



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

### **Opracowanie spektralnej histopatologii FTIR do detekcji i charakterystyki przerzutowości nowotworowej**

**mgr Karolina Anna Chrabąszcz**

Nowotwór sutka (potocznie nazywany nowotworem piersi), rozwijający się miejscowo z komórek gruczołowych, jest najczęściej występującą chorobą nowotworową wśród kobiet. Jednak to nie sam rozwój guza pierwotnego a powstałe w jego wyniku przerzuty są najczęstszą przyczyną śmierci. Stanowi to krytyczny etap choroby nowotworowej limitujący przeżywalność pacjentów jak i rozwój efektywnego leczenia przeciwko nowotworom tego typu. Postępy w dziedzinie technologii pozwolił na zastosowanie metod obrazowania, powszechnie stosowanych w medycynie, także w diagnostyce onkologicznej. Wcześnie wykryte zmiany oraz ich ocena histologiczna pozwalają na postawienie odpowiedniej diagnozy i wdrożenie leczenia, lecz detekcja na wczesnym etapie choroby wciąż stanowi wyzwanie. Spowodowane jest to niewielkimi rozmiarami lub obecnością tylko pojedynczych komórek w ognisku nowotworowym. Dlatego metody te nie zawsze są w stanie uwidocznic wczesne, subtelne zmiany indukowane procesem nowotworowym. Spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (*ang. Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR*) pozwala nie tylko na dostarczenie informacji na temat morfologii tkanki, jak w klasycznym barwieniu histologicznym, ale niesie także informacji o składzie, zawartości poszczególnych molekuł reprezentując ogólny stan biochemiczny próbki bazując na widmach absorpcji. W połączeniu z możliwością

obrazowania, powstałe mapy chemiczne ukazują przestrzenny rozkład makrocząsteczek nawet na poziomie subkomórkowym. Dlatego technika ta nosi nazwę spektralnej histopatologii (*ang. spectral histopathology, SHP*).

Badania zaprezentowane w pracy doktorskiej skupiają się wokół identyfikacji oraz charakterystyki przerzutów powstałych w płucach na skutek metastazy z wykorzystaniem obrazowania FTIR oraz analizy chemometrycznej zastosowanej do redukcji ogromnej bazy danych hiperspektralnych. Dobrze zdefiniowany model zwierzący po ortotropowym jak i dożylnym podaniu komórek nowotworowych 4T1 pozwolił na śledzenie procesu przerzutowości nowotworowej z pierwotnego raka sutka do płuc na przestrzeni tygodni oraz dni od podania komórek neoplastycznych. Ważnym aspektem prowadzonych badań było dobranie odpowiedniej preparatyki próbki oraz warunków pomiarowych, dlatego te zagadnienia zostały omówione w pierwszej części wyników. Wykazano, iż zarówno metoda mrożeniowa jak i parafinowa pozwalają na uzyskanie podobnej informacji chemicznej na podstawie widm IR, aczkolwiek w związku ze znaczną przewagą zalet preparatów parafinowych (powszechnie stosowane w medycynie, łatwe przygotowanie oraz przechowywanie) zostały wybrane do dalszych badań. Dobór rozdzielczości spektralnej oraz przestrzennej dla obrazowania w podczerwieni podyktowany był rodzajem poszukiwanych informacji w obrębie badanych próbek. Wykazano, iż ta technika oscylacyjna ukazuje ogromny wachlarz możliwości określania dystrybucji oraz zmian zachodzących w badanych próbkach nawet na poziomie struktur subkomórkowych. W związku z prowadzonymi badaniami nad przerzutowością nowotworową do płuc pierwszym krokiem było scharakteryzowanie zarówno komórek 4T1, rozwiniętego pierwotnego nowotworu sutka oraz powstałego w płucach zaawansowanego przerzutu. Wykazano, iż pomimo że wywodzą się z tego samego typu komórek zarówno guz pierwotny jak i zaawansowana metastaza rozwinięta w płucach posiadają odmienny profil biochemiczny, wynikający z różnych ścieżek interakcji komórek je budujących z otoczeniem. Skupiając się na detekcji oraz charakterystyce rozwiniętych guzów zajmujących płuca, udowodniono, iż niezależnie od zastosowanej rozdzielczości spektralnej, są one dobrze odróżnialne w obrębie badanej tkanki a ich lokalizacja pokrywa się z referencyjnym barwieniem histologicznym, świadcząc o ich specyficznej sygnaturze biochemicznej. Ponadto, zastosowanie obrazowania IR o zwiększonej rozdzielczości przestrzennej umożliwiło identyfikacje rodzaju przerzutu pod względem składu molekularnego oraz struktur poszczególnych biocząsteczek jak i scharakteryzowanie odmiennych fenotypów komórek. Udowodniono również, iż obrazowanie spektroskopowe w podczerwieni jest niezwykle czułą techniką, ponieważ

możliwe było zlokalizowanie mikroprzerzutów, już w trzecim tygodniu progresji nowotworowej bez wcześniejszej wiedzy o ich obecności w badanej tkance, które zajmowały jedynie ok. 0,005-0,1% badanej powierzchni. Identyfikacja tak niewielkich zmian przez histopatologa wciąż stanowi wyzwanie. Dodatkowo wykazano, iż ich profil spektralny różni się w zależności od otoczenia w jakim się znajdują, dodatkowo pozostają odmienne od rozwiniętego makroprzerzutu. Model żyłny przerzutowości nowotworowej umożliwił zlokalizowanie widocznych mikroprzerzutów w tkance płuc już w siódmym dniu od podania komórek 4T1, a ich skład molekularny również pozostawał odmienny od tych rozwiniętych w wyniku metastazy z pierwotnego nowotworu sutka.

Poszerzając badania nad mikroprzerzutami o techniki obrazowania jak wymuszona (nieliniowa) antystokesowska spektroskopia ramanowska (CARS), generacja drugiej harmonicznej (SHG), fluorescencja wzbudzona dwufotonowo (TPEF) oraz mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) pozwoliły na wyraźne odwzorowanie morfologii przerzutów ukazanych przez barwienie histologiczne. Kombinacja zidentyfikowała proces przebudowy macierzy pozakomórkowej oraz degradacji NA(P)H jak i enzymatycznego rozkładu elastyny związanej z obecnością przerzutów. Zróżnicowanie środowiska chemicznego zostało potwierdzone także techniką FLIM, ukazującą spadek czasu życia NAD(P)H w ogniskach przerzutowych. Połączenie z wynikami wysokorozdzielczego obrazowania w podczerwieni potwierdzono zmiany zachodzące pod wpływem przebudowania macierzy dodatkowo uzupełniając o informację w zmianach RNA oraz glikogenu między badanymi ogniskami przerzutowymi.

Poza identyfikacją oraz podaniem spektralnej charakterystyki i różnic biochemicznych w badanych zaawansowanych guzach jak i mikroprzerzutach zauważono znaczące różnice w profilach spektralnych otaczających je tkankanek, co narzuciło badania zmian mięszu płuc w progresji nowotworowe. Obrazowanie wybranych obszarów tkanki płuc bez uprzedniej wiedzy o ilości oraz obecności mikro- jak i makroprzerzutów umożliwiło określenie cech spektralnych dla trzech badanych grup: kontrolnej, wczesnej metastazy oraz zaawansowanej makrometastazy. Już pojedyncze widmo z obszaru badanej tkanki wskazało na specyficzne zmiany zachodzące w obrębie poszczególnych faz procesu nowotworzenia takie jak akumulacja węglowodanów dla zaawansowanej makrometastazy czy znaczny wzrost aktywności białek kinaz tyrozynowych na etapie wczesnej metastazy. Widząc istotny wpływ progresji nowotworowej na otaczające je tkanki, zastosowano obrazowanie IR dla całych przekroi płuc. Pozwoliło to na wyodrębnienie głównych elementów morfologicznych tkanki płuc (mięsz, niedodma, tkanka włóknista/mięśniowa) oraz określenie wpływu, jaki na

poszczególne biokomponenty, wywiera proces nowotworzenia. Umożliwiło to nie tylko zdefiniowanie rodzaju białek (m.in. kolagen, elastyna) ale także pozwoliło na określenie stopnia degradacji czy akumulacji w zależności od badanej struktury i etapu progresji. Wspomniane białka dodatkowo podczas procesu nowotworzenia mogą ulegać reorientacji w tkankach, co ułatwia migrację komórek nowotworowych i ich osiedlanie się w macierzy pozakomórkowej. W celu zbadania tego aspektu zastosowano zarówno standardowe obrazowanie IR jak i z promieniowaniem spolaryzowanym w dwóch płaszczyznach (równoległe i prostopadle). Pozwoliło to na uzyskanie informacji na temat orientacji oraz przemodelowania białek wynikających z progresji nowotworowej. Pomimo złożonej budowy płuc oraz składników w nich obecnych spektroskopia IR zlokalizowała miejsca tkanki bogate w struktury o budowie kolagenowej obecne głównie w ścianach naczyń krwionośnych, oskrzelików oraz tkance włóknistej. Dodatkowo, w obrębie struktur bogatych w białka fibrylarne zidentyfikowane przez standardowe obrazowanie IR jako chemicznie homogeniczne światło spolaryzowane pozwoliło na wyróżnienie dodatkowych frakcji o odmiennej sygnaturze molekularnej jak i wskazało na zachodzące procesy ich przemodelowania objawiające się znacznymi przesunięciami czy pojawieniem się nowych pasm, już na etapie premetastatycznym.

Podsumowując, prowadzone w ramach pracy doktorskiej badania umożliwiły scharakteryzowanie rozwiniętych makroprzerzutów w tkance płuc, wykazały potencjał w detekcji wczesnych zmian nowotworowych oraz ukazały ich różnorodność biochemiczną. Ponadto możliwe było zdefiniowanie zmian zachodzących w miększu płuc pojawiających się przed osadzeniem pierwszych komórek nowotworowych jak i zmiany w reorientacji białek, co nie jest możliwe do zdefiniowania przez klasyczne techniki histologiczne, będącymi obecnie złotym standardem w ocenie zmian nowotworowych. Obrazowanie z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni będące szybką, niedestrukcyjną oraz bez-znacznikową techniką stanowi atrakcyjną i innowacyjną alternatywę w porównaniu z konwencjonalnymi metodami stosowanymi obecnie w diagnostyce onkologicznej.