



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

***In situ* spectroscopic analysis of lipids and  
other biochemical changes in the selected  
models of liver injury**

Autor: mgr Kamila Kochan

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Barańska

*Praca doktorska zrealizowana w Zespole Obrazowania Ramanowskiego,*

*Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński*

Kraków, 2016

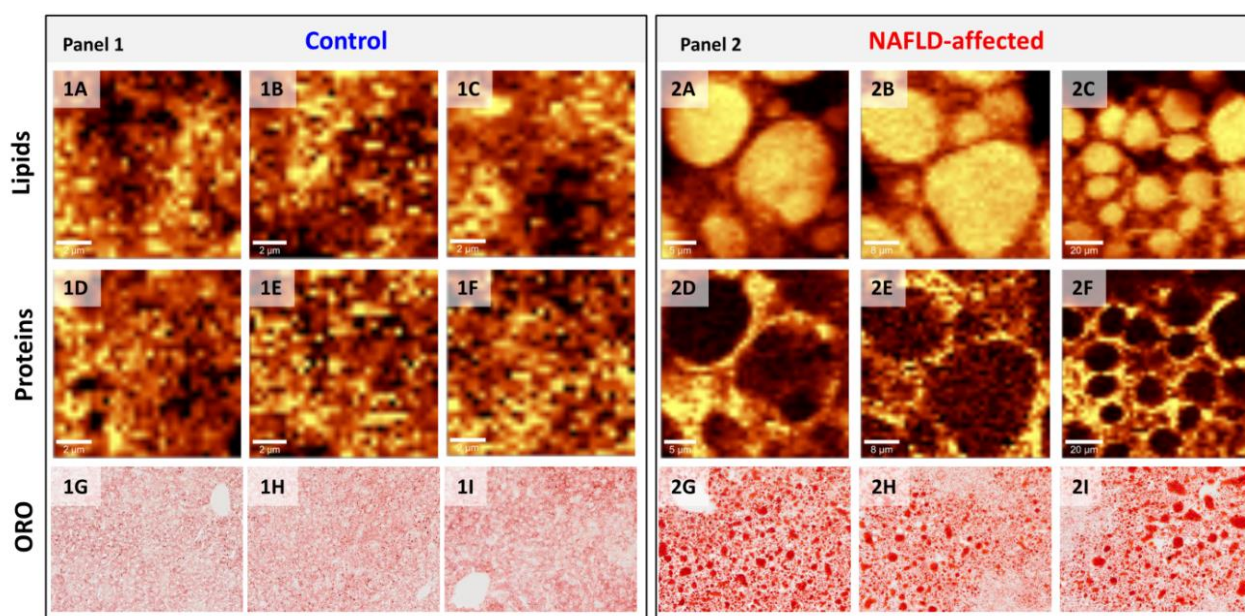
Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie zmian biochemicznych wątroby w różnych modelach jej uszkodzenia za pomocą obrazowania technikami spektroskopii oscylacyjnej (FT-IR oraz ramanowskiej) oraz barwień histochemicznych (jako metody referencyjnej). **Nadrzędnym celem wszystkich prezentowanych badań była identyfikacja oraz interpretacja markerów spektralnych związanych z wystąpieniem danego zaburzenia.** Ponadto, praca koncentruje się wokół dwóch kluczowych zagadnień, dotyczących zastosowania technik spektroskopii oscylacyjnej:

- (1) do badania **patogenezy** wybranych schorzeń oraz
- (2) potencjalnie, do **badania diagnostycznych** (tzw. *screening* tkanek).

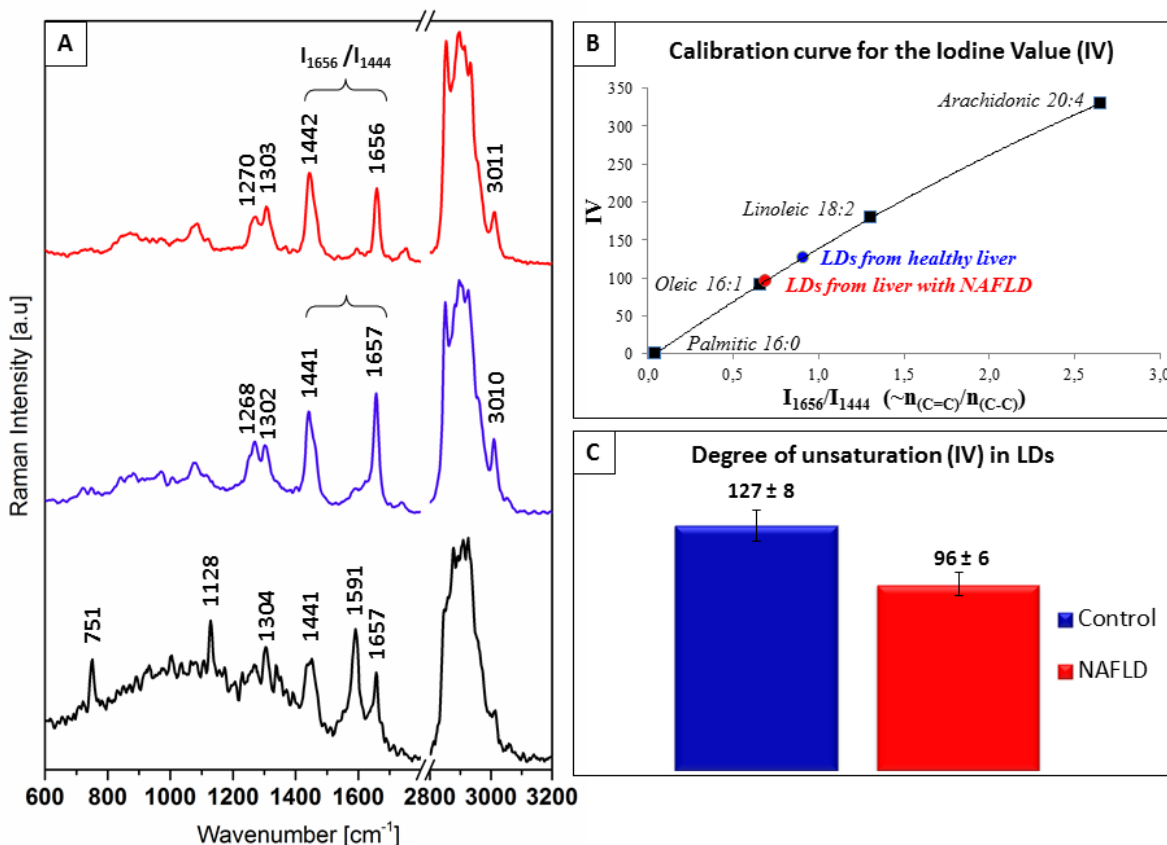
Część pierwsza niniejszej pracy doktorskiej – stanowiąca jej większość – skupia się na identyfikacji zmian składu chemicznego tkanki wątroby wynikającego z rozwoju wybranych zaburzeń oraz służących do śledzenia ich patogenety. Obecnie, najbardziej rozpowszechnionym schorzeniem wątroby jest niealkoholowe stłuszczenie wątroby (z *ang.* **Non-Alcoholic Fatty Liver, NAFLD**). NAFLD dotyczy około 20–30 % populacji ludzkiej i uważane jest za manifestację zespołu metabolicznego (tj. zespołu czynników znacząco zwiększających ryzyko zachorowalności chorób cywilizacyjnych). Stłuszczenie wątroby jest zatem ściśle powiązane z insulinoopornością oraz samymi chorobami cywilizacyjnymi (w tym cukrzycą typu II oraz miażdżycą). Z tego względu, w niniejszej pracy doktorskiej uwzględniono badanie zmian składu biochemicznego tkanki wątroby w mysich modelach wymienionych chorób (tj. cukrzycy typu II, miażdżycy oraz NAFLD). Niealkoholowe stłuszczenie wątroby nie tylko współistnieje z wymienionymi chorobami cywilizacyjnymi, ale również często je poprzedza. Ponadto, na wczesnym etapie jest w pełni odwracalne, jednakże, ze względu na brak specyficznych symptomów jego wykrywalność jest niewielka. Z tego względu szczególną uwagę w pracy poświęcono temu schorzeniu.

Za pomocą obrazowania technikami spektroskopii oscylacyjnej zbadane zostały zmiany biochemiczne w obrębie tkanki wątroby ze stłuszczeniem wątroby na etapie zaawansowanym oraz wczesnym. Ze względu na specyfikę schorzenia oraz zmian występujących w wątrobie, szczególną uwagę poświęcono badaniu lipidów. Badania tkanki o wysokim stopniu stłuszczenia pozwoliły na identyfikację markerów spektralnych związanych z odpowiednimi zmianami biochemicznymi tkanki. Wśród najważniejszych zidentyfikowanych markerów wymienić należy

zmiany: **(I)** w obrębie kropli lipidowych oraz **(II)** w kontekście zawartości witaminy A. W przypadku kropli lipidowych (lub cyst lipidowych) zaobserwowany został nie tylko ich wzrost (Ryc.1), ale także zmiana ich kompozycji w zakresie obniżenia stopnia nienasycenia lipidów, następująca wraz z rozwojem choroby (Ryc.2). W przypadku witaminy A wyraźnie widoczny był jej zanik na skutek wystąpienia schorzenia.



**Ryc.1.** Panele prezentujące dystrybucję lipidów oraz protein (na podstawie wybranych ramanowskich pasm markerowych) w obrazowanych fragmentach tkanek pochodzących z wątroby myszy: kontrolnych (**Panel 1**) oraz z rozwiniętym zaawansowanym stłuszczeniem wątroby (NAFLD) (**Panel 2**). Zaawansowane stłuszczenie wątroby zostało wywołane wskutek 15 tygodni żywienia dietą bogatą w tłuszcze nasycone (z ang. High Fat Diet, HFD: 60% kcal pochodzących z lipidów nasyconych). Każdy panel zawiera trzy fragmenty tkanek pochodzących od różnych osobników i prezentuje dla nich: dystrybucję lipidów (**A,B,C**) na podstawie integracji pasma ramanowskiego w zakresie  $1420 - 1480 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta\text{CH}_2$ ) oraz dystrybucję białek (**D,E,F**) na podstawie integracji pasma w zakresie  $1200 - 1250 \text{ cm}^{-1}$  (pasma amidowe III) wraz z korespondującymi wynikami barwienia tkanek za pomocą ORO (**G,H,I**). Wymiary obrazowanych obszarów:  $10.7 \mu\text{m} \times 10.7 \mu\text{m}$  (1A,1D),  $10.3 \mu\text{m} \times 10.4 \mu\text{m}$  (1B,1E),  $10.6 \mu\text{m} \times 10.5 \mu\text{m}$  (1C,1F),  $29.4 \mu\text{m} \times 29.4 \mu\text{m}$  (2A,2D),  $43.1 \mu\text{m} \times 42.9 \mu\text{m}$  (2B,2E),  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  (2C,2F).

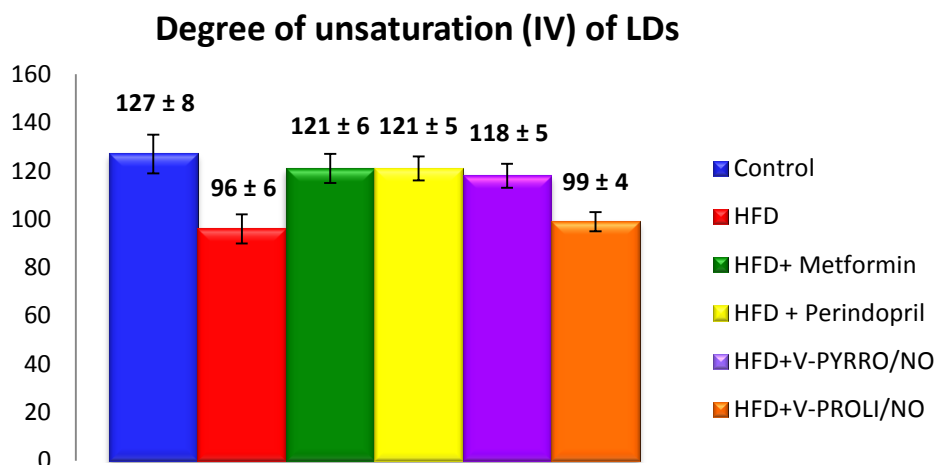


**Ryc.2.** (A) Zestaw widm ramanowskich pochodzących z kropli lipidowych w obrębie tkanki z zaawansowanym stłuszczeniem wątroby (widmo **czzerwone**), niewielkiej kropli lipidowej obecnej w obrębie tkanki kontrolnej (widmo **niebieskie**) oraz tkanki kontrolnej (widmo **czarne**) wraz z zaznaczonymi najważniejszymi pasmami. Nawiasem zaznaczony został zestaw pasm wykorzystywany do oceny stopnia nienasycenia lipidów komponujących krople lipidowe ( $I_{1656}/I_{1444}$ ). (B) Krzywa kalibracyjna wykorzystana do określania wartości liczby jodowej (IV) na podstawie widm ramanowskich: **niebieski** i **czzerwony** punkt odpowiadają wartościom uzyskanym dla kropli lipidowych pochodzących z tkanki kontrolnej i z rozwiniętym stłuszczeniem. (C) Bezpośrednie zestawienie wartości liczby jodowej (stopnia nienasycenia) uzyskanych dla kropli lipidowych pochodzących ze zdrowej wątroby (kolorem **niebieskim**) oraz wątroby z zaawansowanym stłuszczeniem (kolorem **czwornym**).

Zidentyfikowane markery spektralne zostały zweryfikowane poprzez badanie zmian na wczesnym etapie rozwoju choroby. Zaobserwowany trend zmian biochemicznych potwierdził przydatność wytypowanych pasm jako markerów zmian chorobowych. Co więcej, techniki

obrazowania metodami spektroskopii oscylacyjnej okazały się być niezwykle czułe nawet na zmiany na etapie wczesnym, co często trudne jest do obserwacji innymi metodami.

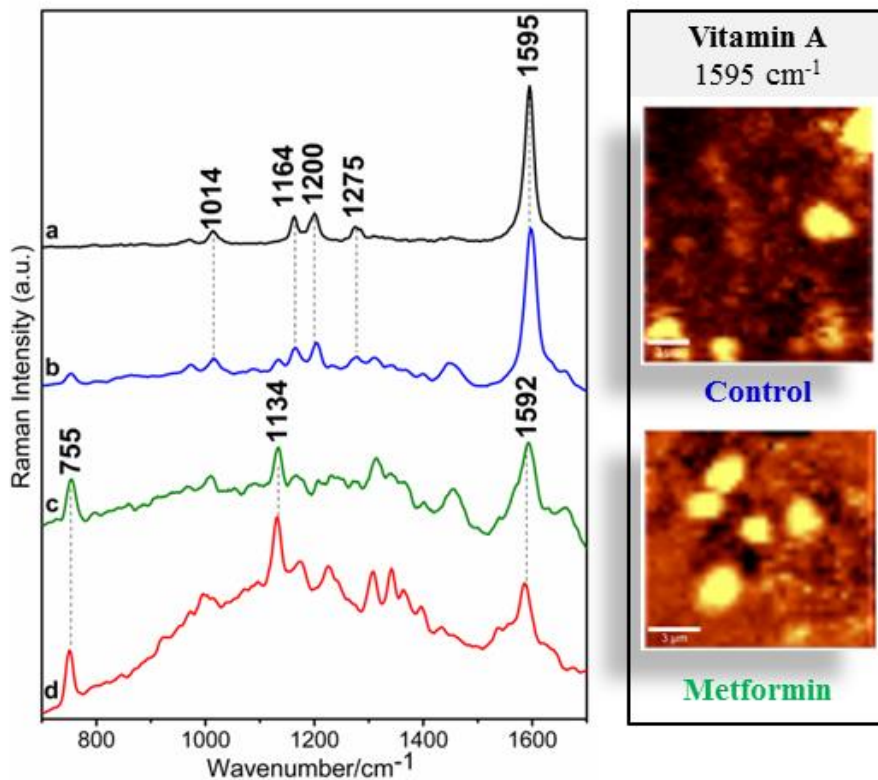
Dodatkowym celem pierwszej części pracy było również zbadanie skuteczności terapii farmakologicznej lekami stosowanymi w klinice (metformina, perindoprilem) oraz NO-donorami o potencjalnej aktywności farmakologicznej w kierunku wymienionych schorzeń (V-PYRRO/NO, V-PROLI/NO). Badania te nie tylko udowodniły przydatność technik spektroskopii oscylacyjnej do oceny skuteczności farmakoterapii (co stanowi kolejną potencjalną dziedzinę ich zastosowań), ale także potwierdziły prawidłowość zidentyfikowanych markerów spektralnych stłuszczenia. W ramach przeprowadzonych badań potwierdzona została skuteczność działania leków referencyjnych. Zaobserwowano także wymierny wpływ jednego z donorów tlenu azotu: V-PYRRO/NO. Kompozycja kropli lipidowych okazała się być wrażliwym (i wczesnym) markerem efektywności terapii farmakologicznej (Ryc. 3).



**Ryc.3.** Wyniki oznaczenia stopnia nienasycenia (przedstawione jako uzyskana wartość liczby jodowej) otrzymane dla kropli lipidowych pochodzących z wątroby myszy kontrolnych (**niebieski**), z rozwiniętym stłuszczeniem (**czernym**) oraz poddanych leczeniu: metforminą (**zielony**), perindoprilem ( **różowy**), V-PYRRO/NO ( **pomarańczowy**) oraz V-PROLI/NO ( **fioletowy**). Zmiana kompozycji kropli lipidowych dla V-PYRRO/NO poprzedza redukcję ich rozmiarów.

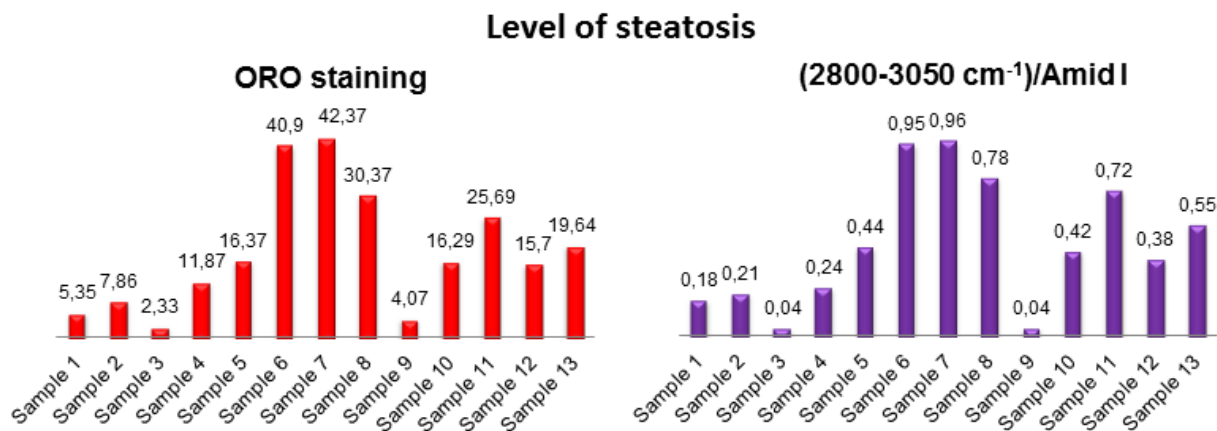
Badania nad wpływem terapii farmakologicznej potwierdziły także przydatność obecności witaminy A jako ogólnego markeru stanu wątroby. Zanik obecności witaminy A wskutek

rozwoju zaburzeń patologicznych zaobserwowany został w kilku modelach chorobowych. Przeprowadzone badania zademonstrowały, iż w przypadku skutecznej terapii farmakologicznej (metformina) następuje odbudowa magazynu witaminy A w obrębie tkanki (Ryc. 4).



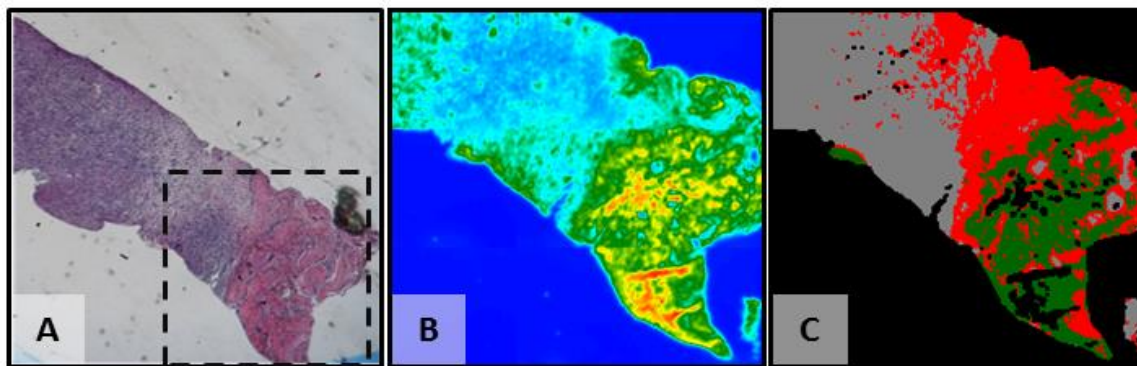
**Ryc.4. Po lewej:** Widma ramanowskie (a) *all-trans* retinolu, (b) tkanki kontrolnej w obszarze kropli lipidowej w obrębie komórek gwiazdzystych (magazyn witaminy A), (c) tkanki kontrolnej (poza kroplami lipidowymi) oraz (d) standardu hemu (hemoglobiny), wraz z zaznaczonymi pasmami charakterystycznymi. **Po prawej:** Mapy dystrybucji witaminy A (na podstawie integracji pasma markerowego położonego przy ok. 1595 cm<sup>-1</sup>) dla fragmentów tkanek pochodzących z wątroby myszy zdrowych („Control”) oraz z wywołanym NAFLD i poddanym leczeniu metforminy („Metformin”).

W ramach niniejszej pracy opracowana również została metoda oceny zaawansowania stłuszczenia wątroby w oparciu o obrazowanie w podczerwieni dużych obszarów tkanek w połączeniu z zaawansowaną analizą chemometryczną (Ryc.5). Wskazano też na możliwość potencjalnego wykorzystania takiego podejścia do badań rutynowych tkanek.



**Ryc.5. Po lewej:** Wyniki oznaczenia stopnia zaawansowania stłuszczenia w postaci procenta tkanki zajmowanej przez krople (cysty) lipidowe, uzyskane na podstawie barwienia ORO (metoda referencyjna). **Po prawej:** wyniki oznaczenia zaawansowania stłuszczenia na podstawie pomiarów FT-IR całych fragmentów tkanek, wyrażone w postaci stosunku pasm w zakresie 2800 – 3050 cm<sup>-1</sup> do pasma amidowego I, wykonane dla widm średnich. Powyższy przykład ilustrują wysoką korelację wyników otrzymanych na podstawie pomiarów FT-IR ora barwień ORO.

Wyzwania stawiane danej technice podczas jej zastosowania do rutynowych badań są jednak zdecydowanie różne niż w przypadku jej wykorzystania do śledzenia patogenezы chorób. Końcowa część niniejszej pracy skoncentrowana jest zatem wokół zagadnień związanych z potencjalną praktyczną aplikacją technik obrazowania spektroskopowego do tzw. rutynowego *screeningu* tkanek, na przykładzie nowotworów wątroby. Metoda stosowana do oznaczeń rutynowych powinna być m.in. uniwersalna, w kontekście stosowania do szerokiego zakresu próbek, pozwalając na uzyskanie prawidłowego wyniku, niezależnie od czynników takich jak wiek czy płeć badanego osobnika. Ponadto, powinna być możliwa do zastosowania do preparatów przygotowywanych w sposób rutynowy, a także tania. W drugiej części pracy zbadano więc możliwość stosowania obrazowania w podczerwieni do identyfikacji obecności nowotworów wątroby, uwzględniając powyższe czynniki. Badaniu poddany został zatem zestaw różnorodnych (pod kątem wieku, płci, i typu zaawansowania nowotworów) próbek. Sprawdzony został potencjał techniki obrazowania w podczerwieni m.in. w przypadku zastosowania preparatów parafinowych oraz (taniej) techniki transfleksji. Poniżej (Ryc.6) przedstawiony został przykład identyfikacji obszaru nowotworowego na podstawie pomiarów preparatu parafinowego w technice transfleksji.



**Ryc.6.** (A) Wynik barwienia H&E (hematoksylina i eozyna) sąsiedniego skrawka tkanki z zaznaczonym obszarem zmierzonym, (B) dystrybucja białek (na podstawie integracji pasma amidowego I) w zmierzonym fragmencie tkanki oraz (C) dystrybucja klas, uzyskana w skutek analizy skupień metodą *k-średnich* (w zakresie  $900 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ ).

Niniejsza praca doktorska zrealizowana została przy współpracy z Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET). Badania prezentowane w pracy doktorskiej realizowane były przy wsparciu Narodowego Centrum Nauki (model niealkoholowego stłuszczenia wątroby oraz modele chorób cywilizacyjnych – grant Preludium 5: *Od symptomów do leczenia: kompleksowa charakterystyka rozwoju zmian patologicznych w doświadczalnym modelu stłuszczenia wątroby za pomocą metod obrazowania spektroskopii oscylacyjnej*, nr projektu: 2013/09/N/NZ7/00626; model nowotworowy – grant Etiuda 3: *Badanie zmian biochemicznych wątroby towarzyszących rozwojowi wybranych schorzeń tego organu za pomocą technik obrazowania spektroskopii oscylacyjnej oraz barwień histochemicznych*, nr projektu UMO-2015/16/NZ7/00155).

W ramach niniejszej pracy doktorskiej opublikowane zostało 8 prac, które stanowią część dorobku naukowego obejmującego 14 prac wyłącznie w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (łącznie IF = 50.136, liczba wszystkich cytowań: 81, index Hirscha: 5, źródło Scopus, 5.09.2016).