

„Metody spektroskopowe w badaniach toksyczności nowotworów pierwotnych po implantacji do mózgu szczura”

Streszczenie

Nowotwory złośliwe są drugą w kolejności przyczyną zgonów wśród kobiet i mężczyzn w Polsce, a ok. 5-10% z nich stanowią pierwotne guzy mózgu. Jednym z najbardziej agresywnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, stanowiącym ok. 16% spośród wszystkich pierwotnych guzów mózgu, jest glejak wielopostaciowy (GBM, ang. *glioblastoma multiforme*). Mimo radykalnych procedur terapeutycznych, śmiertelność z powodu GBM jest wysoka, a mediana przeżycia pacjentów od momentu diagnozy wynosi nie więcej niż 2 lata. Dlatego podejmowanych jest wiele interdyscyplinarnych prac badawczych mających na celu lepsze poznanie natury glejaka oraz zdobycie nowej wiedzy na temat jego patogenezы, a ich realizacja często opiera się na wykorzystaniu modeli zwierzęcych nowotworu.

Głównym celem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej była identyfikacja pierwiastków oraz makromolekuł biologicznych zaangażowanych w rozwój glejaka wielopostaciowego w zwierzęcych modelach tego schorzenia. Pierwszym etapem realizacji założonych celów rozprawy było przeprowadzenie eksperymentu polegającego na implantacji trzech różnych linii ludzkich komórek GBM do mózgow gryzoni. Materiał badawczy stanowiły mózgi pobrane od zwierząt, którym wszczepiono komórki glejaka. Kolejnym krokiem był wybór metody analitycznej, która pozwoliłaby na określenie składu pierwiastkowego całości materiału próbki, tj. półkul mózgu szczurów. Spośród dostępnych metod analizy pierwiastkowej próbek biologicznych wybrano spektroskopię fluorescencji rentgenowskiej z całkowitym odbiciem (TXRF, ang. *Total Reflection X-ray Fluorescence*). Poprzez wyznaczenie parametrów walidacyjnych tj. precyzja, poprawność oraz granice detekcji, a także na podstawie międzylaboratoryjnego porównania rezultatów przeprowadzonych analiz tkanek ssaków, podjęto próbę weryfikacji użyteczności analitycznej metody TXRF dla potrzeb oceny składu pierwiastkowego próbek biologicznych. Następnie, zastosowano metodę fluorescencji rentgenowskiej ze wzbudzeniem promieniowaniem synchrotronowym (SR-XRF, ang. *Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence*), która pozwoliła na uwidocznienie zmian w dystrybucji pierwiastków w badanych tkankach mózgu. Z kolei, anomalie w rozmieszczeniu oraz strukturze biomolekuł w tkankach zbadano wykorzystując mikrospektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR, ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) oraz mikroskopię Ramana.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły wysoką użyteczność metody TXRF w analizie próbek pochodzenia biologicznego, przede wszystkim dla pierwiastków o wyższej liczbie atomowej. Badania przeprowadzone tą metodą pozwoliły wskazać pierwiastki potencjalnie zaangażowane w rozwój glejaka wielopostaciowego, a liczba obserwowanych anomalii w składzie pierwiastkowym próbek korelowała ze stopniem inwazyjności implantowanych do mózgu gryzoni komórek. Analiza topograficzna, wykonana z

zastosowaniem metody SR-XRF, uwidoczniła rozbieżności w akumulacji pierwiastków w tkankach objętych rozwojem nowotworu oraz jego otoczeniu, a także niejednorodności w strukturze guza rozwiniętego w jednym z badanych modeli. Porównanie map rozmieszczenia pierwiastków z obrazami mikroskopowymi badanych tkanek pozwoliło na omówienie potencjalnych przyczyn obserwowanych anomalii w modelach zwierzęcych GBM, a w szczególności wskazać selen jako możliwy biomarker jego rozwoju. Analiza biochemiczna tkanek, przeprowadzona z wykorzystaniem mikrospektroskopii FTIR i Ramana, wykazała obecność w mózgach szczurów lokalnych zmian w gromadzeniu biomolekuł spowodowanych rozwojem glejaka. W szczególności zaobserwowano, iż rejony dotknięte procesem nowotworzenia charakteryzują się zmniejszoną zawartością lipidów, kwasów nukleinowych oraz związków zawierających grupy karbonylowe, a także zmianami w zawartości i strukturze białek.

Podsumowując, w rozprawie doktorskiej, dzięki zastosowaniu metod spektroskopowych, możliwe było porównanie toksyczności glejaka wielopostaciowego rozwiniętego z różnych linii komórkowych. Otrzymane wyniki badań korelowały ze zmianami histologicznymi tkanek, powstałymi wskutek rozwoju nowotworu. Przeprowadzone analizy pozwoliły na wskazanie potencjalnych pierwiastkowych i molekularnych markerów toksyczności GBM.