

mgr inż. Monika Kopec

Wydział Chemiczny

Politechnika Łódzka

Promotor: prof. dr hab. Halina Abramczyk

Promotor pomocniczy: dr inż. Jakub Surmacki

Obrazowanie Ramana ludzkiej tkanki nowotworowej oraz nowotworowych i normalnych kultur komórkowych

Streszczenie

Prezentowana rozprawa doktorska została poświęcona identyfikacji biomarkerów Ramana różnicujących tkankę o utkaniu prawidłowym, pochodzącą z marginesu bezpieczeństwa, od tkanki zmienionej nowotworowo oraz monitorowaniu zmian proteomicznych, glikomicznych, lipidomicznych, metabolicznych i epigenetycznych, zachodzących podczas rozwoju procesu nowotworowego.

Przeprowadzone badania wykonane zostały z zastosowaniem spektroskopii Ramana, obrazowania Ramana, mikroskopii sił atomowych (AFM, ang. *atomic force microscopy*) oraz skaningowej mikroskopii bliskiego pola (SNOM, ang. *scanning near field optical microscopy*). Metody spektroskopowe umożliwiły oznaczenie biomarkerów Ramana różnicujących tkankę o utkaniu prawidłowym, pochodzącą z marginesu bezpieczeństwa, od tkanki zmienionej nowotworowo. Techniki standardowo stosowane w diagnostyce nowotworowej, takie jak: mammografia czy ultrasonografia nie charakteryzują się odpowiednio wysoką rozdzielczością, czułością i swoistością oraz nie dostarczają informacji biochemicznej. Przedstawione w rozprawie doktorskiej metody spektroskopii Ramana umożliwiają szybką i precyzyjną analizę, co jest szczególnie ważne w przypadku żywych komórek, gdyż systemy żywe charakteryzują się dynamizmem i zmiennością. Metody spektroskopowe dostarczają ponadto pełną informację o przestrzennej lokalizacji składników biochemicznych w oparciu o analizę widm. Analiza układów biologicznych z zastosowaniem spektroskopii Ramana i obrazowania Ramana, może być przeprowadzana w warunkach otoczenia bez konieczności długotrwałego przygotowywania próbki. Spektroskopia Ramana

światła spolaryzowanego pozwala otrzymać dodatkowe informacje dotyczące symetrii drgań oraz uzyskać wyższą czułość i swoistość detekcji zmian nowotworowych.

Głównym obiektem prowadzonych badań były wycinki ludzkiego gruczołu piersiowego, wycinki ludzkiego gruczołu ślinowego oraz linie komórkowe: MCF10A, MCF7 i MDA-MB-231. Badania wykonano dzięki współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi, Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym im. Mikołaja Kopernika w Łodzi oraz Międzyresortowym Instytutem Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej. Wszystkie badania były przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (zgodą numer RNN/45/14/KE/11/03/2014 oraz RNN/323/17/KE/17/10/2017).

W pierwszej części pracy przedstawiono wyniki badań dla wycinków ludzkiego gruczołu piersiowego. Zbadano próbki pochodzące od 62 pacjentów. Szczególną uwagę poświęcono zagadnieniom: procesowi angiogenezy w tkance zmienionej nowotworowo, metabolizmu glikozylacyjnego, procesowi acetylacji oraz dystrybucji fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej nowotworów. Przeprowadzone badania wykazały, że głównymi markerami różnicującymi tkankę o utkaniu prawidłowym od zmienionej nowotworowo dla gruczołu piersiowego są pasma charakterystyczne dla karotenoidów (1158 cm^{-1} , 1520 cm^{-1}), lipidów (1444 cm^{-1} , 1656 cm^{-1} , 2854 cm^{-1}), kwasów tłuszczowych (1248 cm^{-1}), węglowodanów (582 cm^{-1} , 1484 cm^{-1}) oraz protein (1670 cm^{-1} , 2917 cm^{-1}). Z wykorzystaniem spektroskopii i obrazowania Ramana zbadano rozkład fotouczulacza na przykładzie hematoporfiryny dla tkanki pochodzącej z gruczołu piersiowego. Uzyskane wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że poziom fotouczulacza w tkance zmienionej nowotworowo jest wyższy niż w tkance pochodzącej z marginesu bezpieczeństwa. Kolejnym aspektem badań było zastosowanie spektroskopii Ramana i obrazowania Ramana w świetle spolaryzowanym w płaszczyznach prostopadłych i równoległych do płaszczyzny polaryzacji laserowej wiązki wzbudzającej, co umożliwiło otrzymanie wyższej czułości i swoistości oraz uzyskanie dodatkowych informacji dotyczących symetrii drgań w porównaniu z konwencjonalną spektroskopią Ramana w świetle niespolaryzowanym.

W dalszej części pracy przedstawiono analizę zmian metabolicznych w wycinkach ludzkiego gruczołu ślinowego. Otrzymane wyniki wykazały, że profil proteomu pełni ważną rolę w różnicowaniu tkanki zdrowej od zmienionej nowotworowo. Zaobserwowano, że tkanka z marginesu bezpieczeństwa zdominowana jest przez obecność α -helisy, natomiast tkanka zmieniona nowotworowo zdominowana jest przez obecność β -harmonijki.

W ostatniej części pracy przedstawiono wyniki uzyskane dla kultur komórkowych o różnym stopniu agresywności. Wykazano, że liczba kropli tłuszczowych w poszczególnych liniach komórkowych jest różna. Najwięcej kropli tłuszczowych zidentyfikowano w linii wysoce agresywnej komórek MDA-MB-231, zaś najmniej w komórkach normalnych MCF10A, a tym samym wykazano korelację pomiędzy liczbą kropli tłuszczowych w komórkach, a ich agresywnością. Ponadto wykazano, że krople tłuszczowe różnią się od adipocytów nie tylko rozmiarem, ale także odmiennym składem biochemicznym. Widmo Ramana kropli tłuszczowych jest zgodne spektralnie z widmem Ramana dla kwasu arachidonowego, zaś widmo Ramana adipocytu wykazuje dużą zgodność spektralną z widmem Ramana kwasu oleinowego. Dokonano także analizy zmian epigenetycznych w wymienionych liniach komórkowych. Stwierdzono przesunięcie ku wyższym częstościom pasma drgania pochodzącego od grupy metylowej w funkcji złośliwości linii komórkowej.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej dysertacji jednoznacznie potwierdzają, że zmiany nowotworowe wycinków ludzkiego gruczołu piersiowego, ludzkiego gruczołu ślinowego, a także biochemiczna charakterystyka linii komórkowych MCF10A, MCF7 oraz MDA-MB-231 mogą być monitorowane metodami spektroskopii wibracyjnej Ramana. Spektroskopia Ramana stwarza nową perspektywę w badaniach dotyczących diagnostyki nowotworów umożliwiając identyfikację zmian patologicznych z rozdzielczością rzędu ułamka mikrometrów.

Techniki AFM i SNOM zostały wykorzystane do wysokorozdzielczej wizualizacji topografii tkanek i komórek w skali nanometrycznej.

Przedstawione wyniki potwierdzają potencjalne możliwości zastosowania metod spektroskopii wibracyjnej w diagnostyce onkologicznej.

Łódź, 20.04.2018+

Monika Kopec