים אסורים. עבור מולקולה הטרוגנית $\bar{\mu}$ שונה מאפס ותלוי בשינוי ב- x , תלות זו ניתן לפתח על פי טור טיילור:

$$\bar{\mu} = \bar{\mu}_e + \left(\frac{d\mu}{dx}\right)_e x + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\mu}{dx^2}\right)_e x^2 + \dots \quad (2.14)$$

e - אינדקס המייצג את מצב שיווי המשקל

על ידי הצבת פיתוח זה במשוואה 2.13 מקבלים:

$$\bar{R}_n = \bar{\mu}_e \int \psi'_n * \psi''_n dx + \left(\frac{d\mu}{dx}\right)_e \int \psi'_n * x \psi''_n dx + \dots \quad (2.15)$$

מאחר ופונקציות הגל ψ'_n ו- ψ''_n הן פונקציות אורתוגונליות (שתיהן פונקציות עצמיות של אותו ההמילטוניאן) האיבר הראשון במשוואה 2.15 מתאפס. ההסתברות למעבר בין רמות האנרגיה הויברציוניות נתון על ידי ריבוע מומנט המעבר, כלומר מעבר רמות האנרגיה בעל ההסתברות הגדולה ביותר מתקבל, על פי משוואה 2.15, כאשר $\frac{d\mu}{dx}$ מקסימלי (14).

ניתן להסתכל לדוגמא על מולקולה של פחמן דו-חמצני (CO_2). כאשר שני אטומי החמצן במולקולה מתנוודדים כך שהם מתקרבים ומתרחקים מאטום הפחמן בו זמנית (מתיחה סימטרית), אין שינוי במומנט הדיפול של המולקולה ולכן לא תתבצע בליעה של קרינה בתחום האינפרא-אדום. לעומת זאת כאשר אטומי החמצן נעים כך שכאשר אחד מהם מתקרב אל אטום הפחמן השני מתרחק ממנו ולהפך (מתיחה אסימטרית), קיים שינוי במומנט הדיפול של המולקולה ומתבצעת בליעה שמופיעה במספר גל של $2347 \text{ cm}^{-1} \sim (0.2912 \text{ eV})$.

בנוסף לתנאים אלו קיים כלל ברירה קוונטי למעברי אנרגיה ויברציוניים במולקולה שקובע שהמעברים יתבצעו רק לרמות אנרגיה סמוכות, כלומר: $\Delta n = \pm 1$. מאחר ובטמפרטורת החדר רב המולקולות נמצאות ברמת היסוד ($n=0$), המעבר הנפוץ ביותר יהיה בין רמת היסוד לרמה הויברציונית הראשונה ($n=0 \rightarrow n=1$) (15-11).

עבור מולקולה דו-אטומית הטרונגנית קיימת רק דרגת חופש אחת כלומר רק ויברציה אחת אפשרית. לעומת זאת אם נסתכל על מולקולה המורכבת מ- n אטומים נקבל מספר דרגות חופש הפרופורציונלי למספר האטומים. מאחר ולכל אטום קיימות שלוש דרגות חופש (תנועה בשלושה צירים) עבור n אטומים נקבל $3n$ דרגות חופש. מאחר והאטומים קשורים ביניהם יש להחסיר ממספר זה את שלוש דרגות החופש של הטרנסלציה ושלוש דרגות החופש של הרוטציה של מרכז המסה של המולקולה. לפיכך עבור מולקולה n -אטומית לא ליניארית מתקבלות $3n-6$ דרגות חופש. אם המולקולה ליניארית קיימות רק שתי דרגות חופש של הרוטציה סביב מרכז המסה בגלל הסימטרייה של המולקולה ולכן עבור מולקולה ליניארית נקבל $3n-5$ דרגות חופש.

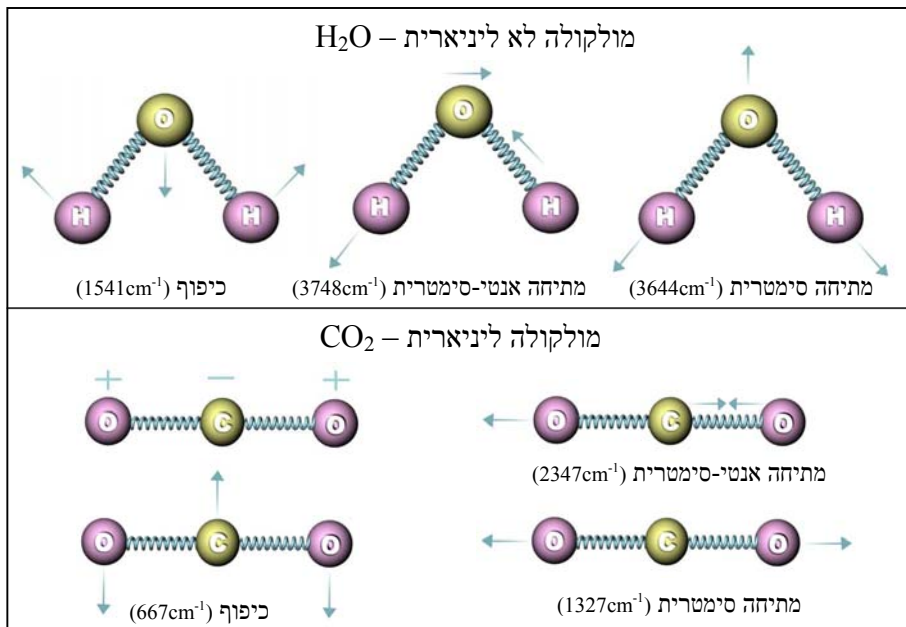
ניתן להבחין ביו שני סוגים של אופני ויברציות:

- ויברציות מתיחה – שינוי המרחק בין האטומים או בין קבוצות אטומים
- ויברציות כיפוף – שינוי הזווית בין האטומים או בין קבוצות אטומים

כמו כן ניתן להבחין בין ויברציות סימטריות לויברציות אנטי-סימטריות.

גרף 2.3 מתאר לדוגמא את סוגי הויברציות האפשריות עבור מולקולה ליניארית (CO_2) ועבור מולקולה לא ליניארית (H_2O), ניתן לראות שעבור המולקולה הלא ליניארית של המים קיימים שלושה אופני תנודה (על פי הקשר $3n-6$) ולעומת זאת עבור המולקולה

הליניארית מתקבלים ארבעה אופני תנודה (על פי הקשר 5-3n) אם כי במולקולה ספציפית זו קיים ניוון ושני סוגי הכיפוף המופיעים בגרף הם בעצם זהים. כל אופני התנודה הנזכרים לעיל מתקבלים בתחום האינפרא אדום האמצעי.



גרף 2.3 – אופני הויברציה של מולקולה ליניארית (CO₂) ומולקולה לא ליניארית (H₂O) (סימני ה +, - מייצגים תנועה המאוונכת למישור הדף)

2.2.4 ספקטרוסקופיה באינפרא אדום

במחקר זה התמקדנו בספקטרוסקופיה בתחום האינפרא-אדום האמצעי. רמות האנרגיה הנמצאות בתחום זה הן רמות אנרגיה ויברציוניות, לכן ספקטרוסקופיה ב- MIR מספקת מידע לגבי מבנה המולקולה מבחינת סוג הקשרים הבין אטומיים במולקולה (קשרים קוולנטיים או ון-דר וולס) והאטומים המשתתפים בהם (טבלה 2.4). הספקטרום שנמדד הוא בתחום 600-4000cm⁻¹ והוא עשיר בתוצאות לגבי המרכיבים הביוכימיים בתאי הדם. יתרון

נוסף של ספקטרוסקופיה בתחום תדרים זה הוא בכך שקרינה בתחום האינפרא-אדום היא בלתי מזיקה לחומרים אורגניים ולכן היא אידיאלית לשימושים רפואיים.

טבלה 2.4 מציגה מספר דוגמאות של קשרים מולקולריים ותדרי הבליעה האופייניים להם בתחום הנמדד.

טבלה 2.4 – מספר דוגמאות של קשרים ביוכימיים וחלק מתדירות הבליעה האופייניות שלהם (16,17) (האות בסוגריים מייצגת את עוצמת הבליעה: s – חזקה, m – בינונית, w – חלשה)

תדרי ויברציה (cm^{-1})	סוג התרכובת והויברציה		קשר כימי
~2870 (s)	מתחה סימטרית – CH_3		C-H
~2960 (s)	מתחה אנטי-סימטרית – CH_3		
1380-1370 (s)	כיפוף סימטרי – CH_3		
1470-1435 (m)	כיפוף אנטי-סימטרי – CH_3		
~2850 (s)	מתחה סימטרית – CH_2		
~2930 (s)	מתחה אנטי-סימטרית – CH_2		
3080-3020 (m)	מתחה	אלקן	
1000-675 (s)	כיפוף		
3500-3300 (m)	מתחה	אמין	C=C
1650-1580 (m)	כיפוף		
1600, 1500 (w)	מתחה	טבעת ארומטית	C-NO ₂
1680-1640 (m, w)	מתחה	אלקן	
1385-1335 (s)	מתחה	תרכובת חנקנית	C-O
1565-1510 (s)			
1260-1000 (s)	מתחה	אלכוהול, אתר, אסטר, חומצה קרבוקסילית	

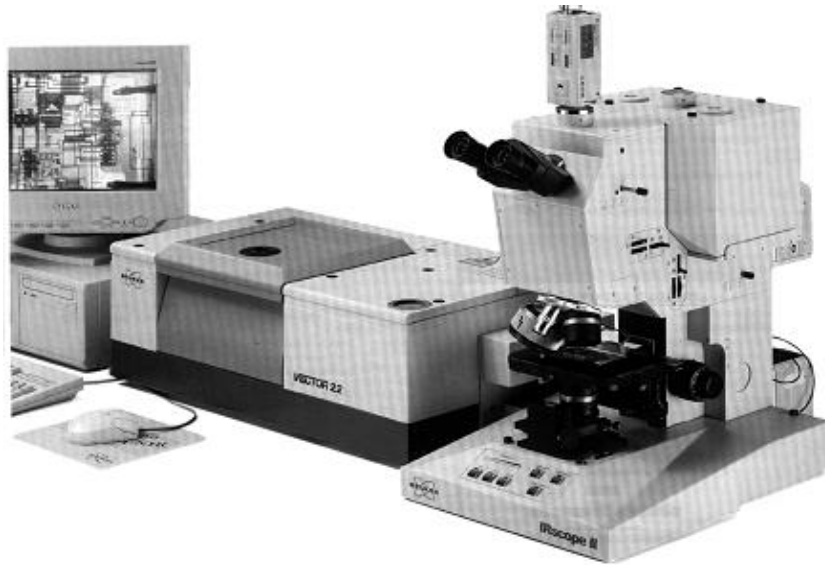
1800-1630 (s)	מתיחה	אלדהיד, קטון, חומצה קרבוקסילית, אסטר, אמיד, אנהידריד	C=O
1360-1020 (s, w)	מתיחה	אמין	C-N
3500-3640(משתנה)	מתיחה	כוהל, פנול, חומצה קרבוקסלית	O-H

מתוך טבלה 2.4 ברור שרוב המולקולות האורגניות הינן בעלות רמות ויברציה (הבנויות על רמת היסוד) בתחום האינפרא אדום האמצעי ומכאן האטרקטיביות המדעית הרבה של תחום מחקר זה.

2.2.5 ספקטרומטר FTIR-MSP

FTIR (Fourier Transform Infrared) הנו ספקטרומטר הפועל בתחום האינפרא אדום ומבוסס על האינטרפרומטר של מיכלסון (סעיף 2.2.5.3) ועל עיבוד מידע בעזרת טרנספורם פורייה (סעיף 2.2.5.4).

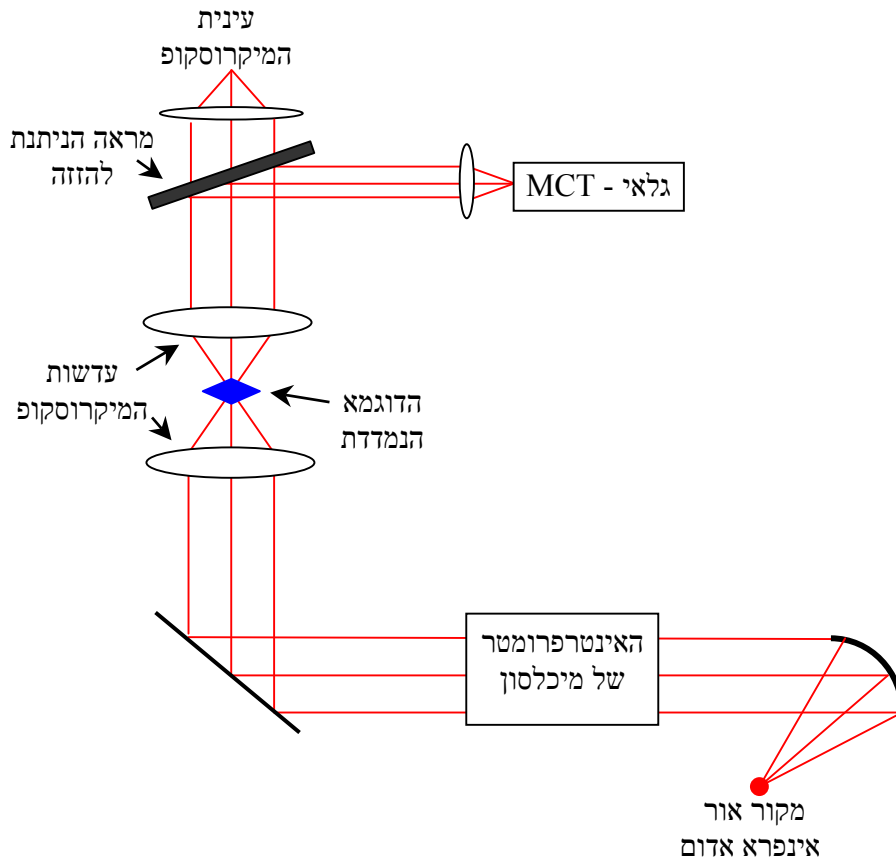
במחקר זה השתמשנו ב- FTIR-MSP (FTIR - Microspectrometer) שהנו מכשיר FTIR חדיש המצויד במיקרוסקופ אינפרא אדום המאפשר מדידה של ספקטרום בליעה או החזרה של דוגמאות מיקרוסקופיות. בתמונה 2.4 ניתן לראות את מכשיר ה- FTIR-MSP מדגם EQUINOX 55/S של חברת Bruker שבו השתמשנו.



תמונה 2.4 – ספקטרומטר FTIR-MSP מדגם EQUINOX 55/S של חברת Bruker

מכשיר ה- FTIR-MSP מאפשר קבלת ספקטרום בליעה בעל רזולוציה גבוהה של עד כ- 0.5cm^{-1} ($\sim 0.62 \cdot 10^{-4}\text{eV}$) עם יחס אות לרעש (Signal to Noise Ratio - SNR) טוב מאוד (< 700). המכשיר מצויד במיקרוסקופ אינפרא אדום אשר מאפשר מדידת דוגמאות מיקרוסקופיות. מאחר והספקטרומטר מבוסס על ספקטרוסקופיה באינפרא אדום הוא אינו מזיק לדוגמאות ביולוגיות וניתן למדוד בעזרתו תאים חיים או מתים. השימוש בטרנספורם פורייה מאפשר מדידה בו זמנית של כל טווח התדרים, כלומר זמן המדידה הוא קצר, דבר המאפשר ביצוע מדידות רבות בזמן קצר יחסית (כ- 128 סריקות בדקה) ועל ידי כך לשפר בצורה משמעותית את דיוק המדידה ואת יחס אות לרעש (SNR פרופורציונלי ל- \sqrt{N} , כאשר N מייצג את מספר הסריקות).

שרטוט 2.5 מציג תאור סכמתי של FTIR-MSP ולאחריו אפרט את המרכיבים השונים של הספקטרומטר.

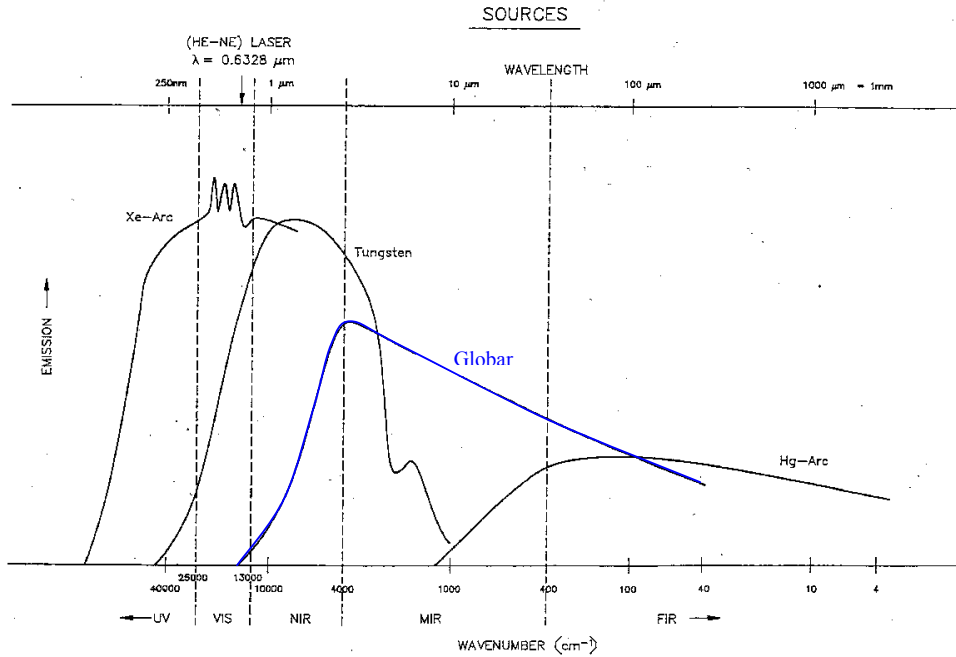


שרטוט 2.5 – תאור סכמתי של הספקטרומטר FTIR-MSP

2.2.5.1. מקור אור אינפרא אדום

מקור האור האינפרא אדום ב- FTIR הוא מנורת Globar אשר בנויה מרצועת סיליקון קרביד (Silicon Carbide) אשר מצופה כסף בקצוות על מנת לאפשר מגע חשמלי טוב יותר. מנורה זו מחוממת לטמפרטורה של כ- 1200°K ובעקבות כך פולטת קרינה בתחום האינפרא אדום על פי העיקרון של קרינת גוף שחור.

היתרון של מנורה זו הוא בכך שהיא בעלת אופיין ליניארי בתחום האינפרא אדום האמצעי כפי שניתן לראות בגרף 2.6, כמו כן עוצמת הקרינה בתחום זה היא גבוהה יחסית.



גרף 2.6 – ספקטרום פליטה אופייני של מנורת Globar והשוואה למקורות אחרים (Xe-Arc, Tungsten, Hg-Arc) (18)

בגרף 2.6 ניתן לראות כי עוצמת הקרינה המקסימלית של הספקטרום האופייני של מנורת Globar נמצאת ב- 4000cm^{-1} (או $\lambda=2.5\mu\text{m}$) בהתאם לחוק Wien:

$$\lambda_{\max} T = 3000 \mu\text{m}\cdot\text{K} \quad (2.16)$$

λ_{\max} - אורך הגל של נקודת המקסימום

T - טמפרטורה

2.2.5.2 גלאי MCT

גלאי MCT (Mercury Cadmium Tellurium) הוא גלאי קוונטי בתחום האינפרא אדום המורכב ממולקולות כספית טלוריום (HgTe) וממולקולות קדמיום טלוריום (CdTe)

בריכוזים שונים. על ידי שינוי היחס בין ריכוזי המולקולות ניתן לשנות את פער האנרגיה (Energy band gap) של הגלאי ומכאן את אורך הגל המקסימלי הניתן למדידה בגלאי עבור טמפרטורה נתונה.

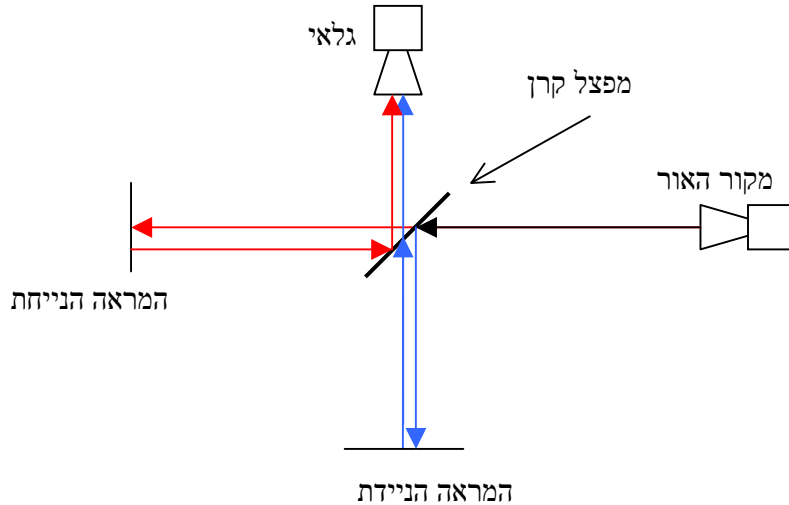
כאשר קרינה בתחום האינפרא אדום פוגעת בגלאי היא מעוררת אלקטרונים מרמת הערכיות לרמת ההולכה, מאחר ואלקטרונים ברמת ההולכה הם נושאי זרם, משתנה מוליכות הגלאי. כלומר, קיים קשר ישיר בין מוליכות הגלאי לעוצמת הקרינה הפוגעת בו ועבור מתח חשמלי נתון קיים קשר בין הזרם הנמדד על הגלאי לעוצמת הקרינה.

במכשיר ה- FTIR בו עבדנו הגלאי קורר בעזרת חנקן נוזלי לטמפרטורה של 77 K על מנת להקטין את הרעשים ולאפשר רגישות גבוהה של הגלאי בתחום הנמדד (600 cm^{-1} - 4000). ניתן לראות, על פי חוק Wien (משוואה 2.16), כי בטמפרטורה זו אורך הגל של נקודת המקסימום של קרינת הגוף השחור של הגלאי עצמו היא $39\mu\text{m}$ (257 cm^{-1}), תחום שנמצא הרחק מהאזור הנמדד.

2.2.5.3 האינטרפרומטר של מיכלסון

כאמור, ספקטרומטר ה- FTIR מבוסס על האינטרפרומטר של מיכלסון. הקרינה האלקטרומגנטית המגיעה ממקור האור פוגעת במפצל קרן אשר מפצל את הקרינה לשתי קרניים אשר אחת מהן עוברת את מפצל הקרן ופוגעת במראה ניידת והקרן השנייה מוחזרת ממפצל הקרן ופוגעת במראה ניידת (שרטוט 2.7). שתי הקרניים מוחזרות מן המראות, מתאחדות מחדש דרך מפצל הקרן וממשיכות אל הגלאי המודד את תמונת ההתאבכות של שתי הקרניים. מפצל הקרן עשוי משכבה דקה של גרמניום (Ge) העטופה משני צדדיה

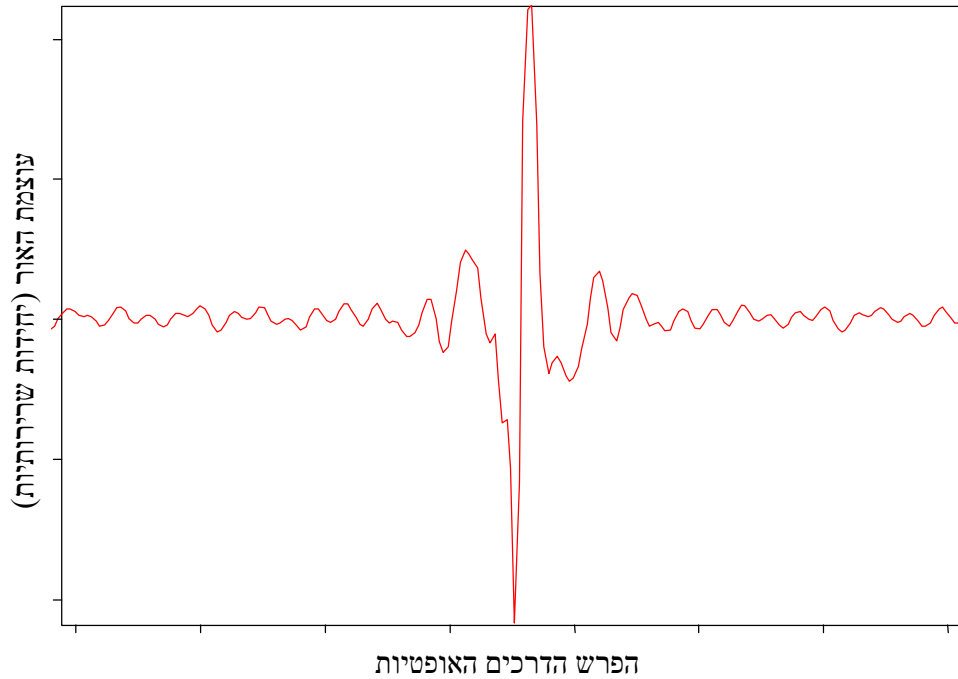
בשכבות אשלגן ברומיד (KBr), המיוחד בחומרים אלו הוא שהם שקופים לקרינת אינפרא אדום בדרגה גבוהה.



שרטוט 2.7 – תאור סכמתי של האינטרפרומטר של מיכלסון

על ידי שינוי מיקום המראה הניידת בצורה רציפה מתקבלת בגלאי אינטרפרוגרמה (גרף 2.8) המייצגת את עוצמת האור I (המתקבלת בגלאי) כפונקציה של מיקום המראה הניידת x (אשר מייצג את הפרש הדרכים האופטיות שעברו הקרניים). מהאינטרפרוגרמה המתקבלת ניתן, בעזרת טרנספורם פורייה (סעיף 2.2.5.4), לקבל ספקטרום המייצג את עוצמת האור המתקבל בגלאי כפונקציה של תדירות האור.

על מנת להקטין את רעש הרקע במדידה ועל ידי כך לשפר את יחס האות לרעש (SNR) מגדילים את מספר הסריקות ומחברים בין האינטרפרוגרמות המתקבלות לקבלת אינטרפרוגרמה שקולה אחת לכל מדידה. במחקר זה ביצענו 128 סריקות עבור כל מדידה.



גרף 2.8 – אינטרפרוגרמה המייצגת את עוצמת האור הנמדדת בגלאי כפונקציה של מיקום המראה הניידת

2.2.5.4 טרנספורם פורייה

טרנספורם פורייה וטרנספורם פורייה הפוך מוגדרים במשוואות 2.17 ו- 2.18 בהתאמה:

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x) e^{-i2\pi\nu x} dx \quad (2.17)$$

$$I(x) = \int_{-\infty}^{\infty} F(\nu) e^{i2\pi\nu x} d\nu \quad (2.18)$$

בעזרת טרנספורם פורייה ניתן לעבור מהאינטרפרוגרמה המייצגת את עוצמת האור כפונקציה

של מיקום המראה הניידת ($I(x)$) לספקטרום המייצג את עוצמת האור כפונקציה של

תדירותו ($F(\nu)$).

כפי שניתן לראות ממשוואות 2.17 ו- 2.18 גבולות האינטגרל בטרנספורם פורייה הם $\pm\infty$, בפועל המראה הניידת מוגבלת בתנועה למרחק סופי. על מנת להתגבר על בעיה זו יש לכפול את האינטרפרוגרמה בפונקציה מתקנת לפני ביצוע הטרנספורם. קיימות מספר פונקציות מתקנות למטרה זו, במחקר זה השתמשנו בפונקציה Blackman-Harris 4-term (19). מאחר ומחשבים דיגיטליים עובדים רק עם מידע דיסקרטי ואינם יכולים לחשב מידע רציף יש להשתמש בטרנספורם פורייה הדיסקרטי (DFT) אשר מוגדר במשוואות 2.19 ו- 2.20:

$$F(k \cdot \Delta \nu) = \sum_{n=0}^{N-1} I(n \cdot \Delta x) e^{\frac{-i2\pi nk}{N}} \quad (2.19)$$

$$I(n \cdot \Delta x) = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} F(k \cdot \Delta \nu) e^{\frac{i2\pi nk}{N}} \quad (2.20)$$

$F(k \cdot \Delta \nu)$ - עוצמת האור הנקלטת בגלאי כפונקציה של תדירות האור

$I(n \cdot \Delta x)$ - עוצמת האור הנקלטת בגלאי כפונקציה של מיקום המראה הניידת

N - המספר הכללי של כל הקריאות בגלאי

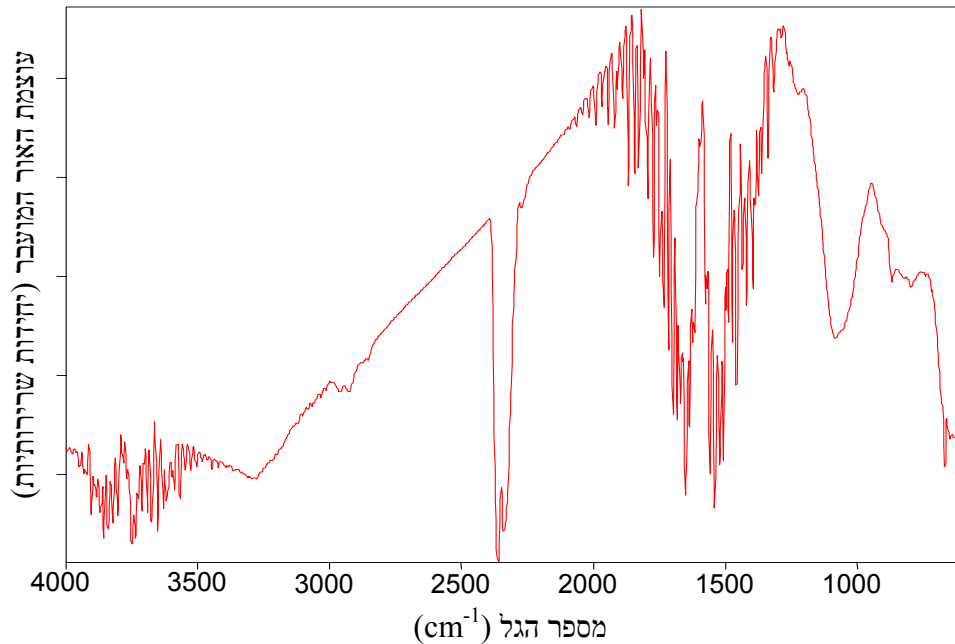
n, k - מספרים טבעיים ($n, k = 0, 1, 2, \dots, N-1$)

$\Delta \nu$ - המרווח בין מספרי הגל של שתי מדידות סמוכות (wavenumber interval)

Δx - השינוי במיקום המראה הניידת בין שתי מדידות סמוכות

כאמור, לאחר ביצוע טרנספורם פורייה על האינטרפרוגרמה המוצגת בגרף 2.8 מתקבל ספקטרום המייצג את עוצמת האור כפונקציה של מספר הגל, כלומר ספקטרום העברה (

transition spectrum) המוצג בגרף 2.9:



גרף 2.9 – ספקטרום ההעברה המתקבל לאחר ביצוע טרנספורם פורייה על האינטרפרוגרמה המוצגת בגרף 2.8

2.3 מחקרים קודמים בספקטרוסקופיה של הדם

בין המחקרים הקודמים שבוצעו בספקטרוסקופיה של הדם בולטות עבודות המחקר שבוצעו על ידי קבוצת המחקר בראשות Henry H. Mantsch. בפרסום משנת 1996 (2) מוצגת השוואה ב- FTIR בין דוגמאות של תאי B שנלקחו מחולי לוקמיה לימפוציטית כרונית (Chronic Lymphocytic Leukemia - CLL) לבין דוגמאות של לימפוציטים שנלקחו מאנשים בריאים כקבוצת ביקורת. בעבודה זו הוצגו הבדלים בין שתי הקבוצות ברמת החלבונים, ה- DNA וחומצות השומן. בדוגמאות המכילות תאים סרטניים נמדדה רמה גבוהה יותר של DNA ורמה נמוכה יותר של חומצות שומן מהדוגמאות שנלקחו מקבוצת הביקורת. כמו כן מוצגת בעבודה זו אנליזה ספקטרלית שבוצעה על ידי שימוש ב- Cluster

Analysis בתחומים $900-1300\text{cm}^{-1}$ ו $1430-1480\text{cm}^{-1}$. בשיטה זו מוצגת הפרדה מוחלטת בין הדוגמאות שנלקחו מחולי הלוקמיה לבין הדוגמאות מקבוצת הביקורת, כמו גם חלוקה של התאים הבריאים לשני תת אשכולות והתאים הסרטניים לשלושה תת אשכולות בהתאם לשוני ברמת ה-DNA וחומצות השומן.

עבודת מחקר נוספת שביצעה הקבוצה הנזכרת לעיל (20) בדקה את החלבונים הנמצאים בממברנה של כדוריות הדם האדומות אשר אחראים בעיקר על מעבר מים וגלוקוז דרך הממברנה. בעבודה זו נבחן הקשר בין המבנה השניוני של חלבונים אלו לבין הפונקציונליות שלהם. המחקר התבצע על ידי השוואת תדירויות בליעה ידועות הקשורות למבנים השניוניים α -helical (ספירלי) ו β -sheet (מישורי) המאפיינים חלבונים לספקטרה של תאי הדם.

מחקר זה הראה שחלבונים ספציפיים אלו מכילים בעיקר מבנה שניוני של α -helical. כמו כן, קיימים מספר מחקרים שהתרכזו במדידת ריכוזים של חומרים שונים בנוזל הדם (פלסמה) על ידי שימוש ב-FTIR (21-23). בין היתר נמדדו ריכוזי הגלוקוז, הכולסטרול והשתנן בנוזל הדם ופותחו שיטות למדידה כמותית של חומרים אלו.

המחקר שבצענו הוא ייחודי מבחינה זו שהוא הראשון הבודק את השינויים הביוכימיים המתחוללים בתאים במהלך הטיפול הכימותרפי על ידי שימוש ב-FTIR-MSP ומאפשר השוואה בין ימי הטיפול השונים בנוסף להשוואה עם קבוצת הביקורת.

3. ביצוע המחקר

3.1. הכנת הדוגמאות

3.1.1. לקיחת הדוגמאות הביולוגיות

במחקר זה עקבנו אחר שלושה ילדים חולי לוקמיה לימפובלסטית חריפה. שני ילדים, בגילאי 15 ו-12, חולי לוקמיה מסוג T (להלן T1 ו-T2 בהתאמה) וילד אחד בגיל 4 חולה לוקמיה מסוג B (להלן B). דוגמאות הדם נלקחו על ידי הצוות הרפואי מהמחלקה ההמטולוגית אונקולוגית ילדים בבית החולים האוניברסיטאי סרוקה. שלושת הילדים קיבלו טיפול כימותרפי סטנדרטי על פי פרוטוקול BFM 95 (Berlin-Frankfurt-Munster 95) (24), המעקב התבצע במהלך החודש הראשון של הטיפול הכימותרפי (Phase 1). כמו כן, נלקחו דגימות דם משבעה ילדים בריאים בחתך גילאים זהה אשר מתוכם נבחרו השלושה בעלי התוצאות הטובות ביותר לשמש כקבוצת הביקורת (כלומר Normal, להלן N).

3.1.2. תהליך הפרדת הדם למרכיביו

תהליך הפרדת הדם למרכיביו בוצע על ידי ערבוב 3 ml דם עם 3 ml תמיסת היסטופק (Histopaque), אשר נרכשה מחברת סיגמה ארה"ב (Sigma USA), התמיסה הועברה בצנטריפוגה בעלת כושר הפרדה של 300g (1100 RPM) במשך 30 דקות בטמפרטורה של 23°C. תמיסת ההיסטופק היא תערובת של חומצת Metrizoic ותמיסת Ficoll בריכוז של 1.077 g/ml. שיטה זו מקובלת בספרות המדעית להפרדת מרכיבי הדם (25).

לאחר העברת התמיסה בצנטריפוגה מתקבלות במבחנה ארבע שכבות המתוארות בצורה

סכמתית בשרטוט 3.1:



שרטוט 3.1 – תאור סכמתי של שכבות מרכיבי הדם המתקבלות במבחנה לאחר צנטריפוגציה
ב – 300g לחצי שעה

שכבת תאי הדם הלבנים נלקחה מתוך המבחנה ונמהלה ב – 10 ml PBS והועברה שוב בצנטריפוגה בהפרדה של 300g במשך 10 דקות בטמפרטורה של 23°C . לאחר בדיקת הדוגמא על מנת לוודא שאינה מזוהמת בתאי דם אדומים היא יובשה על משטח ה – ZnSe במשך מספר שעות ונמדדה בספקטרומטר FTIR-MSP.

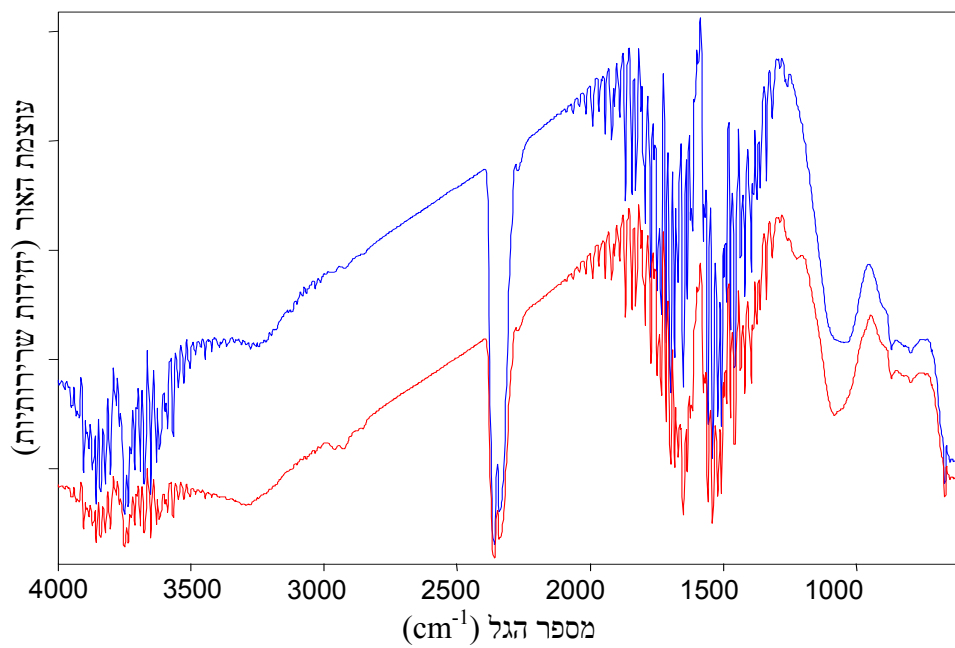
3.1.3. הכנת הדוגמאות ומדידתן

דוגמאות הדם טופלו מיד לאחר לקיחתן לצורך הפקת הלימפוציטים במכון למחקר יישומי במחלקה למדעי החיים של אוניברסיטת בן-גוריון בנגב (תהליך הפרדת הדם לרכיביו מתואר בסעיף 3.1.2). לאחר הפרדת הדם לרכיביו נלקחה מתוך שכבת הלימפוציטים טיפה בנפח 1 μl ויובשה על משטח ZnSe (Zinc-Selenium), שהינו שקוף לקרינה בתחום האינפרא אדום. הייבוש נעשה בתוך מנדף בזרימת אוויר למינרית בטמפרטורת החדר במשך מספר

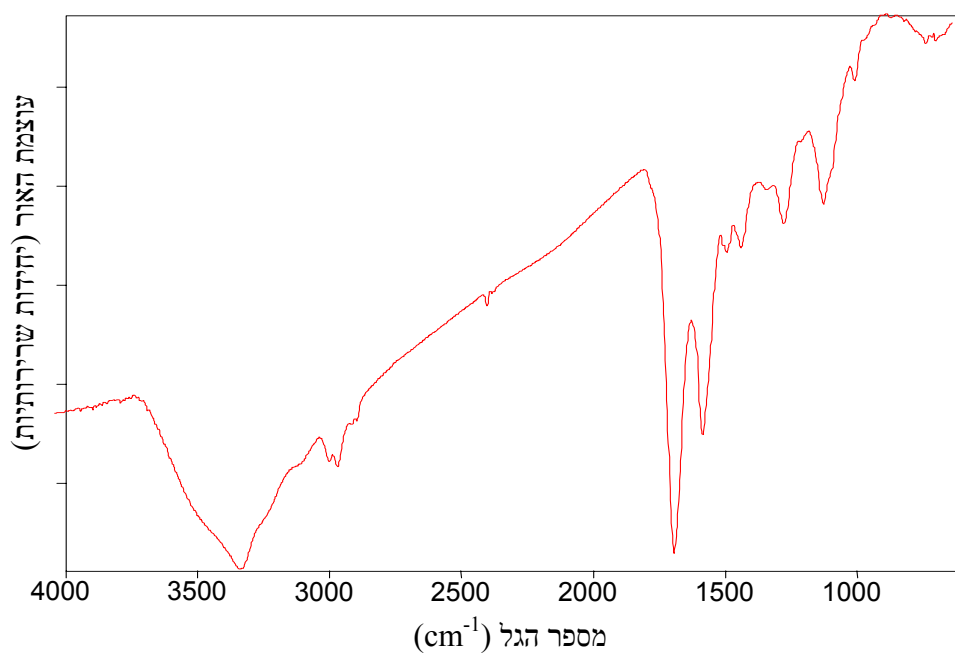
שעות. קיימת חשיבות רבה לייבוש הדוגמאות מאחר ומולקולות המים בולעות בצורה חזקה קרינה בתחום האינפרא אדום ומדידת דוגמא שאינה מיובשת תספק ספקטרום בליעה רווי. הדוגמאות המיובשות נמדדו בספקטרומטר FTIR-MSP אשר תואר בסעיף 2.2.5 בטווח $600-4000\text{cm}^{-1}$. המדידות בוצעו על אזורים מעגלים בקוטר של כ- $100\ \mu\text{m}$, בתוך כל אזור כזה נכנסו כ- 50 תאים. מדדנו עשר מדידות שונות עבור כל דוגמא באזורים שונים של הדוגמא ו- 128 סריקות בכל מדידה. שיטה זו נועדה על מנת לקבל תוצאות אמינות ומדויקות יותר ולשפר את יחס האות לרעש (SNR) של התוצאות. כלומר, עבור כל דוגמא התקבלו עשרה ספקטרה (מעשר המדידות) אשר מתוכם נופו המדידות החריגות (אם היו כאלו) ולאחר מכן בוצע מיצוע על שאר המדידות.

3.2. ביצוע המדידות וניתוח ראשוני של התוצאות

המדידות ועיבוד הנתונים הראשוני בוצעו בעזרת תוכנת OPUS של חברת Bruker. עבור כל דוגמא התבצעה מדידת רקע, כלומר, מדידה של משטח ה- ZnSe ללא דוגמא ולאחר מכן מדידה של הדוגמא הממוקמת על המשטח (גרף 3.2). כעת בוצעה חלוקת הספקטרום המתקבל ממדידת הדוגמא בספקטרום המתקבל ממדידת הרקע (גרף 3.3) וזאת על מנת לנטרל השפעות של גורמים אשר אינם חלק מהדוגמא (כגון אדי מים באוויר, CO_2 , בליעה עצמית של גביש ה- ZnSe וכדומה).



גרף 3.2 – ספקטרום העברה של מדידת הרקע (כחול) ומדידת הדוגמא (אדום)



גרף 3.3 – הספקטרום המתקבל לאחר חלוקת ספקטרום הדוגמא בספקטרום הרקע

בשלב הבא מבצעים מעבר מספקטרום העברה לספקטרום בליעה בעזרת הקשר המתמטי:

$$AB = -\log(TR) \quad (3.1)$$

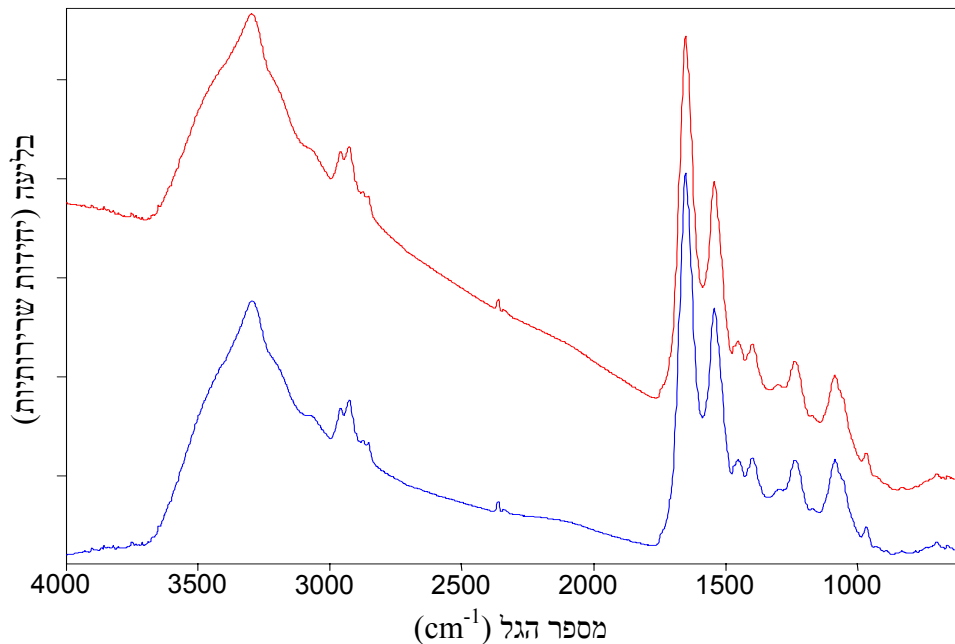
AB - ספקטרום הבליעה

TR - ספקטרום העברה

ולבסוף נמחקו מהספקטרום קווי הבליעה הייחודיים ל CO_2 (על ידי יישור קטע הספקטרום בטווח $2415\text{cm}^1 - 2255$) ובוצע עבור כל ספקטרום תיקון קו הבסיס (Baseline correction) ונרמול (Normalization) כמתואר בסעיפים 3.2.1, 3.2.2.

3.2.1 תיקון קו הבסיס

תיקון קו הבסיס של ספקטרום הבליעה התבצע בשיטה הקרויה Rubberband correction. בשיטה זו מחלקים את הספקטרום ל – 64 קטעים בגודל זהה ומחברים את נקודות המינימום של כל הקטעים על מנת ליצור את קו הבסיס של הספקטרום. בשלב הבא מתאימים פונקציה מתמטית (פולינום) לקו הבסיס ומחסירים את הפונקציה מהספקטרום. כך מתקבל ספקטרום עם קו בסיס המיושר לאפס (גרף 3.4).



גרף 3.4 – ספקטרום בליעה לפני תיקון קו הבסיס (אדום) ואחרי התיקון (כחול)

3.2.2. נרמול

על מנת לאפשר השוואה בין ספקטרה המתקבלים מדוגמאות שונות, עברו כל הספקטרה נרמול וזאת בכדי לנטרל השפעות של גורמים חיצוניים או שרירותיים כגון עובי הדוגמא, מיקום המדידה על הדוגמא וכדומה. כל הספקטרה עברו נרמול Min-Max, בנרמול זה משווים את נקודת המינימום בספקטרום לאפס ואת נקודת המקסימום לשתיים תוך שמירת היחס בין ערכי הבליעה השונים בספקטרום. מאחר ובדוגמאות ביולוגיות הנמדדות בתחום תדרים זה הבליעה החזקה ביותר היא תמיד של תרכובת אורגנית הקרויה Amide 1 ($\sim 1650\text{cm}^{-1}$), נרמול זה נקרא גם בשם Amide 1 normalization.

3.2.3. אנליזות נוספות

בנוסף לאנליזות שתוארו לעיל ובוצעו על כל הספקטרה שנמדדו, ביצענו מספר אנליזות נוספות על מנת למקד את ההבדלים בין הספקטרה השונים ולהבין אותם טוב יותר. האנליזות בוצעו בעזרת התוכנות הבאות:

- Bruker OPUS 3.01 של חברת Bruker
- Microcal Origin 6.0 של חברת Microcal
- Microsoft Excel 2000 של חברת Microsoft

בין היתר חישבנו את סטיית התקן (Standard Deviation) עבור ממוצעי המדידות אשר נלקחו מאותה הדוגמא או מדוגמאות זהות (במקרה של קבוצת הבקרה) על מנת להעריך את השגיאה בתוצאות, חישבנו את הנגזרת השנייה של הספקטרה (סעיף 3.2.3.1), ביצענו אינטגרציה על קטעים בספקטרה, חישבנו את יחס עוצמת הבליעה בין תדרים שונים וביצענו מיון וסיווג של הספקטרה בשיטת Cluster analysis (סעיף 3.2.3.2).

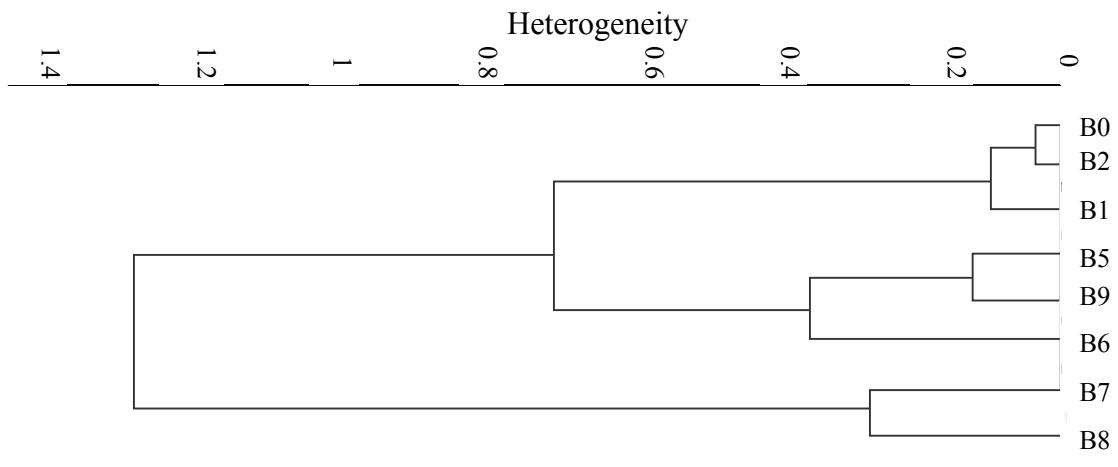
3.2.3.1. נגזרת שנייה

על ידי ביצוע נגזרת שנייה על הספקטרום מתקבל גרף אשר בו כל נקודת מינימום מייצגת נקודת מקסימום בגרף המקורי ולהפך. הפיקים המתקבלים בגרף הנגזרת השנייה, חדים יותר מאשר בספקטרום המקורי דבר המאפשר להבחין בצורה קלה יותר אם קיימת הסחה בתדר (Frequency Shift) אשר מעידה על שינויים בתנאים הסביבתיים של הקשר המולקולרי הבולע את הקרינה. כמו כן קיימים קווי בליעה אשר קשה להבחין בהם בגרף המקורי מאחר והם קרובים לקווי בליעה חזקים מהם וחופפים להם בצורה חלקית. קווי בליעה אלו יופיעו

בגרף המקורי בצורת כתף או שלא יופיעו כלל, לעומת זאת בגרף הנגזרת השניה ניתן להבחין בקווי בליעה אלו בקלות.

Cluster Analysis 3.2.3.2

Cluster Analysis היא שיטה מתמטית למיון וסיווג נתונים לקבוצות על פי מידת סמיכותם זה לזה. במחקר זה השתמשנו בשיטת השונות המינימלית של Ward. שיטה זו מתבצעת בצורה של אנליזה היררכית, כלומר, בשלב ראשון הגדרת כל ספקטרום (או חלק ממנו) כקבוצה, לאחר מכן מציאת זוג הקבוצות הקרוב ביותר וקיבוצו לקבוצה אחת, חזרה על התהליך של מציאת כל פעם זוג הקבוצות הקרוב ביותר וקיבוצו, עד אשר נשארת רק קבוצה אחת. הגדרת הקרבה בין שני ספקטרה (או תחום מסוים בהם) מתבצעת על ידי מציאת המרחק בין הספקטרה בכל תדר בטווח הנבחר וחישוב ממוצע מרחקים אלו, זוג הספקטרה בעל ממוצע המרחקים הקטן ביותר הוא הקרוב ביותר והוא יהיה זה שיקובץ ראשון (26). תוצאות האנליזה מוצגות בגרף דו-ממדי המציג את ההטרונגניות בציר אחד ואת הספקטרה השונים בציר השני, גרף כזה מכונה בשם דנדוגרמה ומוצג לדוגמא בגרף 3.5. הטרונגניות השווה לאפס מעידה על זהות מוחלטת בין הספקטרה בתחום שנבדק. לעומת זאת הטרונגניות הגדולה מ-1 נחשבת להטרונגניות גבוהה המעידה על שוני רב בין הספקטרה.

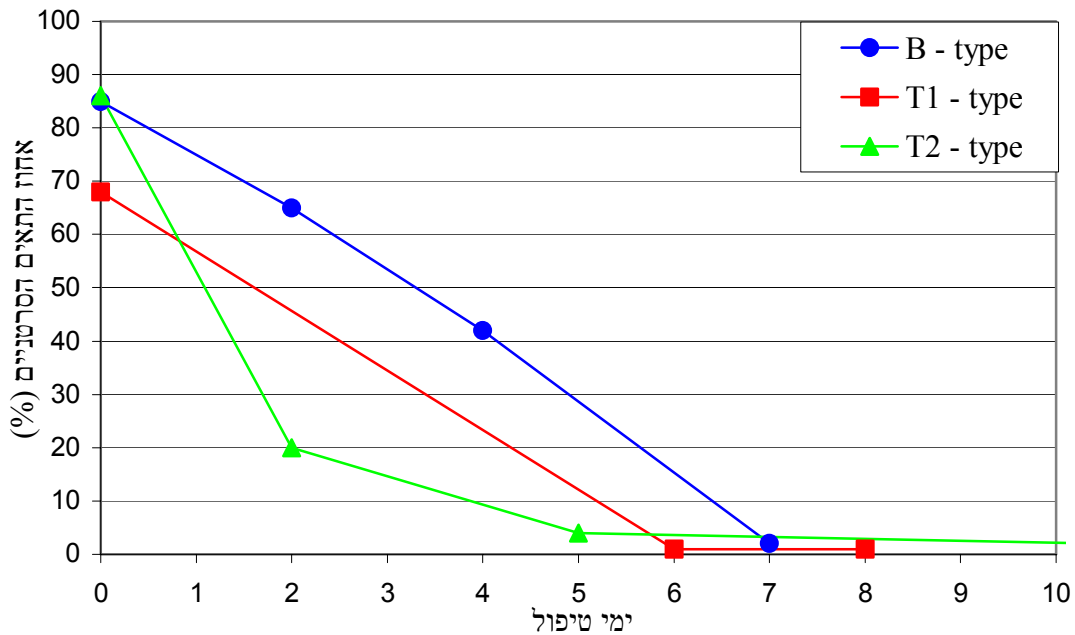


גרף 3.5 – דנדוגרמה המייצגת את תוצאות חישוב ה- Cluster analysis בשיטת השונות המינימלית של Ward

4. תוצאות

4.1 ספירת התאים הסרטניים

במהלך הטיפול הכימותרפי בוצעה מספר פעמים ספירה של אחוז התאים הסרטניים בדם (Blasts) על ידי הצוות הרפואי על מנת לעקוב אחר התקדמות הטיפול. ספירה זו בוצעה על ידי צביעה היסטוכימית וספירה ויזואלית (בעזרת מיקרוסקופ) של מספר התאים הבריאים והסרטניים למיקרוליטר, תוצאות ספירה זו מוצגות בגרף 4.1. ניתן לראות כי עבור שלושת החולים ירד אחוז התאים הסרטניים בצורה דרמטית ל – 0% תוך כשבוע כתוצאה מהטיפול הכימותרפי שניתן על פי הפרוטוקול.



גרף 4.1 – אחוז התאים הסרטניים בדם כפונקציה של ימי הטיפול (יום 0 מייצג את הספירה של התאים הסרטניים שבוצעה לפני תחילת הטיפול הכימותרפי)

4.2 מיקרוספקטרוסקופיה ב – FTIR

גרפים 4.2, 4.3, 4.4 מציגים את הספקטרה (ואת הנגזרת השניה) שמדדנו בספקטרומטר ה – FTIR-MSP ביום אפס (לפני הטיפול) ובשני ימים נוספים עבור חולי הלוקמיה מסוג B, T1, T2 בהתאמה. הבליעה החזקה ביותר מתקבלת עבור אמיד I ($\sim 1650\text{cm}^{-1}$). בליעה זו נובעת בעיקר מויברציות המתיחה של C=O (80%) עם צימוד חלש לויברציות המתיחה של C-N (20%). מאחר ובליעה זו היא החזקה ביותר בספקטרום הבליעה של הדם היא משמשת לנרמול הספקטרה. בליעה חזקה נוספת מתקבלת עבור הקו המכונה אמיד II ($\sim 1545\text{cm}^{-1}$). בליעה זו נובעת מויברציות הכיפוף של CNH (60%) ומויברציות המתיחה של C-N (40%). לאמיד II קיימים מספר קווי בליעה נוספים ב – 1245, 1310, 1390, 1450cm^{-1} . שני קווי בליעה אלו (אמיד I, II) רגישים למבנה השניוני של החלבונים (20). קווי הבליעה ב – 1084cm^{-1} וב – 1237cm^{-1} נובעים מויברציות המתיחה הסימטרית והאנטי-סימטריות בהתאמה של קבוצת ה – PO_2 שנמצאות בעיקר בחומצות הגרעין של התא. קו הבליעה ב – 1045cm^{-1} (מופיע ככתף) נוצר מאופני הויברציה של קבוצות CH_2OH ומצימוד של ויברצית המתיחה C-O עם ויברצית הכיפוף C-O בקבוצות C-OH המופיעות בפחמימות (כגון גלוקוזה, פרוקטוזה וגליקוגן) (27).

גרף 4.5 מציג את הספקטרה שמדדנו בתחום $2600\text{-}3200\text{cm}^{-1}$ עבור שלושת החולים באותם הימים שמוצגים בגרפים 4.2-4.4. הבליעה בתחום מספרי הגל $2800\text{-}3000\text{cm}^{-1}$ מתאימה למתיחה הסימטרית ($\sim 2852\text{cm}^{-1}$) והאנטי-סימטרית ($\sim 2923\text{cm}^{-1}$) של קבוצות ה – CH_2 ו – CH_3 הנמצאות בחלבונים, בחומצות הגרעין ובפוספוליפידים (Phospholipids).

(. עבור כל חולה מוצגים ימים אחרים של הטיפול, מאחר וכל חולה מגיב בצורה שונה לטיפול הכימותרפי.

4.2.1. חולה לוקמיה מסוג B

גרף 4.2a מציג את הספקטרה שקיבלנו עבור חולה לוקמיה מסוג B ביום אפס, יום 2 ויום 7 של הטיפול הכימותרפי. ניתן להבחין בירידה מסוימת בעוצמת הבליעה בתחום 1500cm^{-1} ביום 2 לעומת יום אפס ובירידה משמעותית יותר ביום 7, תוצאות אלו נמצאות בהתאמה טובה לאחוז התאים הסרטניים המוצגים בגרף 4.1. גרף 4.2b מציג את הנגזרת השנייה של הספקטרה בימים אפס ו-7, בגרף זה ניתן להבחין בהבדלים משמעותיים הן בעוצמה והן בהסחה בתדר (Frequency Shift) בנקודות המינימום ב- 965, 1080, 1100 cm^{-1} , כמו כן ניתן להבחין בהסחה בתדירויות של המינימא בתחום $1400\text{-}1500\text{cm}^{-1}$. בתחום מספרי הגל $2600\text{-}3200\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.5a) קיימת ירידה בעוצמת הבליעה בצורה סימטרית לאורך הטיפול מיום 0 לימים 2 ו-7.

4.2.2. חולה לוקמיה מסוג T1

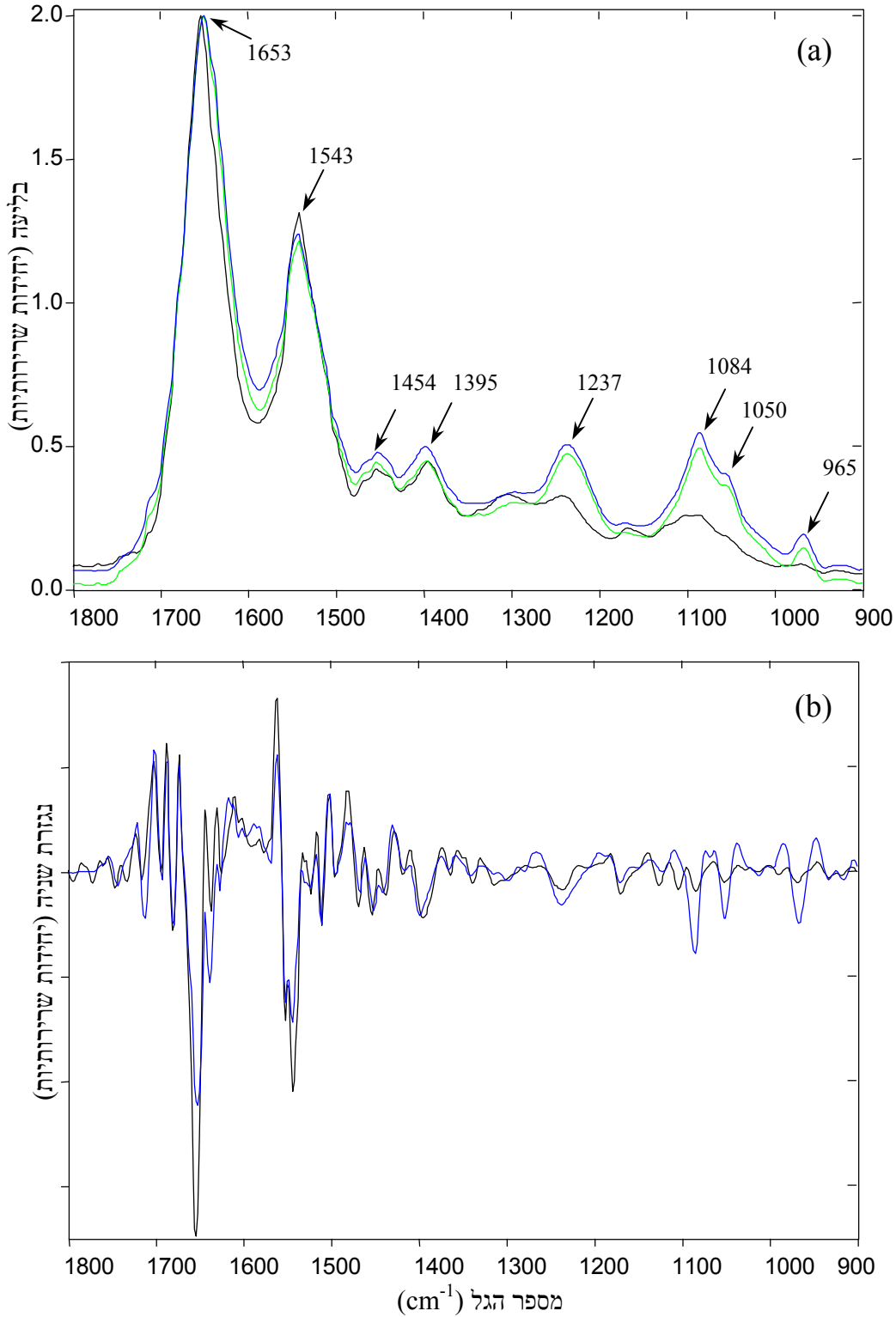
גרף 4.3a מציג את הספקטרה שקיבלנו עבור חולה לוקמיה מסוג T1 ביום אפס, יום 1 ויום 3 של הטיפול הכימותרפי. במקרה זה קיימים הבדלים בעוצמת הבליעה בתחום $1500\text{-}1350$. כמו כן ניתן להבחין בהבדלים באזור 1050cm^{-1} כאשר הכתף התרחבה עבור ימים 1 ו-3 לעומת יום אפס ובהחלשות הפיק החלש באזור 965cm^{-1} . גרף 4.3b מציג את הנגזרת השנייה של הספקטרה בימים אפס ו-3, בגרף זה ניתן להבחין בהסחה בתדר ($\pm 2\text{-}6\text{ cm}^{-1}$) בתחומים $1000\text{-}1100\text{cm}^{-1}$ ו- $1400\text{-}1550\text{cm}^{-1}$, הבדלים

אלו גדולים בצורה משמעותית לעומת ההבדלים המופיעים עבור חולה הלוקמיה מסוג B (גרף 4.2b). בתחום $2600-3200\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.5b) לא התגלו הבדלים משמעותיים בין יום 0 ליום 1, אולם ביום 3 קיימת עליה מסוימת בעוצמת הבליעה.

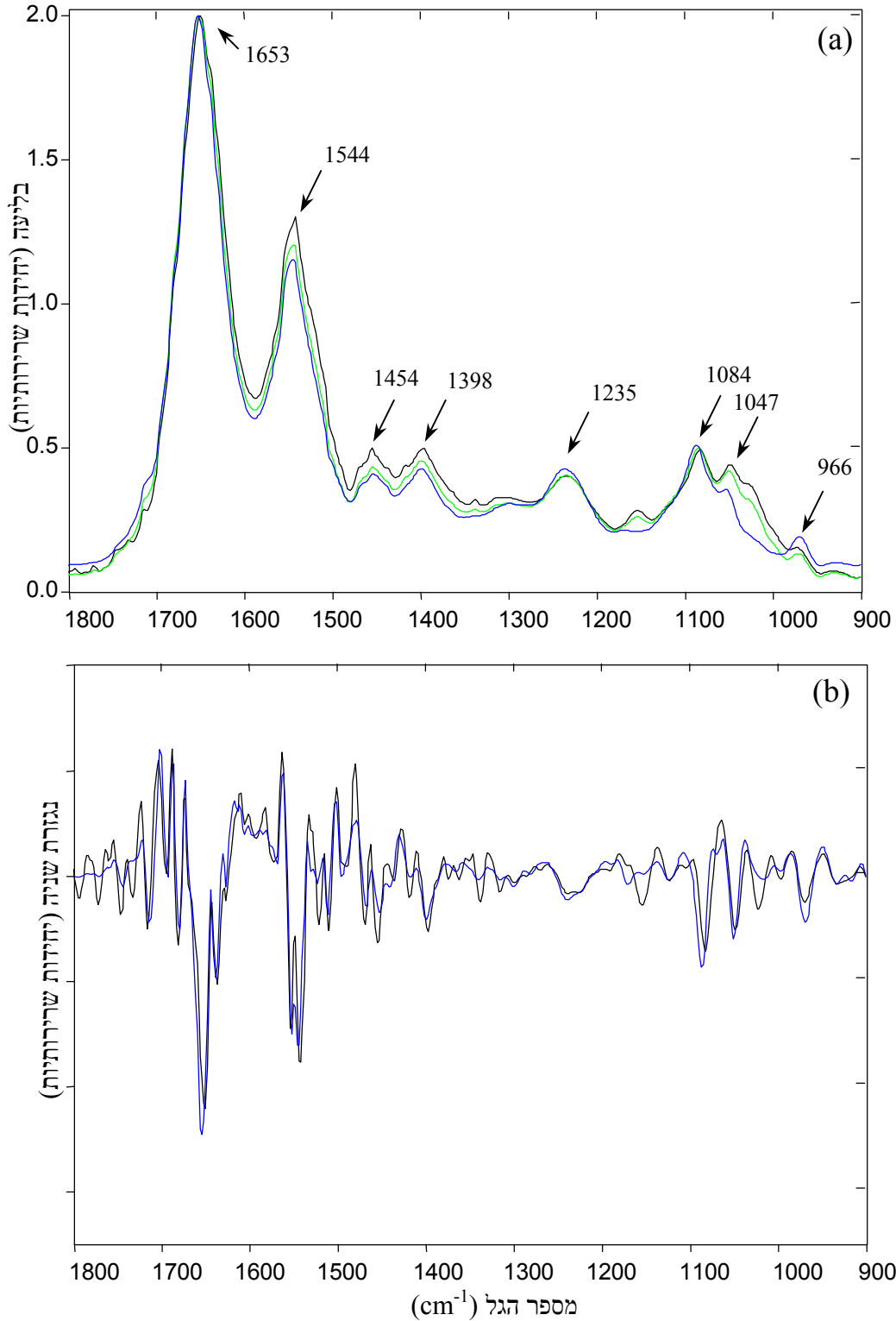
4.2.3 חולה לוקמיה מסוג T2

גרף 4.4a מציג את הספקטרה שקיבלנו עבור חולה לוקמיה מסוג T2 ביום אפס, יום 1 ויום 7 של הטיפול הכימותרפי. ההבדלים במקרה זה דומים להבדלים שנצפו עבור חולה הלוקמיה מסוג B (גרפים 4.2a, 4.2b). ניתן להבחין בירידה משמעותית בעוצמת הבליעה בתחום $1000-1300\text{cm}^{-1}$ ביום 7 לעומת יום אפס, כמו כן הפיק החלש באזור 968cm^{-1} נעלם לחלוטין ביום השביעי של הטיפול. בתחום $1280-1360\text{cm}^{-1}$ הבליעה עבור יום 7 היא החזקה ביותר.

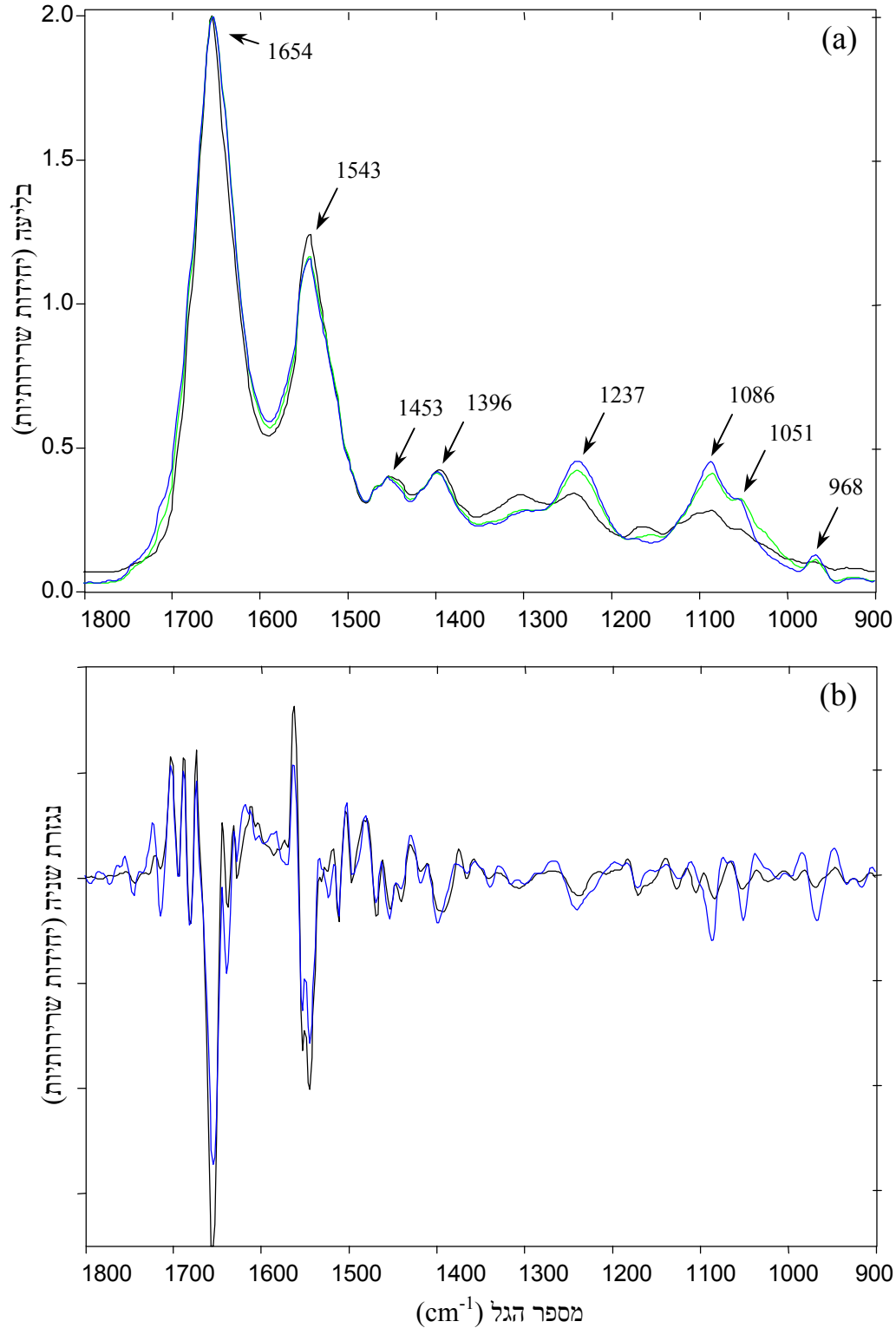
גרף 4.4b מציג את הנגזרת השניה של הספקטרה בימים אפס ו-7, בגרף זה ניתן להבחין בהסחה בתדר של לא יותר מ- 3cm^{-1} בתחומים $1000-1100\text{cm}^{-1}$ ו- $1400-1550\text{cm}^{-1}$ בדומה לחולה לוקמיה T1 (גרף 4.3b). בתחום $2600-3200\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.5c) קיימת עליה קלה בעוצמת הבליעה בין יום 0 ליום 1 ולאחר מכן ירידה בעוצמה ביום 7. אם כי, ההבדלים בגרף זה בין הימים השונים קטנים יחסית.



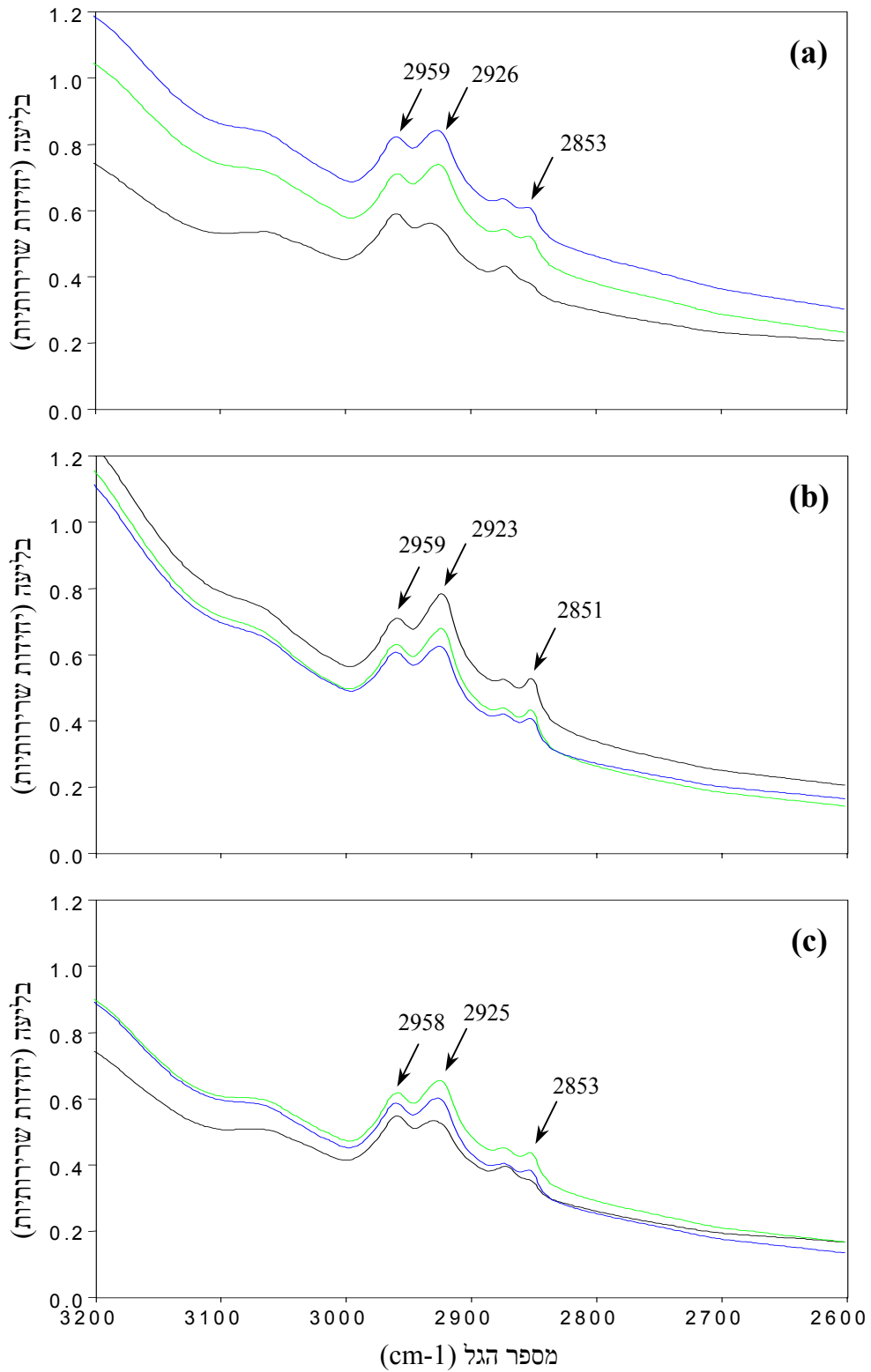
גרף 4.2 – (a) ספקטרה עבור חולה לוקמיה מסוג B לפני הטיפול הכימותרפי (כחול) אחרי שני ימי טיפול (ירוק) ואחרי שבוע (שחור) (b) הנגזרת השניה של הספקטרה עבור יום אפס (כחול) ויום 7 (שחור)



גרף 4.3 – (a) ספקטרה עבור חולה לוקמיה מסוג T (T1) לפני הטיפול הכימותרפי (כחול)
 אחרי יום טיפול (ירוק) ואחרי שלושה ימי טיפול (שחור) (b) הנגזרת השנייה של הספקטרה עבור
 יום אפס (כחול) ויום 3 (שחור)



גרף 4.4 – (a) ספקטרה עבור חולה לוקמיה מסוג T (T2) לפני הטיפול הכימותרפי (כחול)
 אחרי יום טיפול (ירוק) ואחרי שבוע (שחור) (b) הנגזרת השניה של הספקטרה עבור יום אפס
 (כחול) ויום 7 (שחור)



גרף 4.5 – ספקטרה עבור חולה B – ימים: 0 (כחול), 2 (ירוק) ו- 7 (שחור) חולה T1 – ימים: 0 (כחול), 1 (ירוק) ו- 3 (שחור) חולה T2 – ימים: 0 (כחול), 1 (ירוק) ו- 7 (שחור)

4.3 סמנים ביולוגיים

בגרפים הבאים (4.9 - 4.6) יום 0 מייצג את המדידה שנלקחה לפני תחילת הטיפול ו- HC (Healthy Control) מייצג את ממוצע המדידות שנלקחו משלושה ילדים בריאים (ממוצע על שלושים מדידות סך הכל) כקבוצת בקרה. תחומי השגיאה בגרפים אלו מייצגים את סטיית התקן המקסימלית שהתקבלה. השגיאות חושבו מתוך הספקטרה שנמדדו באזורים שונים מכל דוגמא כמתואר בסעיף 3.1.3.

גרף 4.6 מציג את השינויים ברמת הפוספטים בתאים כפונקציה של ימי הטיפול הכימותרפי עבור שלושת החולים שבדקנו (B, T1, T2). נתון זה מתקבל מתוך מדידת עוצמת הבליעה ב- 1084cm^{-1} הנובעת מויברצית המתיחה הסימטרית של קבוצת הפוספט בחומצות הגרעין של התא. עבור שלושת החולים ניתן להבחין בירידה ברמת הפוספטים כתוצאה מהטיפול הכימותרפי. עבור חולה הלוקמיה מסוג B (גרף 4.6a) הירידה ברמת הפוספטים היא יחסית מתונה ואחידה במהלך כל הטיפול, לעומת זאת עבור שני חולי הלוקמיה מסוג T הירידה ברמת הפוספטים היא חדה יותר. אצל החולה הראשון (T1 - גרף 4.6b) רמת הפוספטים נשארת קבועה יחסית במהלך השבוע הראשון של הטיפול ולאחר מכן קיימת ירידה חדה לעומת זאת אצל החולה השני (T2 - גרף 4.6c) הירידה קיימת כבר בתחילת הטיפול.

קווי הבליעה ב- 1045cm^{-1} וב- 1025cm^{-1} נוצרים מאופני הויברציה של קבוצות CH_2OH ומצימוד של ויברצית המתיחה C-O עם ויברצית הכיפוף C-O בקבוצות C-OH המופיעות בפחמימות (כגון גלוקוזה, פרוקטוזה וגליקוגן) (27).

היחס בין קווי הבליעה $1045/1545\text{cm}^{-1}$ המוצג בגרף 4.7 נותן אומדן לרמת הפחמימות בדוגמא הנמדדת. עבור חולה הלוקמיה מסוג B (גרף 4.7a) ניתן להבחין בירידה מתונה

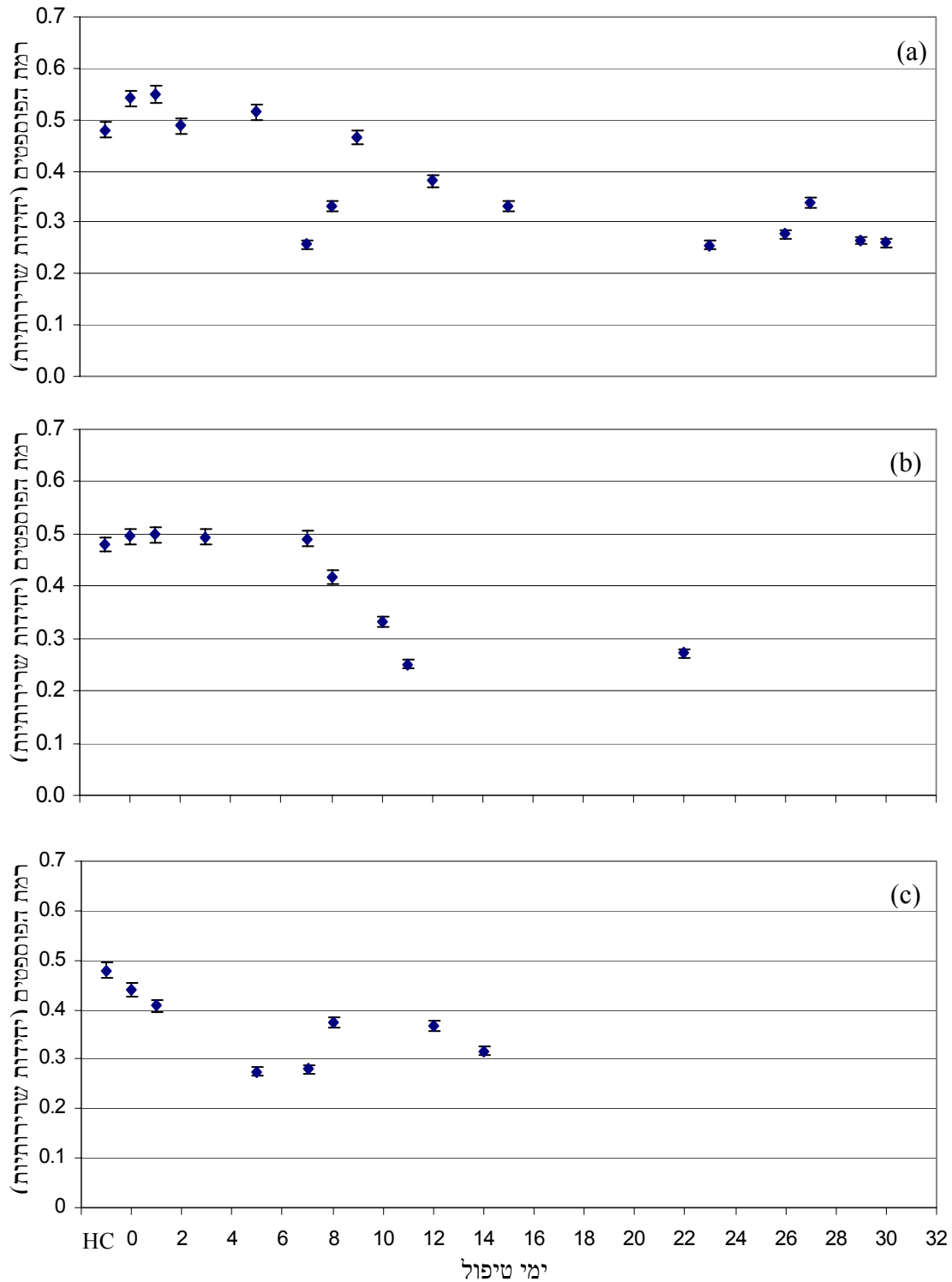
ברמת הפחמימות במהלך הטיפול אם כי גרף זה תנודתי מאוד. לעומת זאת עבור החולה הראשון בלוקמיה מסוג T (T1 – גרף 4.7b) ניתן להבחין כי רמת הפחמימות עולה בתחילת הטיפול ויורדת בצורה חדה החל מהיום השביעי של הטיפול הכימותרפי. עבור החולה השני בלוקמיה מסוג T (T2 – גרף 4.7c) קיימת גם כן עליה ברמת הפחמימות בתחילת הטיפול ולאחר מכן ירידה אולם גם גרף זה תנודתי.

גרף 4.8 מציג את היחס בין עוצמות הבליעה $1121/1020\text{cm}^{-1}$ אשר מציג בהתאם לספרות את יחס חומצות הגרעין RNA/DNA (28). עבור חולה הלוקמיה מסוג B (גרף 4.8a) רמת ה-RNA/DNA לפני הטיפול הייתה גבוהה במעט מרמה זו בקבוצת הביקורת (HC), בתחילת הטיפול קיימת עליה קלה ברמה זו ולאחריה ירידה עד ליום העשירי של הטיפול הכימותרפי עם תנודתיות בימים 7-8 של הטיפול. בתום החודש הראשון של הטיפול הכימותרפי רמת ה-RNA/DNA גבוהה מעט מן הרמה שהייתה בתחילת הטיפול. גרף זה תנודתי מאוד. גם עבור החולה הראשון בלוקמיה מסוג T (T1 – גרף 4.8b) רמת ה-RNA/DNA לפני הטיפול גבוהה מעט מקבוצת הביקורת אולם במקרה זה קיימת ירידה חדה בתחילת הטיפול ורמה זו נשארת נמוכה עד ליום 8 ולאחריו קיימת עליה. גם כאן לקראת סוף החודש הראשון של הטיפול (יום 22) רמת ה-RNA/DNA גבוהה מעט אך קרובה לרמה שהייתה לפני הטיפול. עבור החולה השני בלוקמיה מסוג T (T2 – גרף 4.8c) רמת ה-RNA/DNA לפני הטיפול הייתה גבוהה ביחס לקבוצת הביקורת. במהלך היומיים הראשונים של הטיפול קיימת ירידה חדה ביחס RNA/DNA ולאחריהם קיימת עליה מסוימת ושוב ירידה בימים 5-9 של הטיפול. יש לציין כי עבור חולה זה הירידה באחוז התאים הסרטניים

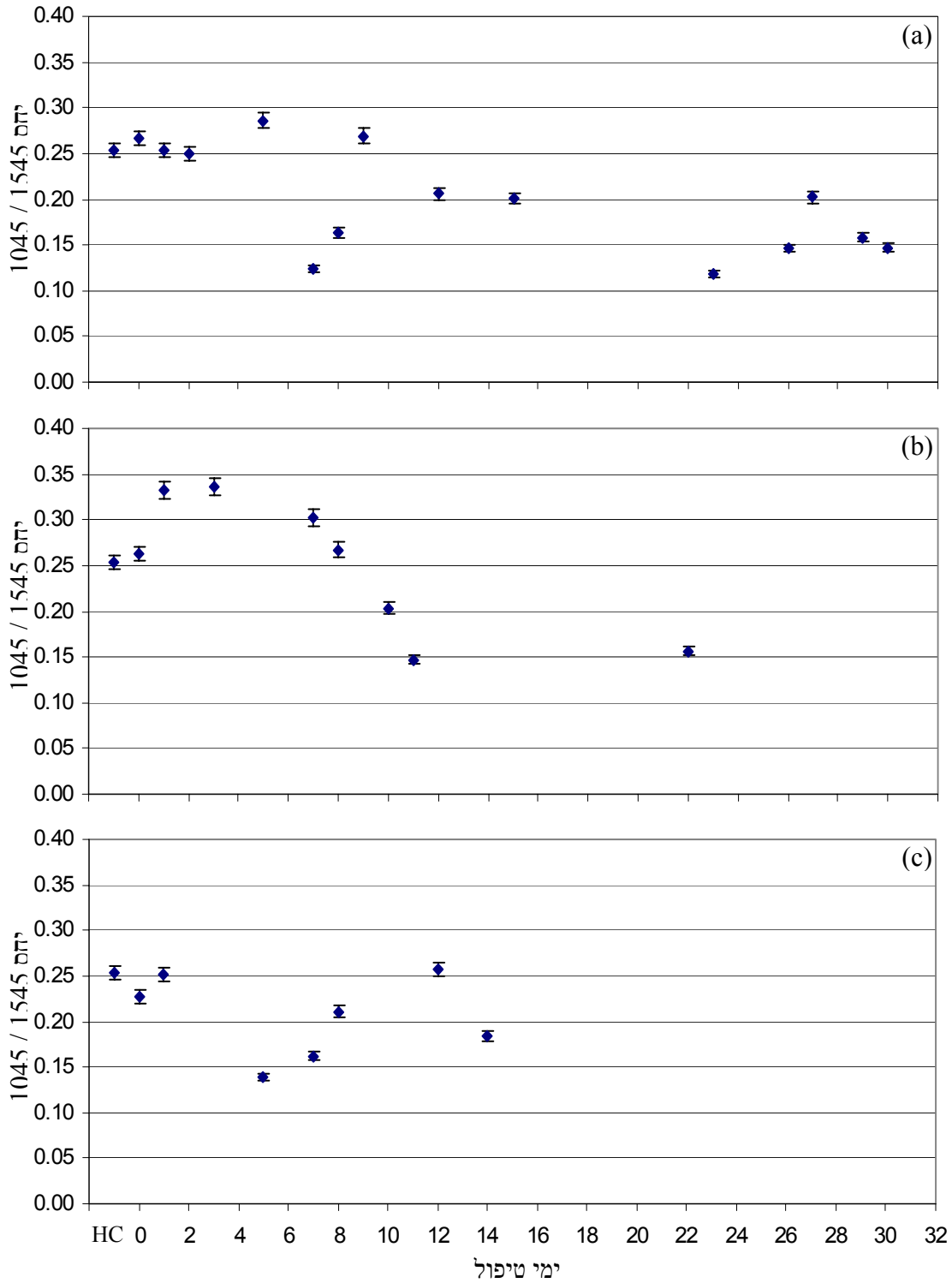
בדם הייתה החדה ביותר (גרף 4.1). עבור החולה T2 לא קיים מידע עבור סוף החודש הראשון של הטיפול.

גרף 4.9 מציג את יחסי האינטגרציות אמיד II / אמיד I. הערך עבור אמיד I התקבל מביצוע אינטגרציה בתחום $1585-1750\text{cm}^{-1}$ והערך עבור אמיד II התקבל מביצוע אינטגרציה בתחום $1480-1585\text{cm}^{-1}$. האינטגרציות משקפות את השטח המתקבל מתחת לספקטרום עד לקו האפס בתחום שחושב.

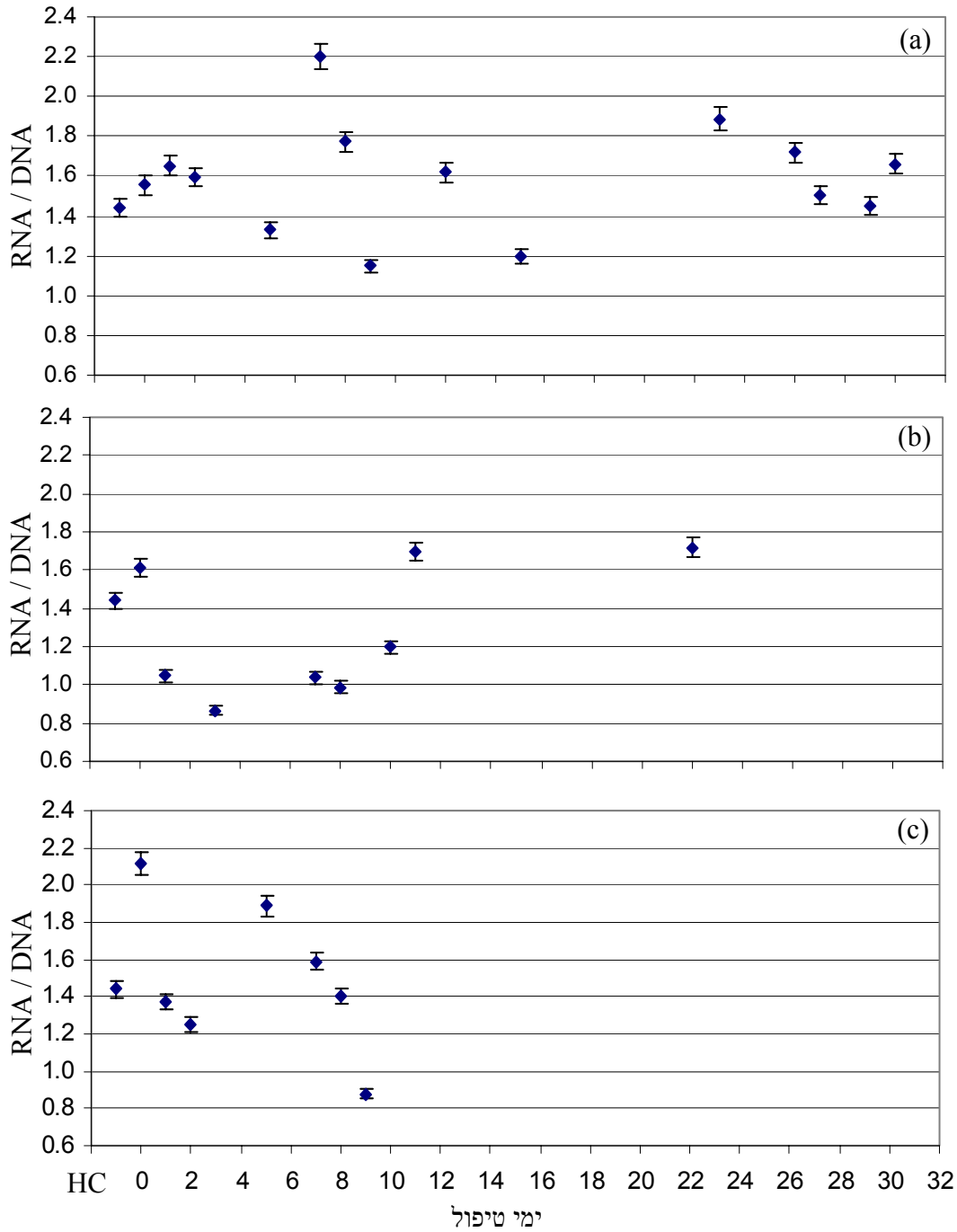
יחס זה קשור בצורה עקיפה לרמת ה – DNA בדוגמא (29). עבור חולה הלוקמיה מסוג B (גרף 4.9a) קיימת עלייה ברמת ה – DNA ביום הראשון של הטיפול הכימותרפי ולאחריה קיימת ירידה עם תגודתיות מסוימת והתייצבות ברמה קרובה לקבוצת הביקורת. עבור החולה הראשון בלוקמיה מסוג T (T1 – גרף 4.9b) רמת ה – DNA לפני הטיפול גבוהה מאוד ביחס לקבוצת הביקורת ולאורך כל הטיפול קיימת ירידה ברמת ה – DNA למעט תגודתיות בימים 11, 8. ביום 22 רמה זו נמוכה יותר מקבוצת הביקורת. גם עבור החולה השני בלוקמיה מסוג T (T2 – גרף 4.9c) רמת ה – DNA לפני הטיפול גבוהה ביחס לקבוצת הביקורת ולאורך הטיפול קיימת ירידה, אם כי גרף זה תגודתי מאוד. יתכן שהשינויים בתכולת ה – DNA של הלימפוציטים קשורה לפעולה של התרופות הכימותרפיות אשר משפיעות בצורה חזקה על סינתזת ה – DNA.



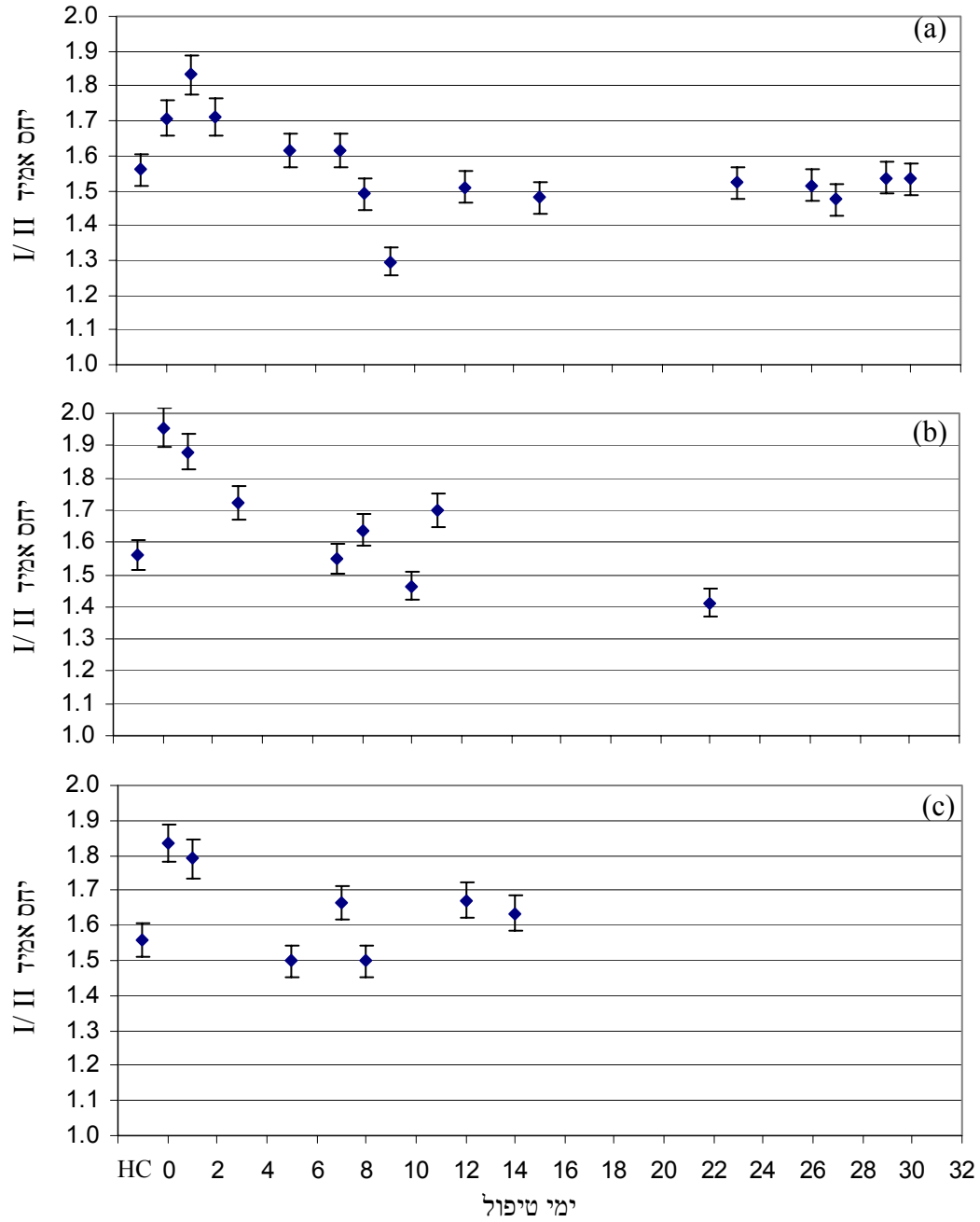
גרף 4.6 – עוצמת קו הבליעה ב 1084cm^{-1} המייצגת את רמת הפוספטם בדוגמא (a) חולה הלוקמיה מסוג B (b) חולה הלוקמיה מסוג T (T1) (c) חולה הלוקמיה מסוג T (T2)



גרף 4.7 – יחס קווי הבליעה $1045/1545\text{cm}^{-1}$ המייצג את רמת הפחמימות בדוגמא (a) חולה הלוקמיה מסוג B (b) חולה הלוקמיה מסוג T (T1) (c) חולה הלוקמיה מסוג T (T2)



גרף 4.8 - יחס קווי הבליעה $1121/1020\text{cm}^{-1}$ המייצג את היחס RNA/DNA בדוגמא (a) חולה הלוקמיה מסוג B (b) חולה הלוקמיה מסוג T (T1) (c) חולה הלוקמיה מסוג T (T2)



גרף 4.9 – יחס האינטגרציות של קווי הבליעה (אמיד II) / (אמיד I) (a) חולה הלוקמיה מסוג B (b) חולה הלוקמיה מסוג T1 (c) חולה הלוקמיה מסוג T2

4.4 Cluster Analysis

4.4.1 חולה לוקמיה מסוג B

גרף 4.10 מציג דנדוגרמות שהתקבלו מחישובי Cluster Analysis שבוצעו על הספקטרה של חולה הלוקמיה מסוג B עבור תשעת הימים הראשונים של הטיפול הכימותרפי. הדנדוגרמה הראשונה (גרף 4.10a) התקבלה מהתחום $1000-1150\text{cm}^{-1}$ אשר בו קיימים קווי הבליעה הנוצרים מהמתיחה הסימטרית של הפוספטים. יום 0 (85% תאים סרטניים) ויום 7 (0% תאים סרטניים) התקבצו בשני אשכולות נפרדים, האשכול הראשי מחולק לשני תתי-אשכול אשר אחד מהם מכיל את ימים 0-2 והשני מכיל את ימים 5, 6 ו-9. הדנדוגרמה השנייה (גרף 4.10b) התקבלה מהתחום $1180-1300\text{cm}^{-1}$ אשר בו קיימים קווי הבליעה הנוצרים מהמתיחה האנטי-סימטרית של הפוספטים. בתחום זה קיימים שני אשכולות המפרידים בצורה ברורה בין יום 0 ליום 7, באשכול השני (התחתון) ניתן לראות כי יום 6 שבו 10-20% תאים סרטניים מופרד מימים 7-9 אשר בהם אחוז התאים הסרטניים הוא אפס (גרף 4.1). איחוד של שני תחומים אלו לתחום $1000-1300\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.10c) מראה שוב שיום 0 ויום 7 מופרדים אם כי בהטרוגניות נמוכה יותר מזו המתקבלת בתחום $1300-1180$. כמו כן, האשכול הראשי מחולק לשני תתי-אשכול בדומה לגרף 4.10a. ביצוע Cluster Analysis בתחום $2800-3000\text{cm}^{-1}$ אינו מניב תוצאות טובות כלומר, לא קיימת הפרדה ברורה בין הימים הראשונים של הטיפול בהם יש עדיין אחוז גבוהה של תאים סרטניים לבין הימים 7-9 בהם אחוז התאים הסרטניים ירד לאפס (לא מוצג גרף עבור תחום זה).

4.4.2. חולה לוקמיה מסוג T1

גרף 4.11 מציג דנדוגרמות שהתקבלו מחישובי – Cluster Analysis שבוצעו על הספקטרה של החולה הראשון בלוקמיה מסוג T (T1) עבור עשרת הימים הראשונים של הטיפול הכימותרפי.

בתחום $1000-1150\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.11a) נראים שני אשכולות עיקריים, בראשון נמצאים יום 0 ויום 10 אשר אינם מופרדים בצורה טובה. באשכול השני קיימים שני תתי-אשכול בהם יום 1 ויום 3 נמצאים בהטרוגניות גבוהה מימים 7 ו- 8. בתחום $1180-1300\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.11b) נוצר אשכול ראשי אשר אינו מפריד בצורה טובה את יום 0 משאר הימים. עבור מספרי הגל הגבוהים בתחום $2800-3000\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.11c) מתקבלת הפרדה טובה בין ימים 0 ו- 1 לבין שאר ימי הטיפול.

4.4.3. חולה לוקמיה מסוג T2

גרף 4.12 מציג דנדוגרמות שהתקבלו מחישובי – Cluster Analysis שבוצעו על הספקטרה של החולה השני בלוקמיה מסוג T (T2) עבור תשעת הימים הראשונים של הטיפול הכימותרפי.

בתחום $1000-1150\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.12a) לא מתקבלת הפרדה טובה בין ימים 0 ו- 1 בהם אחוז התאים הסרטניים גבוה יחסית לעומת ימים 5, 7, 8 ו- 9 בהם אחוז התאים הסרטניים הוא נמוך (כ- 4% ביום 5 ושואף לאפס בימים 7-9). בתחום $1180-3000\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.12b) נראים שני אשכולות עיקריים המפרידים בין ימים 0 ו- 1 לבין ימים 5-9. תוצאה דומה מתקבלת גם אם מאחדים את שני התחומים לתחום $1000-1300\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.12c).

אם כי בגרף זה יום 9 מופרד מימים 8, 7, 5. מעניין לציין שעל פי המידע הרפואי (גרף 4.1)

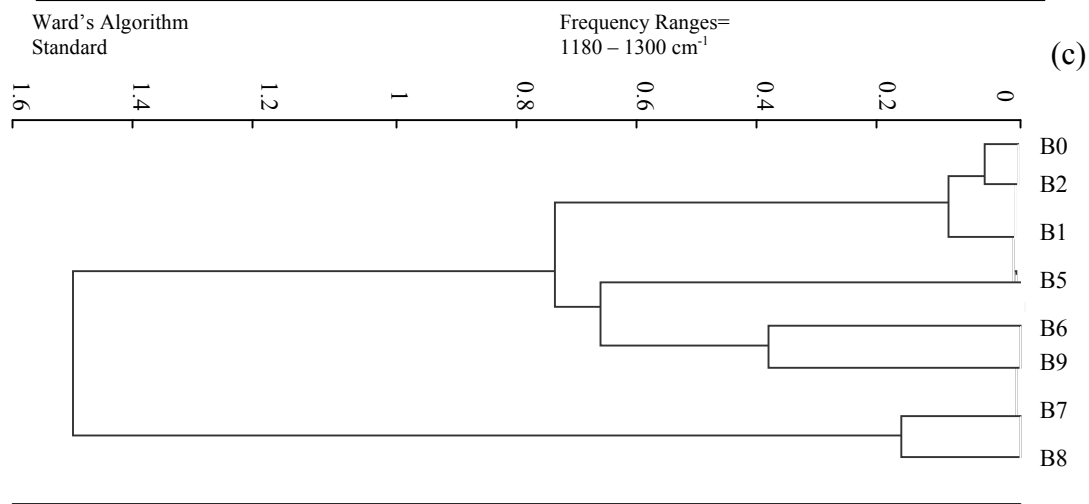
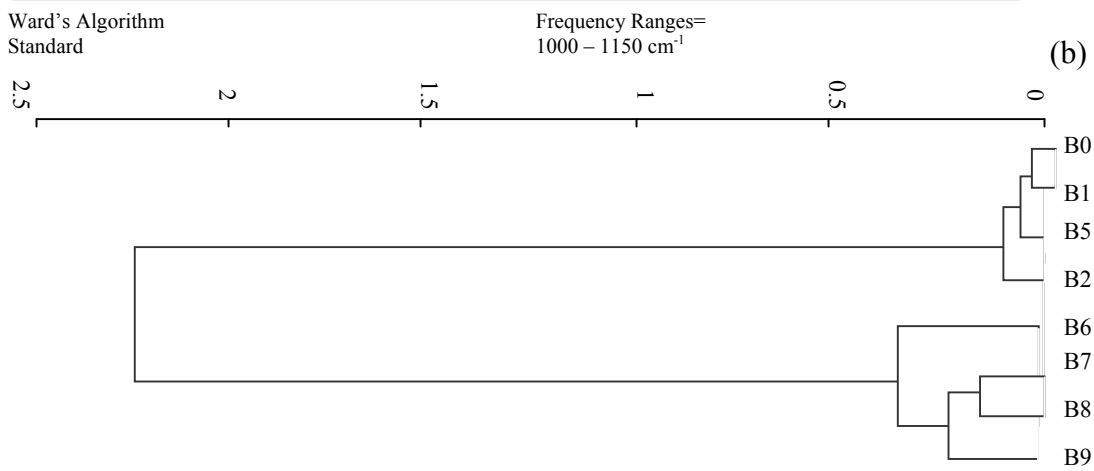
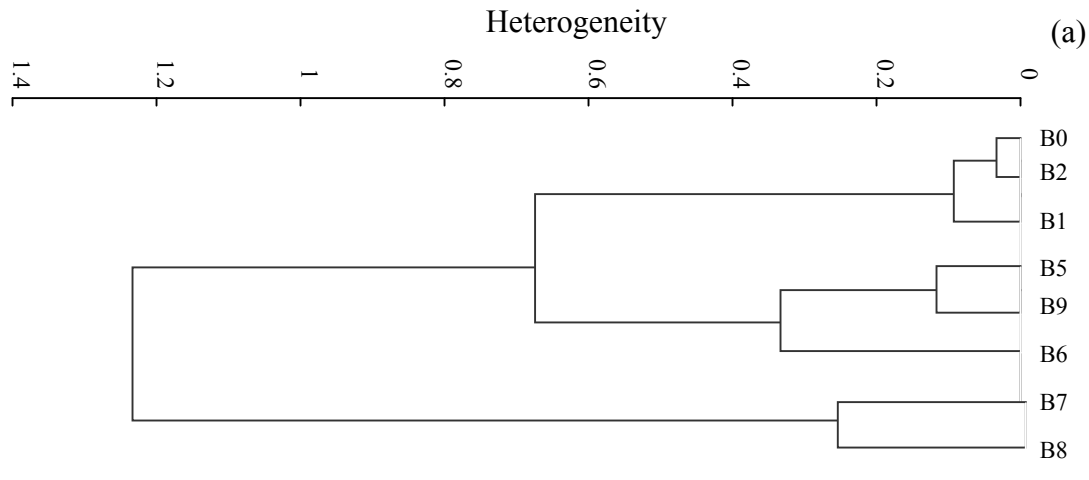
לא קיים הבדל משמעותי בין ימים 5-9.

ביצוע Cluster Analysis בתחום $2600-3600\text{cm}^{-1}$ אינו מניב תוצאות טובות כלומר, לא

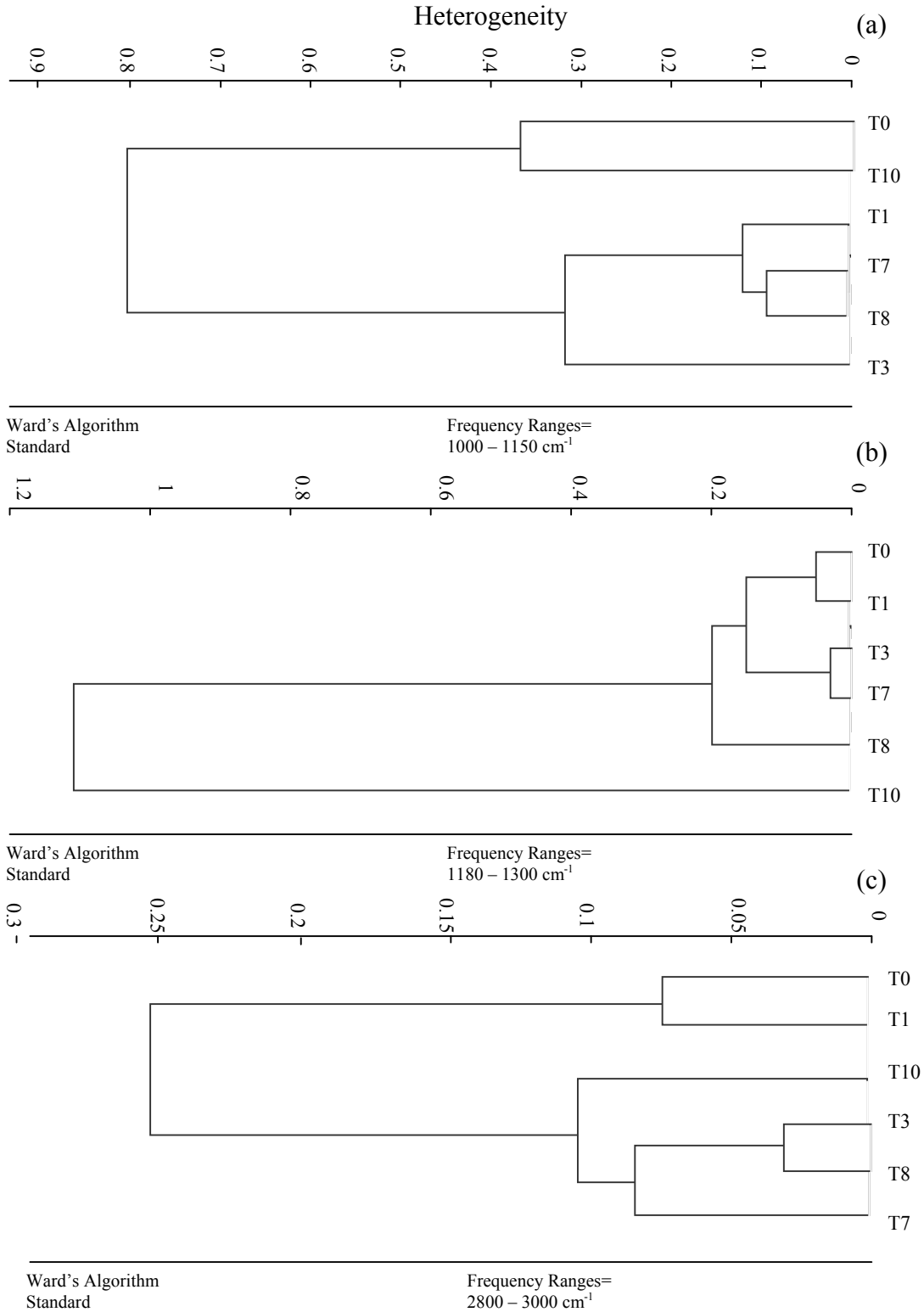
קיימת הפרדה ברורה בין הימים הראשונים של הטיפול בהם יש עדיין אחוז גבוהה של תאים

סרטניים לבין הימים 5-9 בהם אחוז התאים הסרטניים ירד בצורה משמעותית (לא מוצג גרף

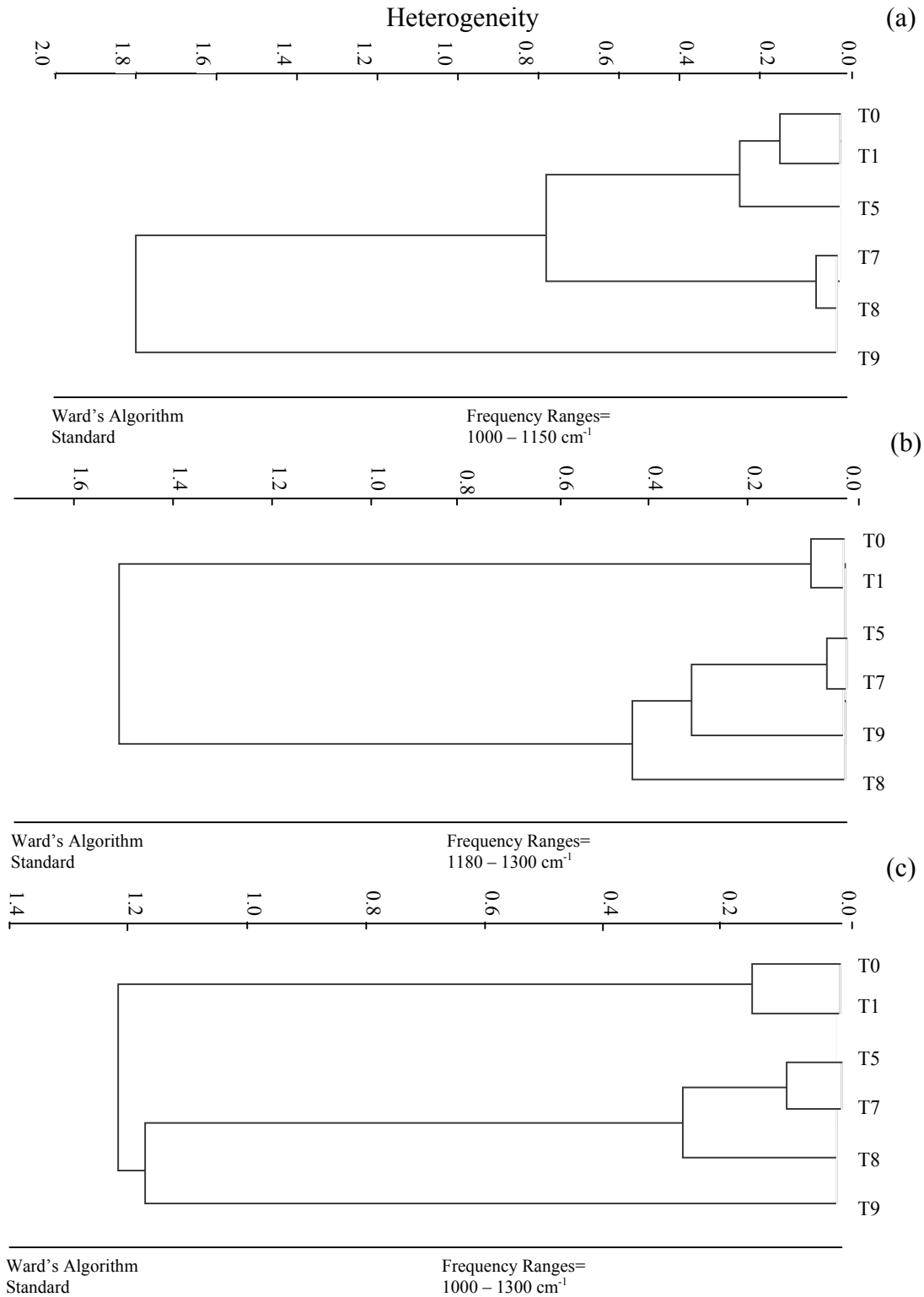
עבור תחום זה).



גרף 4.10 – דנדוגרמות שהתקבלו מחישובי Cluster Analysis על הספקטרה של חולה הלוקמיה מסוג B. כל ספקטרה מיוצג על ידי סוג הלוקמיה (B או T) ומספר המייצג את יום הטיפול. (a) $1000-1150\text{cm}^{-1}$ (b) $1180-1300\text{cm}^{-1}$ (c) $1000-1300\text{cm}^{-1}$



גרף 4.11 – דנדוגרמות שהתקבלו מחישובי Cluster Analysis על הספקטרה של החולה הראשון בלוקמיה מסוג T (T1). (a) $1000-1150\text{cm}^{-1}$ (b) $1180-1300\text{cm}^{-1}$ (c) $2800-3000\text{cm}^{-1}$



גרף 4.12 – דנדוגרמות שהתקבלו מחישובי Cluster Analysis על הספקטרה של החולה השני בלוקמיה מסוג T (T2). (a) $1000-1150\text{cm}^{-1}$ (b) $1180-1300\text{cm}^{-1}$ (c) $1000-1300\text{cm}^{-1}$

5. דיון בתוצאות

בעקבות ההתקדמות שהושגה בשנים האחרונות בשיטות הטיפול הכימותרפיות עלה אחוז החולים המבריאים ממחלת הלוקמיה הלימפובלסטית החריפה (ALL) בילדים עד לכדי 80% . באופן כללי רב התרופות האנטי-סרטניות פועלות על ידי התערבות בסנתזה של חומצות הגרעין או בתפקודן (4,30,31). למרות שאבנורמליות גנטית קיימת בשני סוגי הלוקמיה שבדקנו (ALL מסוג B ו-T) הפרוגנוזה והמשמעות הרפואית של לוקמיה מסוג B חמורים יותר ובחולי לוקמיה מסוג B הסיכוי שהטיפול ייכשל גבוה יותר מאשר בחולי לוקמיה מסוג T (32).

עבור חולה הלוקמיה מסוג B קיימת ירידה משמעותית ברמת הבליעה בתחום 1300cm^{-1} -1000 בין יום 0 ליום 7. תחום זה מתאר את הבליעה של הפוספטים הנוצרים בתהליך חילוף החומרים בתאים ותוצאה זו מתאימה לירידה באחוז התאים הסרטניים בדוגמא מ- 85% לפני הטיפול (יום 0) ועד ל- 0% בתום שבעת הימים הראשונים של הטיפול הכימותרפי (יום 7). יתכן כי ירידה זו מעידה על שינויים משמעותיים בתכולת חומצות הגרעין בתאים כתוצאה מן התרופות הכימותרפיות. עבור שני חולי הלוקמיה מסוג T (T1, T2) השינויים הספקטראליים בתחום זה היו פחות דרמטיים. כאשר בודקים את רמת הבליעה עבור מספר הגל 1084cm^{-1} , המתאים לויברצית המתיחה הסימטרית של קבוצת הפוספט בחומצות הגרעין, ניתן לראות כי עבור חולה הלוקמיה מסוג B קיימת ירידה מתונה ואחידה במהלך הטיפול הכימותרפי, עבור החולה הראשון בלוקמיה מסוג T (T1) רמת הבליעה נשארת קבועה יחסית במהלך השבוע הראשון של הטיפול ולאחר מכן קיימת ירידה חדה ועבור החולה השני בלוקמיה מסוג T (T2) הירידה קיימת כבר בתחילת הטיפול.

תחום הספקטרום $1350-1500\text{cm}^{-1}$ מתאים לבליעה כתוצאה מויברציות הכיפוף בקבוצות CH_2 הנמצאות בחומצות האמינו בחלבונים. בתחום זה קיימת הסחה בתדרי נקודות המינימום של הנגזרת השניה של הספקטרה עבור שלושת החולים שבדקנו. כמו כן קיימים הבדלים בעוצמת הבליעה בין הימים השונים עבור חולה הלוקמיה מסוג B וחולה הלוקמיה מסוג T1 אם כי הבדלים אלו אינם תואמים בין שני חולים אלו. אצל חולה הלוקמיה מסוג T2 לא קיימים הבדלים משמעותיים בעוצמת הבליעה בין הימים השונים בתחום זה. יתכן כי הבדלים אלו נובעים מאחוז התאים הסרטניים השונה בין שלושת החולים בתחילת הטיפול או מהתגובה השונה של כל חולה לטיפול הכימותרפי.

היחס בין קווי הבליעה $1045/1545\text{cm}^{-1}$ מייצג את רמת הפחמימות בדוגמא הנמדדת. עבור חולה הלוקמיה מסוג B קיימת ירידה מתונה ברמת הפחמימות במהלך הטיפול. לעומת זאת עבור חולה הלוקמיה מסוג T2 קיימת עליה ברמת הפחמימות בתחילת הטיפול ולאחר מכן ירידה. עבור שני חולים אלו הגרפים שקיבלנו תנודתיים. עבור חולה הלוקמיה מסוג T1 רמת הפחמימות עולה בתחילת הטיפול ויורדת בצורה חדה החל מהיום השביעי של הטיפול הכימותרפי. ידוע כי אצל ילדים החולים ב - ALL קיימת תופעה של יתר סוכר בדם (Hyperglycemia) (33).

בפרסום משנת 1998 של P. G. Andreus ו R. D. Strickland (28) הוצגו תוצאות המעידות על כך שניתן לבצע מעקב אחר מצבו של גידול לימפתי מתוך היחס RNA/DNA הנמדד על פי יחס קווי הבליעה $1121/1020\text{cm}^{-1}$. במחקר זה בדקנו האם יחס זה יכול לשמש כסמן ביולוגי גם עבור לוקמיה לימפובלסטית חריפה. במקרה של מחלת הלוקמיה,

אחוז התאים הסרטניים בדם יכול להיחשב כמדד לשלב בו נמצאת המחלה. התוצאות של

היחס RNA/DNA עבור שלושת החולים שבדקנו הוצגו בגרף 4.8.

עבור חולה הלוקמיה מסוג B הגרף המתקבל מהיחס RNA/DNA תנודתי מאוד כנראה עקב אפקטים ביולוגיים שמתחוללים בזמן הטיפול ואינו יכול לשמש כמדד אמין למצב המחלה. לעומת זאת, עבור שני חולי הלוקמיה מסוג T מתקבלת ירידה חדה ביחס זה עם נקודת מינימום מקומית ביום 3, ירידה זו חדה יותר עבור החולה השני (T2) בהתאמה עם אחוז התאים הסרטניים בדם שהתקבל באופן בלתי תלוי מהמידע הרפואי. עבור שני חולים אלו מתקבלת עלייה ביחס זה לאחר היום השלישי של הטיפול, כאשר עבור החולה השני (T2) העלייה תלולה יותר ומגיעה לנקודת מקסימום ביום 5 ולאחריה קיימת ירידה מונוטונית. היחס RNA/DNA נותן את התוצאות הטובות ביותר עבור החולה הראשון בלוקמיה מסוג T (T1) ועבור שני החולים הנוספים יחס זה אינו משמש כמדד אמין להתקדמות הטיפול.

עוצמת היחס אמיד I / II מייצגת את רמת ה-DNA בדוגמא כפי שצוין בספרות המדעית (29). עבור שלושת החולים רמת ה-DNA לפני הטיפול הכימותרפי הייתה גבוהה ביחס לקבוצת הביקורת ועבור שלושתם הייתה ירידה ברמה זו לאורך הטיפול, למעט עליה ביום הראשון של הטיפול אצל חולה הלוקמיה מסוג B. בשלושת הגרפים (4.9a, b, c) קיימת תנודתיות שנובעת כנראה מהתגובות הביולוגיות לטיפול הכימותרפי.

במהלך השבוע הראשון של הטיפול הכימותרפי יורד אחוז התאים הסרטניים בדם בצורה דרסטית ובתום כשבוע מתחילת הטיפול מגיע אחוז זה לאפס. מתוך מטרה לבדוק את יכולת ההבחנה בשיטות ספקטרוסקופיות בין דוגמאות שבהן קיים אחוז גבוה של תאים סרטניים

לאילו שבהן לא קיימים תאים סרטניים ביצענו Cluster Analysis על הספקטרה שנמדד במהלך עשרת הימים הראשונים של הטיפול הכימותרפי.

עבור חולה הלוקמיה מסוג B, בדנדוגרמות המתקבלות מביצוע Cluster Analysis בתחומים $1000-1150\text{cm}^{-1}$ ו $1000-1300\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.10a, c) מתקבלת הפרדה טובה בין דוגמאות המכילות תאים סרטניים לאלו שאינן. בנוסף לכך, בשני תחומים אלו האשכול הראשי מחולק לשני תתי אשכולות (B0, B1, B2 ו B5, B6, B9) המפרידים בין ימים בהם אחוז התאים הסרטניים היה גבוה לבין אלו שבהם אחוז זה היה נמוך. התוצאות הטובות ביותר עבור חולה זה התקבלו בתחום $1180-1300\text{cm}^{-1}$ אשר בו נוצרו שני אשכולות ראשיים המפרידים בצורה ברורה בין דוגמאות המכילות תאים סרטניים באחוז גבוה לבין אלו שאינן מכילות תאים סרטניים כלל עם יוצא דופן אחד - דוגמא B6. דוגמא B6 נמצאת בהטרוגניות של 0.35 בעוד שאר הדוגמאות באותו האשכול (B7, B8, B9) המכילות אפס תאים סרטניים יצרו תת אשכול נוסף בהטרוגניות הנמוכה מ - 0.25. ארבע הדוגמאות בהן אחוז התאים הסרטניים גבוה (B0, B1, B2, B5) יצרו אשכול בהטרוגניות נמוכה מאוד של למטה מ - 0.1. הבליעה בתחום זה של הספקטרום ($1180-1300\text{cm}^{-1}$) נובעת בעיקר מויברציות המתיחה האנטי-סימטרית של קבוצת הפוספטים.

עבור החולה הראשון בלוקמיה מסוג T (T1) ביצוע Cluster Analysis בתחומים cm^{-1} $1000-1150$ ו $1180-1300\text{cm}^{-1}$ (גרף 4.11a, b) לא הניב תוצאות טובות, אם כי בתחום $1180-1300\text{cm}^{-1}$ מתקבלת הטרוגניות גבוהה בין הדוגמא T10 לבין שאר הדוגמאות. הבליעה בתחום $2800-3000\text{cm}^{-1}$ נובעת בעיקר מויברציות המתיחה האנטי-סימטרית של קבוצות CH_2 ו CH_3 המצויות בחלבונים, בתרכובות שומניות (Phospholipids)

ובחומצות גרעין. ביצוע אנליזה בתחום זה מספק הפרדה בין הדוגמאות מתחילת הטיפול (T0, T1) לבין שאר הדוגמאות (T3, T7, T8, T10). בתוך הקבוצה השניה T10 נמצא בהטרונגניות גבוהה לשאר הדוגמאות. תוצאות אלו שונות מהמידע הרפואי שהתקבל מספירת התאים (גרף 4.1). יש לציין שכל הדוגמאות המוצגות בדנדוגרמה זו נמצאות בהטרונגניות נמוכה יחסית (~ 0.25).

התוצאות שקיבלנו מהחולה השני בלוקמיה מסוג T (T2) הראו הפרדה טובה בשני התחומים $1000-1150\text{cm}^{-1}$ ו- $1180-1300\text{cm}^{-1}$ המתאימים לויברציות המתיחה הסימטרית והאנטי-סימטרית של קבוצות הפוספטים בהתאמה. הדוגמא שנלקחה ביום החמישי של הטיפול הכימותרפי (T5) נמצאת בתחום הראשון ($1000-1150\text{cm}^{-1}$) קרובה יותר לדוגמאות מתחילת הטיפול ובתחום השני ($1180-1300\text{cm}^{-1}$) דוגמא זו קרובה יותר לשאר הדוגמאות (T7, T8, T9). יש לציין כי על פי המידע הרפואי, שהתקבל מספירת אחוז התאים הסרטניים (גרף 4.1), ביום זה של הטיפול היה אחוז התאים הסרטניים בדם שווה ל- 4% בתחום $1180-1300\text{cm}^{-1}$ קיימת הפרדה ברורה יותר בין הדוגמאות מתחילת הטיפול (T0, T1) לשאר הדוגמאות (T5, T7, T8, T9), הפרדה דומה מתקבלת גם כאשר מאחדים את שני התחומים הנזכרים לעיל ($1000-1300\text{cm}^{-1}$). התוצאות שקיבלנו עבור חולה זה מתאימות בצורה טובה למידע הרפואי. עבור שני החולים B ו- T2 לא התקבלו תוצאות טובות בתחום $2800-3000\text{cm}^{-1}$.

כיום גילוי מחלה שירית מינימלית (Minimal Residual Disease) מתבצעת בעיקר על ידי שימוש ב- PCR (Polymerase Chain Reaction) (4,34) כפי שהוסבר בסעיף 2.1.2. שיטה זו רגישה מאוד אך גם יקרה מאוד לעומת השיטות שביצענו במחקר זה. אנו

מצפים כי על ידי בידוד של תאי B או T משאר תאי הדם הלבנים ניתן יהיה להגביר את הרגישות והדיוק של השיטות שהצענו במחקר זה. כמו כן, איסוף נתונים מחולים נוספים יחזקו את התוצאות שקיבלנו וישפרו את אובייקטיביות הדיאגנוסטיקה והמעקב אחר הטיפול במחלה.

6. מסקנות

מחקר זה הוא חלק מקבוצת מחקרים רחבה המתבצעת כיום בעולם מתוך מטרה לפתח שיטות אופטיות אמינות, מדויקות וזולות למעקב אחר מחלת הסרטן בסוגיה השונים. תוצאות מחקר זה מראות פוטנציאל רב לשימוש בספקטרומטר ה- FTIR-MSP לצורך מעקב אופטי אחר התקדמות הטיפול הכימותרפי בלוקמיה לימפובלסטית חריפה בילדים כמו גם זיהוי השינויים הביוכימיים ברמה המולקולרית המתרחשים במהלך הטיפול דבר שאיננו מתקבל בשיטות האחרות שהזכרנו כגון PCR.

תוצאות המחקר מראות שינוי רב ברמת הפוספטים והפחמימות בתאים כתוצאה מהטיפול הכימותרפי, כמו גם ירידה ברמת ה- DNA לאורך הטיפול. שינויים אלו מתאימים לתוצאות שהתקבלו בשיטות הרפואיות המקובלות. ביצוע Cluster Analysis על תחומים ספציפיים בספקטרה הניב תוצאות טובות של הפרדה בין דוגמאות המכילות תאים סרטניים לבין דוגמאות שאינן מכילות תאים אלו.

מחקר זה מציג תוצאות ראשוניות מעודדות לגבי שימוש עתידי בספקטרוסקופיה באינפרא אדום לזיהוי ומעקב אחר מחלות סרטניות.

7. פרסומים מדעיים שהתקבלו ממחקר זה

1. S. Mordechai, J. Mordechai, Jagannathan Ramesh, **C. Levi**, A. Moser, V. Erukhimovitch, M. Huleihel, and J. Kapelushnik, “Application of FTIR Microscopy for the Follow-up of Childhood Leukemia Chemotherapy”, in Subsurface and Surface Sensing Technologies and Applications III, Cam Nguyen Editor, Proceedings of SPIE Vol. 4491, 243-250, 2001.
2. Jagannathan Ramesh, Kapelushnik J, Mordechai J, Moser A, Huleihel M, Erukhimovitch V, **Levi C**, Mordechai S (2001), “Novel Methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia in children”, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 51, 251-261, 2002.
3. Jagannathan Ramesh, Mahmoud Huleihel, Jacov Mordechai, Asher Moser, Vitaly Erukhimovitch, **Chen Levi**, Joseph Kapelushnik and Shaul Mordechai “Preliminary results on evaluation of progress in chemotherapy treatment for childhood leukemia patients using FTIR Microspectroscopy and cluster analysis”, J. Lab. Clin. Med, 2003 (In Press).

8. נספח א – רשימת קיצורים

IR	–	Infrared
MIR	–	Mid Infrared
FTIR	–	Fourier Transform Infrared
FTIR-MSP	–	Fourier Transform Infrared Microspectrometer
ALL	–	Acute Lymphoblastic Leukemia
CT	–	Computerized Tomography
MRI	–	Magnetic Resonance Imaging
SNR	–	Signal to Noise Ratio
MCT	–	Mercury Cadmium Tellurium
DFT	–	Discrete Fourier Transform
BFM 95	–	Berlin-Frankfurt-Munster 95
RPM	–	Revolutions Per Minute
HC	–	Healthy Control
PCR	–	Polymerase Chain Reaction

9. נספח II – המבנה המולקולרי והספקטרה של התרופות

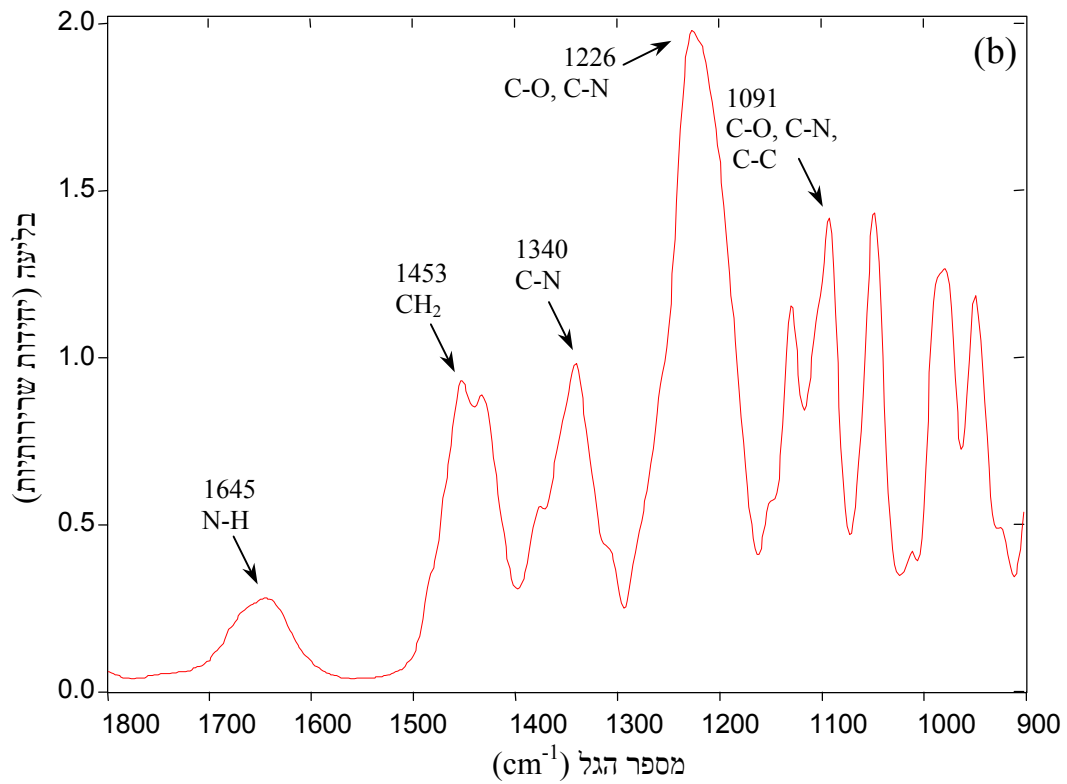
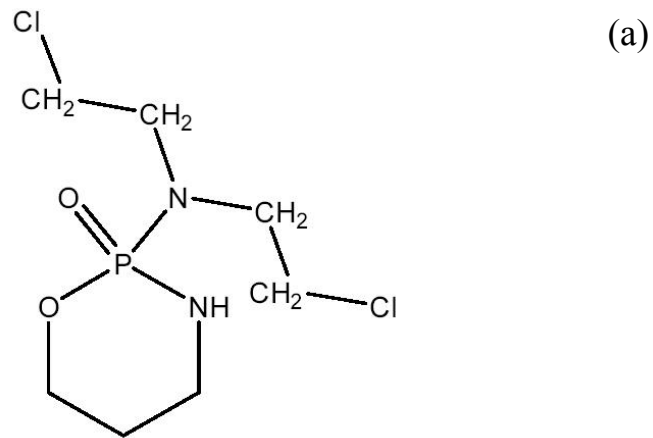
הכימותרפיות העיקריות

המאפיין העיקרי של תאים סרטניים הוא התרבות בלתי מבוקרת של התאים, לכן רב התרופות האנטי-סרטניות פועלות על ידי התערבות במנגנון החלוקה של התא וגורמות לעיכוב הסינתזה של ה-DNA, הריסת ה-DNA או ה-RNA וכדומה.

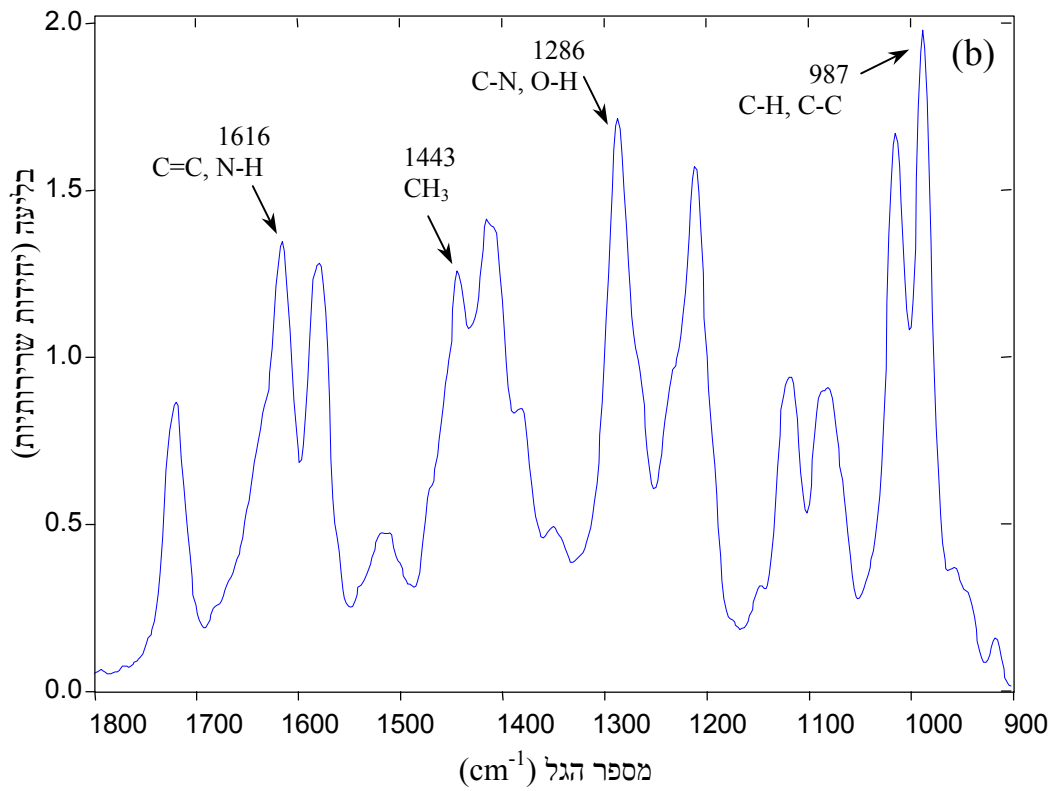
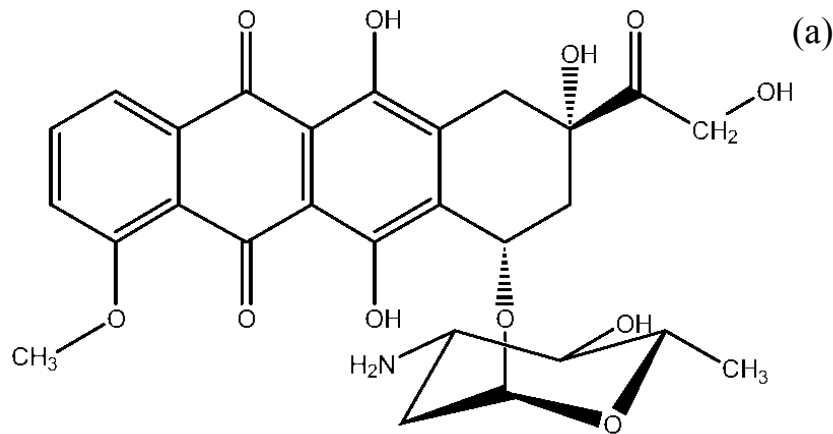
התרופות העיקריות המשמשות לטיפול בלוקמיה לימפובלסטית חריפה הן: Doxorubicin, Cyclophosphamide, Vincristine, Methotexate, L-Asparinjs ועוד (4,6,30). אלה הם התרופות המקובלות כיום בקהילה הרפואית על פי פרוטוקול BFM 95 (24).

ספקטרוטר ה-FTIR יכול לספק גם אפיון כימי של תרופות אלו ולשם הדוגמא נציג את ספקטרום הבליעה של שתיים מהתרופות הנזכרות לעיל כפי שמדדנו בעבודה זו.

בגרף 9.1 מוצגים המבנה הכימי וקטע מספקטרום הבליעה ($900-1800\text{cm}^{-1}$) של Cyclophosphamide ובגרף 9.2 מוצגים המבנה הכימי וקטע מספקטרום הבליעה של Doxorubicin. ניתן לראות כי לכל תרופה קיימת טביעת אצבע ייחודית בספקטרום הבליעה בתחום האינפרא אדום בהתאם למבנה הכימי שלה. מסיבה זו ספקטרוסקופיה באינפרא אדום משמשת ככלי מקובל לבדיקת תרופות וקביעת המבנה הכימי שלהן (35).



גרף 9.1 – (a) המבנה הכימי של Cyclophosphamide (b) ספקטרום הבליעה של Cyclophosphamide בתחום 900-1800cm⁻¹



גרף 9.2 – (a) המבנה הכימי של Doxorubicin (b) ספקטרום הבליעה של Doxorubicin בתחום $900-1800\text{cm}^{-1}$

10. נספח III – השוואת קווי הבליעה העיקריים בין סוגי

סרטן שונים

במסגרת מחקרים נוספים שבוצעו תחת הנחייתו של פרופ' שאול מרדכי נבדקו בשיטה זו גם סרטן המעי הגס וסרטן הרחם. גם עבור שני סוגי סרטן אלו התקבלו הבדלים בספקטרה בין דוגמאות סרטניות לדוגמאות בריאות תוך שימוש בספקטרום בליעה באינפרא אדום. בשלושת המקרים ההבדלים היו בתחומים $800-1800 \text{ cm}^{-1}$ ו $2600-3200 \text{ cm}^{-1}$ אשר בהם מרוכזים קווי הבליעה האופייניים לדוגמאות ביולוגיות (קשרי פחמן, מימן, חמצן וכדומה). טבלה 10.1 מציגה חלק מקווי הבליעה שבהם נתגלו ההבדלים המשמעותיים ביותר על פי סוג הסרטן שנבדק.

יש לציין שבסרטן המעי וסרטן הרחם קל יותר להפריד בין התאים הסרטניים לתאים הבריאים לצורך המדידה ולכן מובהקות המדידות גבוהה יותר מאשר בלוקמיה אשר בה בכל הדוגמאות הסרטניות קיים תמיד אחוז מסוים של תאים בריאים.

טבלה 10.1 – קווי הבליעה הבולטים בהם נתגלו ההבדלים המשמעותיים ביותר בין דוגמאות סרטניות לדוגמאות בריאות על פי סוג הסרטן

הימצאות הבדל בין דוגמא סרטנית לדוגמא נורמלית			משמעות קו הבליעה	תדרי ויברציה (cm^{-1})
סרטן הרחם	סרטן המעי הגס	לוקמיה		
כן	כן	כן	PO_2 – פוספטים	~1084
כן	כן	כן	RNA/DNA	1121/1020
כן	כן	חלקי	פחמימות	1045/1545
לא נבדק	כן	חלקי	$-\text{CH}_2, \text{CH}_3$	~2852
			שומנים, חומצות גרעין, פוספוליפידים	~2923

11. ביבליוגרפיה

- (1) CP Schultz: The Potential Role of Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Imaging in Cancer Diagnosis Incorporating Complex Mathematical Methods. *Technology in Cancer Research & Treatment* 1 (2002) 95 - 104.
- (2) CP Schultz, K-z Liu, JB Johnston, HH Mantsch: Study of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells by FT-IR Spectroscopy and Cluster Analysis. *Leukemia Research* 20 (1996) 649 - 55.
- (3) B Alberts, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts, JD Watson: *The Cell*, Garland Publishing, New York, 1994.
- (4) J Kapelushnik: Leukemia in children. *BAMAH - Journal for Health Professionals in the Field of Cancer (Hebrew)* 12 (2000) 53 - 58.
- (5) S Mordechai, J Mordehai, J Ramesh, C Levi, M Huleihel, V Erukhimovitch, A Moser, J Kapelushnik: Application of FTIR microspectroscopy for the follow-up of childhood leukemia chemotherapy. *Subsurface and Surface Sensing Technologies and Applications III*, Cam Nguyen Editor, *Proceedings of SPIE* 4491 (2001) 243 - 50.

- (6) B stark, R Zaizov: The Treatment in Acute Lymphoblastic Leukemia Childhood Patient in Israel in the National Protocols - 16 Years of Experience. BAMAHA - Journal for Health Professionals in the Field of Cancer (Hebrew) 12 (2000) 59 - 72.
- (7) P C-H, B FG, C WM: Clinical and Biologic Relevance of Immunologic Marker Studies in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood 82 (1993) 343 - 62.
- (8) VD JJM, A HJ: Immunobiology of Leukemia, in Henderson ES, Lister TA, Greaves MF (eds). Leukemia (1996) 83 - 130.
- (9) DL Nelson, AL Lehninger, MM Cox: Lehninger principles of biochemistry, Worth Publishers, New York, 2000.
- (10) URL:, <http://gepasi.dbs.aber.ac.uk/roy/ftir/ftirhome.htm>.
- (11) DW Ball: The Basics of Spectroscopy, SPIE Press, 2001.
- (12) A Beiser: Concepts of Modern Physics, McGraw-Hill Co., Singapore, 1987.
- (13) LI Schiff: Quantum Mechanics, McGraw Hill International Editions, 1968.
- (14) JM Hollas: Modern Spectroscopy, John Wiley & Sons, Chichester, England, 1996.

- (15) NB Colthup, LH Daly, SE Wiberley: Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Academic Press, 1990.
- (16) PB Coleman: Practical Sampling Techniques for: Infrared Analysis, CRC Press, 1993.
- (17) BC Smith: Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, CRS Press, 1996.
- (18) C Bishop: Overview of Blood, BLDIS, New York, 1978.
- (19) P Griffiths, Jd Haseth: Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Wiley, New York, 1986.
- (20) HH Mantsch, D Chapman: Infrared Spectroscopy of Biomolecules, Wiley-Liss, New York, 1996.
- (21) AR Shaw, S Kotowitch, M Leroux, HH Mantsch: Multianalyte Serum Analysis Using Mid-Infrared Spectroscopy. Ann. Clin. Biochem 35 (1998) 624 - 32.
- (22) G Budinova, J Salva, K Volka: Applications of molecular Spectroscopy in the Mid-Infrared Region to the Determination of Glucose and Cholesterol in Whole Blood in Blood Serum. Applied Spectroscopy 51 (1997) 631 - 35.
- (23) C Petibois, V Rigalleau, MA Melin, A Perromat, G Cazorla, H Gin, G Deleris: Determination of Glucose in Dried Samples by Fourier -

Transform Infrared Spectroscopy. *Clinical Chemistry* 45 (1999) 1530 - 35.

- (24) F Tzortzatou-Stathopoulou, A Papadopoulou, M Moschovi, A Botsonis, G Tsangaris: Low Relapse Rate in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia after Risk-Directed Therapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 9 (2001) 591 - 97.
- (25) L Hudson, L Poplack: *Practical Immunology*, Blackwell Publication, London, 1976.
- (26) KR Beebe, RJ Pell, MB Seasholtz: *Chemometrics: A Practical Guide*, New York, 1998.
- (27) F Parker: *Application of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine*, Plenum Press, New York, 1971.
- (28) PG Andreus, RD Strickland: Cancer Grading by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biospectroscopy* 4 (1998) 37 - 46.
- (29) E Benedetti, E Bramanti, F Papineschi, I Rossi: Determination of the Relative Amount of Nucleic Acids and Proteins in Leukemic and Normal Lymphocytes by Means of FT-IR Microspectroscopy. *Applied Spectroscopy* 51 (1997) 792 - 97.

- (30) GF Margolin, DG Poplack, in G.P. David (Ed.), Principles and Practice of Pediatric Oncology. Lippincott-Raven Publication, 1997, p. 433 - 60.
- (31) J Ramesh, J Kapelushnik, J Mordehai, A Moser, M Huleihel, V Erukhimovitch, C Levi, S Mordechai: Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy. journal of Biochemical and biophysical methods 51 (2002) 251 - 61.
- (32) C Felix, B Lange: Leukemia in Infants. The Oncologist 4 (1999) 225 - 40.
- (33) S Yetgin, S Yalcin, N Ozbek: Clinical Value of Glycated Hemoglobin and Fructosamine in the Long Term Glycemic Control of Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. Acta. Paediatr. Jpn 40 (1998) 52 - 56.
- (34) J Ramesh, M Huleihel, J Mordehai, A Moser, V Erukhimovitch, C Levi, J Kapelushnik, S Mordechai: Preliminary Results on Evaluation of Progress in Chemotherapy Treatment for Childhood Leukemia Patients Using FTIR Microspectroscopy and Cluster Analysis. J. Lab. Clin. Med (2003).

- (35) H-U Gremlich, B Yan: Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials, Marcel Dekker, New York, 2001.

3.2.2. Normalization	45
3.2.3. Further Analysis	46
4. Results	49
4.1. Blast Cell Count	49
4.2. FTIR Microspectroscopy	50
4.2.1. B Cell ALL Patient	51
4.2.2. T1 Cell ALL Patient	51
4.2.3. T2 Cell ALL Patient	52
4.3. Biological Markers	57
4.4. Cluster Analysis	64
4.4.1. B Cell ALL Patient	64
4.4.2. T1 Cell ALL Patient	65
4.4.3. T2 Cell ALL Patient	65
5. Discussion	70
6. Conclusions	76
7. Publications	77
8. Appendix I – List of Abbreviations	78
9. Appendix II – Molecular Structure and FTIR Spectra of The Main Chemotherapy Drugs	79
10. Appendix III – Comparison between the Main Absorption Bands for Different Types of Cancers	82

Table of Contents

1. Abstract	7
2. Introduction	10
2.1. Biological Background	10
2.1.1. The Blood Components	10
2.1.2. Leukemia	13
2.2. Physical Background	15
2.2.1. The Electromagnetic Spectrum	15
2.2.2. Interaction of Light and Matter	16
2.2.3. Basic Quantum Theory Principles	22
2.2.4. Infrared Spectroscopy	28
2.2.5. FTIR-MSP	30
2.3. Previous Works on Blood Spectroscopy	38
3. Methodology	40
3.1. Sample Preparation	40
3.1.1. Acquiring the Biological Samples	40
3.1.2. Blood Separation Process	40
3.1.3. Sample Preparation and measurements	41
3.2. Data Acquisition and Basic Analysis	42
3.2.1. Baseline Correction	44

molecular level of the disease (instead of cellular level). This can help to understand better the physical and biomolecular processes that happened inside the cancer cells during the chemotherapy treatment which affect certain cellular activities such as DNA and nuclear acid synthesis capabilities.

Previous researches of IR spectroscopy of Leukemia (1,2) showed good results of differentiation between cancer cells and healthy cells using various mathematical tools (such as integration or cluster analysis), however this research is the first to check the biochemistry changes in the cells **during the chemotherapy treatment**.

ZnSe crystal and measuring the IR absorbing spectrum of these samples using the FTIR-MSP. The blood samples were taken by the medical staff of the pediatric hematology-oncology department in Soroka medical center.

Chemical bonds can absorb only specific frequency (or frequencies) in the IR region according to their vibrational energy levels, therefore each absorption frequency can be related to chemical bond and therefore to the molecules in the cells. The measured spectrum was in the $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ region that is rich in results of biochemical components in the blood cells.

The collected spectra (for every day during the chemotherapy treatment) were analyzed and compared to a control group of healthy children. We also checked the biochemical changes in the cells components as a function of the chemotherapy treatment days.

The research results shows that there are big changes in the phosphate and the carbohydrates level of the cells as a result of the chemotherapy treatment. These changes were checked and we also compared our method to the conventional medical methods such as cell count, flow cell cytometry and morphology.

The goal of this research is to examine optical methods that will be helpful in the follow up of childhood leukemia chemotherapy. The advantage of optical methods like the one presented here is by allowing us to monitor the

Abstract

Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrometer is based conceptually on the **Michelson Interferometer**. By projecting a wide band of frequencies in the IR region, we can get an interferogram that represents the intensity of the signal from the detector as a function of the difference in the optical path lengths of the IR beams in the interferometer. After measuring the light intensity as a function of the coordinate of the moving mirror of the interferometer we use transform Fourier to obtain a spectrum that represents the absorbance intensity as a function of wavenumber. Using FTIR-MSP, which is a modern FTIR spectrometer that is equipped with an IR microscope, allows measuring the absorption spectrum of **microscopic samples**. This development allows the recent efforts in various medical applications, such as cell and tissue characterizations, composition of intact bacterial cells, studies of biomembrane systems etc.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a disease that is characterized by uncontrolled reproduction of white blood cells originally formed in the bone marrow. This disease is one of the most common of childhood cancers.

This research was preformed by taking blood samples from leukemia patients before and during the chemotherapy treatment, producing the lymphocytes from these samples, placing and drying the lymphocytes on a

*APPLICATION OF INFRARED
MICROSPRECTROSCOPY FOR FOLLOW
UP OF CHILDHOOD LEUKEMIA*

Thesis submitted for the degree of Master of Science in
Natural Sciences

By Chen Levi

Supervisor: Prof. Shaul Mordechai

Physics Department

Faculty of Natural Sciences

Ben Gurion University of the Negev

Author Signature _____

Date _____

Supervisor's Approval _____

Date _____

Faculty Council Approval _____

Date _____

Ben Gurion University of the Negev

Faculty of Natural Sciences

Physics Department

*APPLICATION OF INFRARED
MICROSPRECTROSCOPY FOR FOLLOW
UP OF CHILDHOOD LEUKEMIA*

Thesis submitted for the degree of Master of Science in
Natural Sciences

By Chen Levi

March 2003