

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

SANDRA TAMOŠAITYTĖ

PATOLOGINIŲ NERVŲ SISTEMOS AUDINIŲ
CHEMINIS VAIZDINIMAS NAUDOJANT TIESINĘ IR NETIESINĘ
VIRPESINĘ MIKROSKOPIJĄ

Daktaro disertacijos santrauka

Fiziniai mokslai, Fizika (02P)

Vilnius, 2018

Disertacija rengta 2013 – 2018 metais Vilniaus Universiteto Cheminės fizikos institute ir Drezdeno technikos universiteto medicinos fakulteto anesteziologijos ir intensyviosios terapijos medicinos „Clinical sensing and monitoring“ padalinyje.

Mokslinis vadovas – prof. dr. Valdas Šablinskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika - 02P).

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Gerald Steiner (Drezdeno technikos universitetas, fiziniai mokslai, fizika - 02P).

Disertacija ginama viešame disertacijos gynimo tarybos posėdyje:

Pirmininkas – prof. dr. Ričardas Rotomskis (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

Nariai:

Prof. dr. Saulius Bagdonas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P);

Dr. Andrej Dementjev (Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, fizika – 02P);

Prof. dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02B);

Dr. Lars Kirsten (Drezdeno technikos universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

Disertacija bus ginama viešame disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2018 metų spalio mėn. 11 d. 14 val. Vilniaus universiteto fizikos fakulteto 212 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 9, III-iasis korpusas, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2018 m. rugsėjo 11 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto, Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

VILNIUS UNIVERSITY
CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

SANDRA TAMOŠAITYTĖ

LINEAR AND NON-LINEAR VIBRATIONAL
MICROSCOPY-BASED CHEMICAL IMAGING OF PATHOLOGIC
CENTRAL NERVOUS SYSTEM TISSUE

Summary of doctoral dissertation

Physical Sciences, Physics (02P)

Vilnius, 2018

The dissertation has been prepared during the years 2013 – 2018 at Institute of Chemical Physics, Vilnius University and dept. of Clinical Sensing and Monitoring, Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Faculty of Medicine, Technical University Dresden.

Supervisor – prof. dr. Valdas Šablinskas (Vilnius University, physical sciences, physics – 02P).

Advisor – prof. dr. Gerald Steiner (Technical University Dresden, physical sciences, physics – 02P).

Dissertation will be defended in the open session of Council for Dissertation Defence:

Chairman – prof. dr. Ričardas Rotomskis (Vilnius University, physical sciences, physics – 02P).

Members:

Prof. dr. Saulius Bagdonas (Vilnius University, physical sciences, physics – 02P);

Dr. Andrej Dementjev (Center for Physical Sciences and Technology, physical sciences, physics – 02P);

Prof. dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilnius University, biomedical sciences, biophysics – 02 B);

Dr. Lars Kirsten (Technical University Dresden, physical sciences, physics – 02P).

The dissertation will be defended in the open session of Council for Dissertation Defence on 11th of October 2018 at 14 o'clock in Vilnius University, Faculty of Physics, room 212.

Address: Saulėtekio av. 9, building III, Vilnius, Lithuania.

The Summary of the dissertation has been sent out on 11th of September 2018.

The dissertation is available in the Vilnius University Library, Library of Center for Physical Sciences and Technology and on Vilnius University website: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

IVADAS	6
PAGRINDINIS DISERTACIJOS TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	8
GINAMIEJI TEIGINIAI	9
DARBO NAUJUMAS IR AKTUALUMAS	10
PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMATIKA SĄRAŠAS	11
PUBLIKACIJŲ NE DISERTACIJOS TEMATIKA SĄRAŠAS	11
PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE	12
DALYVAVIMAS JAUNŲJŲ MOKSLININKŲ MOKYKLOSE	13
DISERTACIJOS SANTRAUKA	14
1 DISERTACIJOS SANDARA	14
2 TYRIMŲ APARATŪRA	14
3 BIOLOGINIŲ AUDINIŲ PARUOŠIMAS DAUGIAKANALĖS <i>CARS</i> MIKROSKOPIJOS EKSPERIMENTAMS: PLONŲ AUDINIO SLUOKSNIŲ DEPARAFINIZACIJOS ĮTAKA NETIESINĖS OPTINĖS MIKROSKOPIJOS ATVAIZDŲ TEIKIAMAI MORFOCHEMINEI INFORMACIJAI	16
<i>3.1 EKSPERIMENTINĖ DALIS</i>	16
<i>3.2 REZULTATAI</i>	18
<i>3.3 IŠVADOS</i>	24
4 <i>CARS</i> MIKROSKOPIJOS TAIKYMAS TIRIANT SMEGENŲ NAVIKUS	25
<i>4.1 EKSPERIMENTINĖ DALIS</i>	25
<i>4.2 REZULTATAI</i>	26
<i>4.3 IŠVADOS</i>	33
5 VIRPESINĖS MIKROSPEKTROMETRIJOS BEI DAUGIAKANALĖS <i>CARS</i> MIKROSKOPIJOS TAIKYMAS TIRIANT STUBURO SMEGENŲ AUDINIO PAŽAIDŲ GYDYMO POVEIKĮ	34
<i>5.1 EKSPERIMENTINĖ DALIS</i>	35
<i>5.2 REZULTATAI</i>	36
<i>5.3 IŠVADOS</i>	47
BIBLIOGRAFIJA	49

ĮVADAS

Gyvųjų organizmų struktūra, augimas ir tinkamas funkcionavimas nėra įmanomas be biologinių molekulių bei iš jų sudarytų audinių. Todėl jų tyrimai yra itin reikšmingi biomedicinos ir bioanalizės srityse ir yra įgyvendinami įvairiais metodais. Vienas iš jų, taikomas itin plačiai, yra optiniai metodai [1]. Įprastinė optinė mikroskopija, įskaitant populiariausias šviesos [2] ar diferencinio interferencijos kontrasto mikroskopijas [3], vaizdina biologinio audinio morfologinę struktūrą, tačiau apie audinį sudarančius cheminius komponentus bei jų pasiskirstymą informacijos nesuteikia. Šiuo metu itin plačiai taikomos imunohistocheminio vaizdinimo metodikos, paremtos molekulių dažymu specifiniais egzogeniniais molekuliniiais žymekliais, suteikia esminę morfologinę ir cheminę informaciją [4]. Tačiau dažymo žymeklių prijungimas prie biomolekulių yra invazinis metodas ir gali sutrikdyti natūralią biomolekulių būseną ir jų aplinką [5].

Dėl augančio klinikinių taikymų poreikio ir siekiant tobulinti ligų diagnostiką, yra intensyviai vystomos naujos vaizdinimo metodikos, pasižyminčios jautrumu, cheminiu atrankumu ir galimybe vaizdinti be papildomo molekulių dažymo. Idealiu atveju toks vaizdinimas turėtų būti paremtas savitųjų biomolekulių savybių skirtumais ir dėl to būtų neinvazinis.

Vienas tokių metodų yra tiesinė virpesinė spektrinė mikroskopija (arba kitaip vadinama tiesinė virpesinė mikrospektrometrija), kurios fizikinis pagrindas – būdingieji molekuliniai virpesiai. Informacija apie bandinio morfocheminę struktūrą be papildomo egzogeninio biomolekulių dažymo slypi užregistruotame duomenų masyve, sudarytame iš virpesinių spektrų, susietų su atitinkamomis bandinio pozicijomis [6,7]. Visgi, tiesinė virpesinė spektrinė mikroskopija turi kelis esminius trūkumus. Pagrindiniai ribojantys veiksniai infraraudonosios (IR) spektrinės mikroskopijos atveju yra (i) sąlyginai nedidelė erdvinė skyra ir (ii) biologiniuose bandiniuose vandens sąlygota stipri IR spinduliuotės sugertis [8,9]. Ramano spektrinė mikroskopija pastaryjų trūkumų neturi, tačiau susiduria su kitomis problemomis. Pirmiausia, spontantinės Ramano sklaidos (arba

neelastinės sklaidos) vyksmo tikimybės skerspjūvis atitinka tik vieną iš nuo 10^3 iki 10^6 neelastiškai sklaidomą fotoną [10]. Dėl to Ramano spektrų registravimui yra reikalingos didelės žadinančių lazerių galios ir (arba) ilgos signalo registravimo trukmės, vienam spektrui siekiančios iki kelių sekundžių. Be to, foninis bandinio savaiminės fluorescencijos signalas dažnai neleidžia išskirti bandinio virpesinės spektrinės informacijos [11].

Detali morfocheminė informacija apie biologinį audinį gali būti gauta, taikant netiesinius Ramano spektrometrijos metodus, vienas iš kurių – koherentinės anti-Stokso Ramano sklaidos (*angl. Coherent anti-Stokes Raman Scattering – CARS*) mikroskopija. CARS reiškiny yra netiesinis spontaninės Ramano sklaidos analogas. Vienos juostos CARS vaizdinimo atveju registruojamas virpesinis rezonansinis signalas yra sąlygotas tik vienos Ramano sklaidai aktyvios virpesinės modos, kurią galima parinkti tinkamai suderinus žadinimo spinduliuočių bangos ilgius. Jeigu ši virpesinė moda yra intensyvi ir virpesiniuose spektruose nepersikloja su kitomis, galimas greitas ir betarpiškas (išvengiant bandinio dažymo ar spektrų matematinės analizės) tam tikro cheminio komponento pasiskirstymo bandinyje vaizdinimas. Lyginant su tiesine Ramano spektrine mikroskopija, CARS mikroskopijoje visuminė informacija apie molekulės virpesius prarandama: vietoj to, kad kiekviename bandinio erdvės taške būtų registruojama po pilnutinį Ramano spektrą, kiekviename taške yra registruojamas tik vienos virpesinės modos anti-Stokso Ramano sklaidos intensyvumas. Cheminės informacijos praradimas kompensuojamas žymiai didesniu signalo surinkimo greičiu dėl žymiai didesnio CARS signalo intensyvumo [12]. Be to, CARS mikroskopo konfigūracija gali būti nesudėtingai pritaikoma kitų netiesinių optinių signalų, pvz. dvifotonės fluorescencijos (*angl. two-photon excited fluorescence – TPEF*) ir (arba) antrosios harmonikos generacijai (*angl. second harmonic generation – SHG*) bei registravimui. Sujungus CARS ir netiesinės optinės (*angl. nonlinear optical – NLO*) mikroskopijos metodus į daugiamodę netiesinę CARS mikroskopiją, vienu metu, greitai ir be papildomų žymeklių naudojimo, surenkama daug morfocheminės informacijos apie biomolekulių pasiskirstymą audinio bandinyje [13].

Minėtieji virpesinės tiesinės spektrinės mikroskopijos ir netiesinės daugiakanalio vaizdinimo *CARS* mikroskopijos vaizdinimo metodai sulaukia vis didesnio tyrėjų susidomėjimo ne tik juos toliau tobulinant, tačiau ir plečiant jų taikymo galimybes bei ieškant potencialių jų taikymo sričių. Viena iš dar galutinai neišnagrinėtų problemų yra bandinių paruošimo įtaka virpesine spektrometrija paremto mikroskopinio vaizdinimo rezultatams. Pavyzdžiui, nors formalinu fiksuoti parafine išsaugoti (*angl. formalin-fixed paraffin-preserved – FFPP*) smegenų audinio bandiniai galėtų būti itin reikšmingi didelio masto retrospektyviniams tyrimams, jų *CARS* atvaizdų kokybė bei tinkamumas, tiriant nervinio audinio patologijas, dar nebuvo įvertintas. Be to, nors virpesiniai spektriniai ir *CARS* mikroskopijos metodai yra itin parankūs tirti centrinės nervų sistemos (CNS) audinius bei su jų pakitimais susijusias ligas [14], tokias kaip nugaros smegenų pažaidos [15] ar smegenų navikai [16–19], šių metodų kompleksiškas taikymas, siekiant kuo visapusiškiau įvertinti ligų atveju pasireiškiančius morfocheminius audinio pokyčius, yra epizodiškas. Tik detaliai įvertinus virpesine spektrometrija paremtų metodų informatyvumo galimybes bei ribas, galima spręsti apie jų nuolatinio ir pastovaus taikymo potencialą klinikinėje praktikoje.

Pagrindinis disertacijos tikslas ir uždaviniai

Pagrindinis šios disertacijos tikslas – kompleksiskai pritaikyti eksperimentinius tiesinės ir netiesinės virpesinės mikroskopijos metodus ir tinkamai parinkti spektrinių duomenų analizės būdus tam, kad: (i) minėtieji vaizdinimo būdai būtų įvertinti kaip eksperimentiniai metodai diagnostinės neuropatologijos taikymuose ir nervinio audinio gydymo poveikio stebėjimui; (ii) būtų pateikta naujų įžvalgų apie ligos ar pažaidų sukeltus centrinės nervų sistemos audinių biocheminius pokyčius.

Tikslui pasiekti buvo suformuluoti šie uždaviniai:

1. Atlikti parafine saugomų smegenų audinių sluoksnių deparafinizacijos įtakos šių sluoksnių daugiakanaliams *CARS* atvaizdams analizę bei nustatyti daugiakanalio *CARS* vaizdinimo eksperimentams tinkamiausią centrinės nervų sistemos audinių saugojimo būdą.

2. Patvirtinti *CARS* mikroskopiją kaip tinkamą metodą tiksliam pirminių ir metastazinių smegenų navikų bei jų ribų nustatymui ir patvirtinti *CARS* mikroskopijos rezultatus Ramano spektrinės mikroskopijos pagalba.
3. Pritaikyti ir įvertinti FT-IR ir Ramano mikrospektroskopinį bei daugiakanalį *CARS* mikroskopinį vaizdinimo metodus, įvertinant minkšto alginato hidrogelio implantų gydomąjį poveikį ir stebint pastaruosius implantus stuburo smegenų pažaidose.
4. Pritaikyti Ramano spektrinį bei dvikanalį *CARS* ir *TPEF* mikroskopinį vaizdinimo metodus, charakterizuojant stuburo smegenų pažaidos sužadinto uždegimo sukeltus centrinės nervų sistemos audinių lipidų pokyčius.

Ginamieji teiginiai

1. Nepaisant lipidų pašalinimo ir parafino likučių sąlygotų artefaktų, deparafinizuotų smegenų audinio sluoksnių Ramano ir *CARS* atvaizdai suteikia morfocheminę informaciją. Visgi, pastaraisiais metodais tiriant smegenų audinio deparafinizuotus sluoksnius, gautoji biocheminė informacija yra ribota, o audinio bandinio saugojimas jį užšaldant yra tinkamiausias metodas siekiant gauti visapusiškesnius rezultatus apie audinio biochemiją.
2. Vidutinis *CARS* signalo intensyvumas navikuose buvo 30 %–40 %, mažesnis nei normaliame pilkosios medžiagos audinyje, ir priklausė nuo naviko tipo. Todėl *CARS* signalo intensyvumo verčių santykis tarp naviko ir normalios pilkosios medžiagos audinio gali būti laikomas tinkamu parametru, nustatant vienalyčio naviko poziciją, jo ribas ir vėžinių ląstelių infiltracijos sritis.
3. Kiekybiniai spektrinių duomenų analizės rezultatai leidžia daryti išvadas, jog minkšto alginato hidrogelio implantai lėtinėje stuburo pažaidos stadijoje sąlygoja reikšmingai didesnį lipidų kiekį priešais stuburo smegenų pažaidą esančiame baltosios medžiagos ruože ir reikšmingą fibrotinio rando suplonėjimą.

4. FT-IR ir Ramano mikrospektrometrijos metodai įgalina aptikti alginato hidrogelio implantus stuburo smegenų pažaidose ir, naudojantis šių implantų spektriniais požymiais, stuburo smegenų audinyje stebėti šių implantų cheminį stabilumą.
5. Karbonilo funkcinės grupės valentinius virpesius atitinkanti Ramano spektrinė juosta ties 1743 cm^{-1} yra tinkamas spektrinis žymuo, stuburo smegenų pažaidų Ramano spektriniuose žemėlapiuose nustatant uždeginimes sritis, o chemometrinė Ramano spektrinių duomenų analizė parodo, jog pastarosios sritys yra gausios sočiųjų riebalų rūgščių.

Darbo naujumas ir aktualumas

- Virpesinės mikrospektrometrijos ir daugiakanalės *CARS* mikroskopijos metodai turi didelį potencialą jų, kaip pavienių metodų, ar kompleksiniam taikymui, atvaizduojant įvairių CNS audinio patologijų morfochemiją. Tai daro šiuos metodus itin perspektyvius jų perkėlimui į klinikinius diagnostinius, gydymo poveikio stebėjimo ar net operacinius taikymus.
- Kadangi *CARS* vaizdinimo informatyvumo įvertinimui, aptinkant smegenų navikus bei juos charakterizuojant, vis dar trūksta išsamių ir lyginamųjų studijų, šiame darbe buvo ištirtas išplėstinis pirminių ir antrinių navikų rinkinys, išaugintas pelių modelyje, o taip pat žmogaus smegenų navikai, pašalinti chirurginių operacijų metu.
- Pirmą kartą išsamiai įvertintas stebimas *CARS* signalo intensyvumo sumažėjimas smegenų navikose: jis gali atsirasti ne tik dėl didesnio lipidų negausių audinio struktūrų kiekio, tačiau taip pat gali būti bendroji vėžinio audinio biocheminė charakteristika.
- Naujas nefunkcionalizuotas minkštas alginato hidrogelis buvo pritaikytas kaip galimas stuburo smegenų pažaidų gydymo būdas. Kompleksinis FT-IR, Ramano ir daugiakanalio *CARS* vaizdinimo taikymas puikiai tinka visapusiškam morfocheminiam stuburo smegenų pažaidų gydymo strategijų įvertinimui.

- Iki šiol stuburo smegenų pažeidimų tyrimuose Ramano spektrometrijos metodais buvo tirta tik demielinizacija ir fibrotinio rando susidarymas, o uždegimas buvo ignoruojamas. Šiame darbe Ramano spektrinės mikroskopijos ir netiesinės CARS mikroskopijos metodai buvo sėkmingai pritaikyti, tiriant CNS pažeidimų sukeltą uždegimą ir jo sąlygotus lipidų pokyčius.

Publikacijų disertacijos tematika sąrašas

1. **S. Tamosaityte**, R. Galli, O. Uckermann, K. H. Sitoci-Ficici, M. Koch, R. Later, G. Schackert, E. Koch, G. Steiner, M. Kirsch. Inflammation-related alterations of lipids after spinal cord injury revealed by Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* (2016).
2. R. Galli, **S.Tamosaityte**, M.Koch, K.H.Sitoci-Ficici, R.Later, O.Uckermann, R.Beiermeister, M.Gelinsky, G.Schackert, M.Kirsch, E.Koch, and G.Steiner. Raman-based imaging uncovers the effects of alginate hydrogel implants in spinal cord injury. *Proc. SPIE*. 9536 (2015).
3. **S. Tamosaityte**, R. Galli, O. Uckermann, K. H. Sitoci-Ficici, R. Later, R. Beiermeister, F. Doberenz, M. Gelinsky, E. Leipnitz, G. Schackert, E. Koch, V. Sablinskas, G. Steiner, M. Kirsch. Biochemical Monitoring of Spinal Cord Injury by FT-IR Spectroscopy—Effects of Therapeutic Alginate Implant in Rat Models. *PLoS ONE* 11(2): e0150237 (2015).
4. O. Uckermann, R. Galli, **S. Tamosaityte**, E. Leipnitz, K. D. Geiger, G. Schackert, E. Koch, G. Steiner, M. Kirsch. Label-Free Delineation of Brain Tumors by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy in an Orthotopic Mouse Model and Human Glioblastoma, *PLoS ONE*, 9(9), 1-9 (2014).

Publikacijų ne disertacijos tematika sąrašas

1. M. Pucetaite, **S. Tamosaityte**, R. Galli, V. Sablinskas, G. Steiner. Microstructure of urinary stones as studied by means of multimodal nonlinear optical imaging. *J. Raman Spectrosc.* (2016).

2. M. Pucetaite, M. Velicka, **S. Tamosaityte**, V. Sablinskas, Application of SERS spectroscopy for detection of trace components in urinary deposits. *Proc. SPIE*. 8957 (2014).
3. M. Pucetaite, **S. Tamosaityte**, A. Engdahl, J. Ceponkus, V. Sablinskas, P. Uvdal. Microspectroscopic infrared specular reflection chemical imaging of multi-component urinary stones: MIR vs. FIR. *Cent. Eur. J. Chem.* 12(1), 44-52 (2014).

Pranešimai konferencijose

1. **S. Tamosaityte**, R. Galli, O. Uckermann, E. Leinritz, G. Steiner, M. Kirsch. Multiphoton imaging of deparaffinized brain tissue sections, 68th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery (DGNC), 2017 May, Magdeburg, Germany.
2. **S. Tamosaityte**, R. Galli, O. Uckermann, K. H. Sitoci-Ficici, M. Koch, R. Later, G. Schackert , E. Koch, G. Steiner, M. Kirsch, Raman spectroscopy uncovers inflammation changes of lipids initiated by spinal cord injury, 10th CRTD Summer Conference on Regenerative Medicine 2016 June, Dresden, Germany.
3. **S. Tamosaityte**, R. Galli, O. Uckermann, K. H. Sitoci-Ficici, E. Koch, G. Steiner, M. Kirsch, Raman spectroscopy reveals inflammation-related changes of lipids following spinal cord injury, 67th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery (DGNC), 2016 June, Dresden, Germany.
4. **S. Tamosaityte**, R. Galli, O. Uckermann, K. H. Sitoci-Ficici, E. Koch, M. Gelinsky, M. Kirsch, G. Steiner, Alginate implants for regeneration of spinal cord injury – biochemical monitoring by FT-IR imaging, 10th European Biophysics Congress (EBSA 2015), 2015 liepos 18-22, Drezdenas, Vokietija.
5. R. Galli, **S. Tamosaityte**, M. Koch, K. H. Sitoci-Ficici, R. Later, O. Uckermann, R. Beiermeister, M. Gelinsky, G. Schackert, M. Kirsch, E. Koch, G. Steiner, Raman-based imaging uncovers the effects of alginate hydrogel implants in spinal cord injury, European Conferences on Biomedical Optics (ECBO 2015), 2015 birželio 21-25, Miunchenas, Vokietija.

6. **S. Tamosaityte**, R. Galli, O. Uckermann, K. Hakan Sitoci-Ficici, E. Koch, M. Gelinsky, M. Kirsch, G. Steiner, Label – free infrared spectroscopy imaging helps to assess the morphochemistry of experimental alginate – implanted spinal cord injury, 8th CRTD Summer Conference on Regenerative Medicine 2014 birželis, Drezdenas, Vokietija.
7. **S. Tamosaityte**, R. Galli, O. Uckermann, K. Hakan Sitoci-Ficici, E. Koch, M. Gelinsky, M. Kirsch, G. Steiner, Morphochemical effects of alginate implants for treatment of experimental spinal cord injury, 65th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery (DGNC), 2014 gegužė, Drezdenas, Vokietija.
8. **S. Tamosaityte**, V. Sablinskas, FT – Raman spectroscopy for assessment of chemical composition of urinary sediments, Developments in Optics and Communications, 10th International Young Scientist conference, 2014 balandis, Ryga, Latvija.

Dalyvavimas jaunųjų mokslininkų mokyklose

1. Seminaras „Spectroscopies in Biology“. Organizuota European Biophysical Societies' Association (EBSA), Radebergas, Vokietija, 2015 metai, liepos 15–18.
2. Vasaros mokykla „Biophotonics '15“. Organizuota Department of Physics, Lundo Universitetas ir Department of Photonics Engineering, Danijos technikos universitetas, Ven sala, Švedija, 2015 metai, birželio 6–13. Pristatytas stendinis pranešimas: “S. Tamosaityte, Vibrational spectroscopy-based imaging techniques provide biochemical information of effects of alginate hydrogel implants in spinal cord injury model” buvo įvertintas pagrindiniu prizu.
3. Laserlab III mokykla “Laser Applications in Spectroscopy, Industry and Medicine”, organizuota kietojo kūno fizikos instituto, Ryga, Latvija, 2014 metai, liepos 9–12.
4. Rudens mokykla „Science with advanced coherent light sources“. Organizuota DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron National Research Center), Hamburgas, Vokietija, 2013 metai, spalio 7–11.

DISERTACIJOS SANTRAUKA

1 Disertacijos sandara

Disertaciją sudaro įžanga, trys skyriai ir literatūros sąrašas. Įvade pristatoma disertacijos tematika ir aptariamos su tematika susijusios problemos. Taip pat apibrėžiamas pagrindinis darbo tikslas, keturios užduotys, pristatomi ginamieji teiginiai bei darbo svarba ir naujumas, nurodomos su disertacija susijusios autorės mokslinės publikacijos. Pirmajame skyriuje yra apžvelgiama su disertacijos tematika susijusi literatūra. Antrajame skyriuje pristatoma darbo eksperimentinė metodika, trečiajame – pasiekti rezultatai ir išvados. Trečiasis skyrius, pagal konkrečią problematiką, yra padalintas į tris poskyrius, kurių kiekvieno pabaigoje pateikiamos atitinkamos išvados.

2 Tyrimų aparatūra

Infraraudonosios spinduliuotės pralaidumo spektrai buvo registruojami FT-IR spektrometru Tensor 27 su integruotu IR mikroskopu Hyperion 3000 (abu iš Bruker Optic GmbH, Ettlingen, Germany). Spektrometro interferometre moduluota IR spinduliuotė įvedama į IR mikroskopą ir į bandinį fokusuojama 15×/0.4NA Kasegreno objektyvu. Spinduliuotė registruojama 68×68 taškų daugiakanaliu *MCT* puslaidininkiniu jutikliu, atšaldomu skystu azotu. Rezultatuose pateiktiems spektrams atliktos atraminio spektro atimties, atmosferos IR spinduliuotės sugerties įtakos kompensacijos ir bazinės linijos korekcijos operacijos. IR pralaidumo spektrai buvo transformuoti į sugerties spektrus.

Ramano spektrinės mikroskopijos eksperimentuose buvo naudojamas gardelinis Ramano spektrometras (RamanRxn1, Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, MI) su integruotu optiniu mikroskopu (DM2500 P, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Ramano sklaidos žadinimui spektrometre yra integruotas diodinis lazeris

(785 nm). Žadinančios spinduliuotės pluoštas į mikroskopą patenka per 100 μm skersmens optinį šviesolaidį ir fokusuojamas į bandinį 50×/0.75NA objektyvu. Sufokusuoto spinduliuotės pluošto diametras yra apie 20 μm. Spontantinės Ramano sklaidos spinduliuotė yra surenkama atgal į objektyvą ir per 62,5 μm skersmens optinį šviesolaidį nukreipiama į gardelinį spektrometrą.

Daugiakanalės CARS mikroskopijos sistemoje bandinio žadinimui naudojami dviejų skaidulinių lazerių spinduliuotės pluoštai. CARS procesui žadinti, „kaupinančioji“ spinduliuotė yra generuojama lazerio „Femto Fiber pro NIR“ (Toptica Photonics AG, Munich, Germany). Šios spinduliuotės bangos ilgis – 780 nm, impulso trukmė – 1,2 ps, vidutinė galia ~100 mW. „Stokso“ spinduliuotę generuojantis lazeris „Femto Fiber pro TNIR“ (Toptica Photonics AG, Munich, Germany) gali būti derinamas 850 nm – 1100 nm bangos ilgių ribose, jo impulso trukmė – 0,8 ps. CARS eksperimentų metu Stokso lazeris buvo suderintas generuoti 1005 nm (vidutinė galia ~2 mW) bangos ilgio spinduliuotę. Tuomet CARS reiškinys vyksta žadinant simetrinį valentinį metileno funkcinės grupės virpesį ties 2850 cm⁻¹. Kaupinančio ir Stokso lazerių spinduliuotė suderinama laike, naudojant laikinio vėlinimo optinę sistemą. Spinduliuotės optiniame kelyje esantis spinduliuotės daliklis įgalina erdvinę šių spinduliuočių superpoziciją. Laike ir erdvėje suderinta spinduliuotė per optinių komponentų sistemą nukreipiama į daugiakanalio vaizdinimo mikroskopą Axio Examiner Z.1, sujungtą su galvanometriniu skenuojančiu moduliu LSM 7 MP (abu iš Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Spinduliuotės fokusavimui į bandinį galimi objektyvai yra šie: (i) Plan Achromat, 5×/0.18 NA (tik šviesos mikroskopijai), (ii) Plan Achromat, 10×/0.45 NA, (iii) Plan Achromat, 20×/0.8 NA, (iv) Plan-Achromat 20×/1 NA (vandens imersinis objektyvas) ir (v) C-Achromat, 32×/0.85 NA (vandens imersinis objektyvas). Signalų registravimui naudojami nedeskenuojantys (*angl. non-descanned*) jutikliai. CARS signalas registruojamas pralaidumo režimu. Atskirti anti-Stokso spinduliuotę naudojamas juostinio pralaidumo filtras su (i) centriniu pralaidumo dažniu ties 647 nm ir dažnių juostos pločiu – 57 nm arba su (ii) pralaidumu 633 – 647 nm spektrinėje srityje. Antrosios harmonikos generacijos signalas taip pat registruojamas pralaidumo režimu. Pastarajai spinduliuotei

atskirti naudojamas juostinio pralaidumo filtras, kurio centrinis dažnis yra ties 390 nm, o dažnių juostos plotis – 18 nm. Dvifotonės fluorescencijos žadinimo signalas registruojamas 500–550 nm spektrinėje srityje atspindžio režimu. *CARS*, *SHG* ir *TPEF* signalų registravimas yra viena laikis.

3 Biologinių audinių paruošimas daugiakanalės *CARS* mikroskopijos eksperimentams: plonų audinio sluoksnių deparafinizacijos įtaka netiesinės optinės mikroskopijos atvaizdų teikiama morfocheminei informacijai

Siekiant perkelti virpesine spektrometrija paremtus tyrimų metodus į klinikinius taikymus, itin svarbus yra šių metodų suderinamumas su standartinėmis patologinėmis procedūromis. Pavzdžiui, yra itin svarbu, kad įprastiniais patologiniais būdais apdoroti biologiniai bandiniai būtų tinkami ir tokius bandinius tiriant tiesinės virpesinės mikrospektrometrijos bei daugiakanalės *CARS* mikroskopijos metodais.

Tiesinė virpesinė spektrometrija bei *CARS* mikroskopija jau buvo taikytos užšaldytų ir šviežių audinių tyrimuose. Taip pat tyrimais buvo parodyta, kad reikšmingi spektriniai skirtumai tarp užšaldytų ir šviežių audinių nėra stebimi [20,21]. Visgi, dažniausiai tokių bandinių kiekis yra ribotas. Iš kitos pusės, plačiausiai taikomas būdas saugoti patologinius bandinius yra jų saugojimas parafino blokuose [22]. Šių bandinių pritaikomumas *CARS* mikroskopijai iki šiol dar nebuvo įvertintas ir todėl buvo tiriamas šiame darbe.

3.1 Eksperimentinė dalis

Pelių smegenys ir žmogaus smegenų biopsijos (3 pirminiai navikai ir 5 metastazės), pašalintos smegenų auglių operacijų metu, buvo įterptos į parafino blokus, naudojant fiksacijos formalinu ir išsaugojimo parafine metodiką (angl. *formalin-fixation paraffin-preservation – FFPP*). Įterpti į parafiną smegenų audiniai buvo mikrotomu padalinti į 4 μm storio sluoksnius, kurie buvo perkelti ant CaF₂ ar stiklo optinių langelių, atitinkamai Ramano spektrinės mikroskopijos ar daugiakanalės daugiafotonės mikroskopijos eksperimentams. Taip paruošti parafine įterptų smegenų audinio

bandiniai buvo deparafinizuoti, laikantis protokolo, pateikto 1 lentelėje. Parafino pašalinimui kaip tirpikliai buvo naudojami ksilenas ar jo pakaitalai.

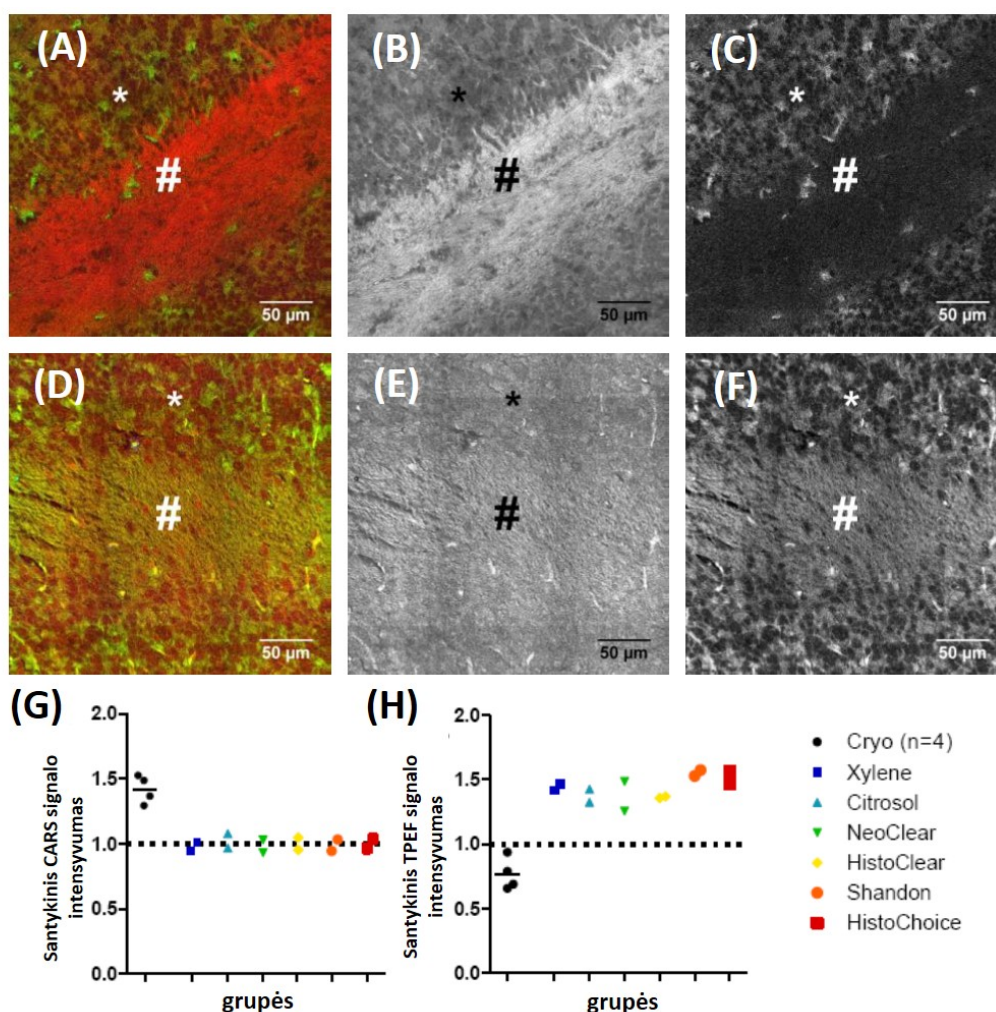
Deparafinizuoti sluoksniai buvo tiriami daugiakanalės *CARS* mikroskopijos ir Ramano spektrinės mikroskopijos metodais. Daugiafotonių atvaizdų analizei buvo naudojama „ImageJ“ programinė įranga. *CARS* ir *TPEF* signalų intensyvumai buvo skaičiuojami pagal iš dešimties 20 μm x 20 μm dydžio sričių gautąsias „mean gray value“ vertes ir sunormuoti į parinktas audinio sritys kiekvienam atvaizdui atskirai. Naudojantis programine įranga „GraphPad Prism 5“ (GraphPad Software Inc., USA), signalų intensyvumų vertėms, gautoms iš deparafinizuotų ir užšaldytų sluoksnių, palyginti buvo taikomas „two-tailed“ t-testas.

1 lentelė. *FFPP* audinio sluoksnių deparafinizacijos protokolas.

Pakartojimų skaičius	Trukmė	Tirpiklis
3x	5 min	Ksilenas/ksileno pakaitalas
3x	5 min	ethanolis 100%
1x	5 min	ethanolis 96%
1x	5 min	ethanolis 80%
1x	5 min	H ₂ O

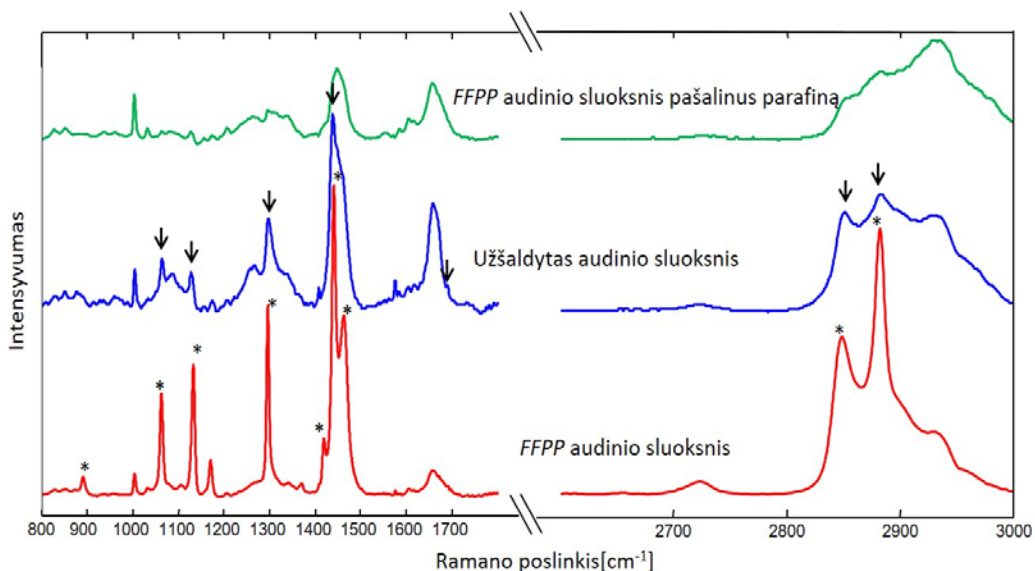
3.2 Rezultatai

Pirmiausia šioje darbo dalyje daugiakanalės *CARS* mikroskopijos ir Ramano spektrinės mikroskopijos metodais buvo tiriami deparafinizuoti pelių smegenų sluoksniai. Pastarieji rezultatai buvo lyginami su rezultatais, gautais iš užšaldymo būdu saugomų pelių smegenų audinių.



1 pav. *CARS* ir *TPEF* signalų intensyvumų pokyčiai pelės smegenų baltojoje medžiagoje, esančioje smegenėlėse. Lyginami užšaldytų (A – C) ir deparafinizuotų (D – F) baltosios medžiagos sluoksnių dvikanaliai (A, D) ir *CARS* (B, E) bei *TPEF* (C, F) signalų intensyvumų atvaizdai (pilkumo tonai). Vidutiniai *CARS* (G) ir *TPEF* (H) signalų intensyvumai aksonų srityje (#) normuoti į atitinkamus intensyvumus granuliuotose ląstelėse (*).

Iš pradžių buvo įvertinta įvairių parafino tirpiklių įtaka deparafinizuotų audinio sluoksnių *CARS* ir *TPEF* atvaizdams. Buvo nustatyta, jog, lyginant su užšaldytų audinių sluoksniais, *CARS* signalo intensyvumas deparafinizuotose sluoksniuose sumažėja (p -vertė < 0.0001) (1 pav.). Visų tirpiklių atveju *CARS* intensyvumo vertė, gauta iš baltosios smegenų



2 pav. Ramano spektroskopija pelės smegenų sluoksnių deparafinizacijos efektams įvertinti. Raudonas spektras užregistruotas prieš sluoksnio deparafinizaciją, žalias – iš to paties sluoksnio po jo deparafinizacijos, mėlynas – iš užšaldyto pjūvio. Žvaigždutėmis (*) pažymėtos intensyviausios parafino spektrinės juostos. Rodyklės pažymi su lipidais susijusias spektrines juostas, kurių nebėra FFPP audinio sluoksnyje po jo deparafinizacijos.

medžiagos ir normuota į intensyvumo vertes, gautas iš pilkosios smegenų medžiagos, buvo apie 1, t. y. *CARS* kontrastas tarp šių struktūrų beveik neegzistuoja. Užšaldytų audinio sluoksnių atveju *CARS* kontrastas tarp pastarųjų smegenų audinių tipų egzistuoja. Šis skirtumas atsiranda, kadangi parafino pašalinimo metu kartu yra ištirpinami ir pašalinami audinio lipidai, o CNS audiniuose Ramano spektrinės juostos ties 2850 cm^{-1} intensyvumo (šiuo atveju ir *CARS* signalo intensyvumo) pokyčiai yra daugiausia susiję su būtent lipidų koncentracijos pokyčiais.

Norint tiksliau įvertinti biocheminius pokyčius, atsirandančius deparafinizuotuose audinių sluoksniuose, jiems tirti buvo pritaikyta Ramano mikrospektrometrija. Buvo palyginti Ramano spektrai, gauti iš užšaldytų sluoksnių ir iš parafine įterptų sluoksnių prieš pastarųjų deparafinizaciją ir po jos. Prieš sluoksnio deparafinizaciją jo Ramano spektre vyravo parafino spektrinės juostos ($\nu[\text{C-C}]$, $\delta[\text{CH}_2]$, $\delta[\text{CH}_3]$ virpesiai, 2 pav. pažymėti *), o audinio spektrinio signalo nebuvo galima išskirti. Tai parodo audinio deparafinizacijos svarbą virpesinės spektrometrijos metodais paremtuose tyrimuose. Lyginant su užšaldyto sluoksnio Ramano spektru, deparafinizuoto audinio sluoksnio

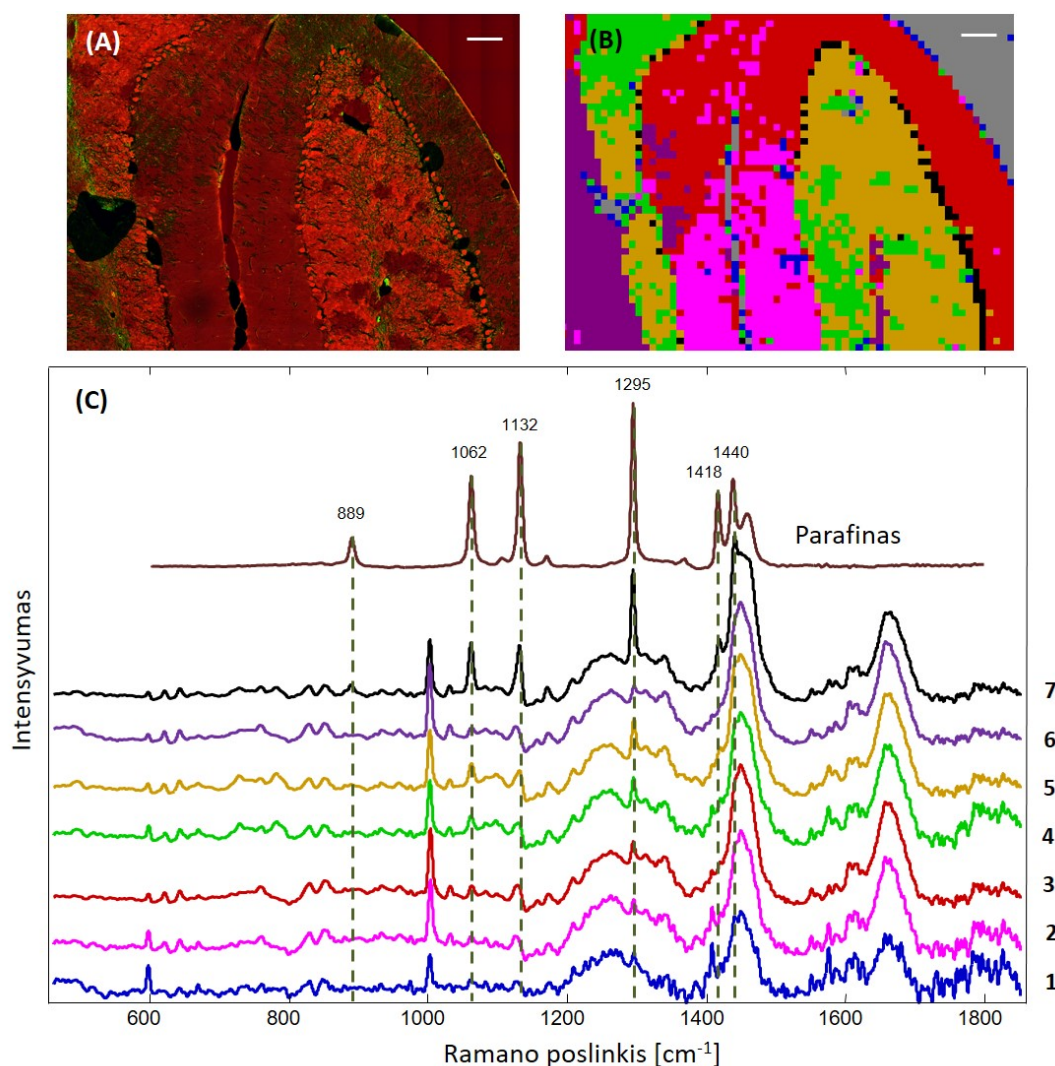
Ramano spektre itin sumažėjo ties 1130 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} ir 1668 cm^{-1} bangos skaičiais esančių spektrinių juostų, atitinkančių lipidams svarbiausias virpesines modas, intensyvumai. Tai dar kartą patvirtina lipidų išplovimą iš audinio.

Deparafinizuotuose sluoksniuose *CARS* atvaizdo kontrastas yra kuriamas dėl baltymų, taip pat turinčių spektrinę juostą ties 2850 cm^{-1} , skirtingos koncentracijos. Užregistruoti deparafinizuotų sluoksnių *CARS* atvaizdai parodė, jog visuminė audinio morfologija buvo išsaugota. Tačiau šiuose bandiniuose taip pat buvo aptiktos neaiškios kilmės, itin stiprų signalą 633–647 nm spektrinėje srityje (minima sritis atitinka spektrinę sritį, apribotą prieš *CARS* signalo jutiklį patalpinto filtro) generuojančios struktūros. Šios struktūros dažniausiai buvo stebimos kaip (i) pavieniai lašeliai; (ii) lašelių sankaupos kai kuriuose neuronų kūnuose; (iii) lašelių sankaupos kai kuriose ląstelėse smegenų žievės išorinėje srityje ir (iv) lašelių sankaupos kapiliaruose. Pirmiausia, atlikus eksperimentus su įjungtu ir išjungtu Stokso lazeriu, buvo parodyta, jog šis signalas 633–647 nm spektrinėje srityje yra sąlygotas ne fluorescencijos, tačiau *CARS* proceso. Pritaikius Ramano spektrinę mikroskopiją, buvo parodyta, kad šie, intensyvų *CARS* signalą generuojantys artefaktai, yra parafino liekanos. Parafino liekanos buvo rastos visuose tirtuose bandiniuose, nepriklausomai nuo deparafinizacijai naudoto tirpiklio. Kokybinis *CARS* atvaizdų ir Ramano spektrų įvertinimas parodė, jog bandiniai, deparafinizuoti su ksilenu buvo linkę turėti mažiausiai parafino liekanų. Todėl, tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas *FFPP* sluoksnių deparafinizacijos su ksilenu protokolas.

Deparafinizacijos procese naudojamas ksilenas taip pat galėtų sąlygoti parazitines spektrines juostas Ramano spektruose, sukelti daugiakanalių *CARS* atvaizdų intensyvumų pokyčius ir (arba) sąlygoti artefaktus *CARS* atvaizduose. Remiantis ksileno Ramano spektrinių juostų analize, buvo aptarta, jog ksilenas yra tinkamai pašalintas iš deparafinizuotų sluoksnių ir paminėtų efektų nesukelia.

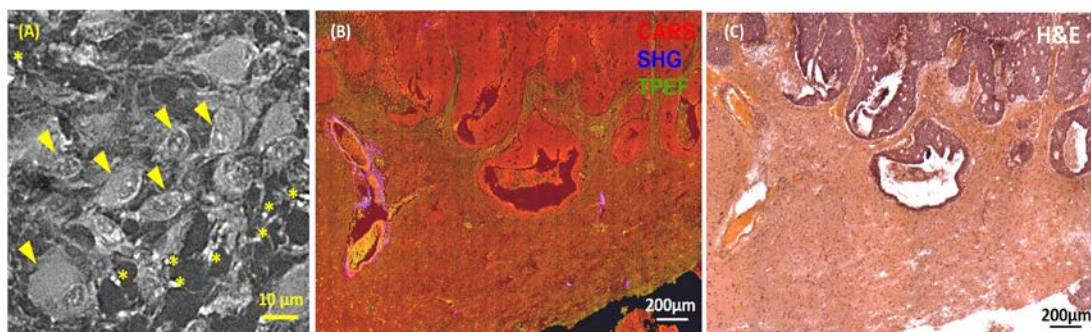
Daugiakanalio *CARS* atvaizdo palyginimas su Ramano klasterių spektriniu žemėlapiu bei centriniais klasterių Ramano spektrais, gautais taikant klasterinę spektrinių duomenų analizę, leido detaliau paanalizuoti deparafinizuotų smegenų audinių pjūvių morfochemiją bei ją atitinkantį atvaizdavimą daugiakanaliame *CARS* atvaizde. Buvo

parodyta, kad skirtingas audinio struktūras deparafinizuotose sluoksniuose galima išskirti dėl kintančios baltymų koncentracijos. Be to, intensyvių CARS signalą generuojančios struktūros buvo teisingai suklasifikuotos ir atitinkamai atvaizdotos Ramano klasterių žemėlapyje kaip parafino liekanos (3 pav.). Tokia sąlyginai didelį audinio plotą apimančios srities analizė parodė, kad parafino liekanos atvaizduose nėra dominuojančios ir, net egzistuojant minimiems parafino artefaktams, audinio morfologines struktūras galima analizuoti.



3 pav. Deparafinizuoto pelės smegenų sluoksnio CARS/TPEF mikroskopija ir Ramano spektrinė mikroskopija. Dvikanalis CARS (raudona) ir TPEF (žalia) atvaizdas (A) bei Ramano spektrinis žemėlapis, sudarytas pagal klasterinės analizės rezultatus (B) ir jo spalvinį užkodavimą atitinkantys centriniai grupių spektrai (C). CARS/TPEF atvaizdas ir Ramano spektriniai duomenys buvo gauti iš to pačio deparafinizuoto sluoksnio. Tiesioginiam spektrinių juostų palyginimui (C) paveiksle taip pat pateiktas parafino spektras (ruda spalva).

Antroje šių tyrimų dalyje buvo koncentruojamasi ties deparafinizuotais žmogaus smegenų audinio sluoksniais, siekiant įvertinti jų pritaikomumą daugiakanaliam *CARS* vaizdinimui. *CARS* atvaizdų informatyvumas buvo įvertintas, analizuojant įvairių žmogaus smegenų navikų biopsijas. Kaip ir pelių smegenų sluoksnių atveju, visų tirtųjų bandinių *CARS* atvaizduose buvo nustatyti parafino liekanų salygojami artefaktai. Tačiau audinio architekūra buvo pakankamai išskirta dėl kintančios baltymų koncentracijos. Pavyzdžiui, *CARS* atvaizduose buvo atpažįstami patologiniam bandinio atvaizdo įvertinimui itin reikšmingi ląstelių branduoliai ir net jų branduolėliai [4 pav. (A)]. Be to, *SHG* ir *TPEF* signalai suteikė papildomos morfocheminės informacijos apie navikuose esančias audinio struktūras. Pavyzdžiui, vienu metu užregistruoti *CARS*, *TPEF* ir *SHG* signalai atvaizdavo navike esančios didelės kraujagyslės struktūrą, *TPEF* signalas buvo reikšmingas tikslesniam ląstelių atvaizdavimui, o *SHG* signalas buvo svarbus tiek kraujagyslių, tiek *corpora amylacea* struktūros identifikacijai.



4 pav. Deparafinizuotų žmogaus smegenų su navikais daugiakanalė *CARS* mikroskopija. (A): Deparafinizuoto sluoksnio su glioblastomos naviku *CARS* atvaizdas (pilkumo tonai). Žvaigždutės (*) žymi keletą tipinių parafino liekanų artefaktų (pavienių ląstelių formoje). Rodyklės rodo ląstelių kūnus su branduoliais ir branduolėliais. (B): Krūties metastazinio naviko smegenyse daugiakanalis atvaizdas (*CARS* – raudona, *SHG* – mėlyna, *TPEF* – žalia). Netiesinių optinių signalų kombinacija įgalina atskirti naviką (viršutinė paveikslėlio dalis) nuo normalaus audinio (apatinė paveikslėlio dalis). (C): palyginimui pateiktas H&E dažymo šviesos mikroskopijos būdu užregistruotas atvaizdas.

Daugiakanalės *CARS* mikroskopijos taikymas smegenų navikų tyrimuose turi didelį potencialą, o *FFPP* bandiniai galėtų būti itin svarbūs didelio masto retrospektyviniuose smegenų navikų tyrimuose. Todėl, galiausiai daugiakanalės *CARS* mikroskopijos deparafinizuotų sluoksnių atvaizdai buvo įvertinti navikų ir jų ribų nustatymo galimybei. Buvo parodyta, jog daugiakanaliuose *CARS* atvaizduose naviko ir sveiki audiniai bei riba

tarp jų yra atskiriami. Be to, naviko ribų nustatymui itin reikšmingas buvo *TPEF* signalas [4 pav. (B) ir (C)]. Parafino liekanų kiekis bandiniuose nebuvo didelis ir nesudarė kliūčių daugiakanaliuose *CARS* atvaizduose atpažinti navikus bei jų ribas.

3.3 Išvados

1. Audinio lipidai yra pašalinami iš *FFPP* audinio jo deparafinizacijos metu. Todėl morfocheminis *CARS* atvaizdų kontrastas yra sąlygojamas skirtingos baltymų koncentracijos audinio struktūrose.
2. Lyginant su užšaldytais sluoksniais, deparafinizuotų smegenų audinio sluoksnių *TPEF* atvaizduose *TPEF* signalo intensyvumo vertės ir morfologinis kontrastas yra didesnis.
3. Taikant įprastą *FFPP* sluoksnių deparafinizacijos protokolą, parafinas iš sluoksnių nėra galutinai pašalinamas. Į parafino liekanų generuojamą *CARS* signalą turi būti atsižvelgiama, interpretuojant deparafinizuotų smegenų audinio sluoksnių *CARS* atvaizdų morfocheminę informaciją.
4. Daugiakanalė *CARS/TPEF/SHG* mikroskopija yra tinkamas metodas įvairių pelės ir žmogaus smegenų struktūrų vaizdinimui ir smegenų navikų bei jų ribų nustatymui tiriant deparafinizuotus bandinius.
5. Visgi, deparafinizuotuose smegenų audinio sluoksniuose lipidų kiekio pokyčių suteikiama morfocheminė informacija yra prarandama. Dėl to, *CARS* morfocheminis kontrastas, paremtas tik baltymų koncentracijos kitimu, gali itin apriboti CNS audinių patologijų, kurioms lipidų pokyčiai yra itin reikšmingi, tyrimus. Todėl įprastinės *CARS* mikroskopijos, paremtos molekulinį virpesių ties 2850 cm^{-1} žadinimu, eksperimentams saugomi užšaldyti ar švieži bandiniai yra tinkamiausi.

4 *CARS* mikroskopijos taikymas tiriant smegenų navikus

Smegenų navikai yra rimta ir pavojinga gyvybei nervinio audinio patologija: jie yra itin linkę įsiskverbti į sveiką audinį, o jų rezekcija yra pavojinga ar negalima dėl pavojaus pažeisti reikšmingus smegenų centrus [23]. Siekiant padidinti teigiamų smegenų navikų gydymo rezultatų tikymybę, itin svarbūs yra du pagrindiniai aspektai. Pirmiausia, planuojant individualizuotas gydymo strategijas, yra svarbu tiksliai nustatyti naviko tipą ir piktybiškumo laipsnį. Šiuo metu „auksinis“ navikų diagnostikos histopatologiniuose tyrimuose standartas yra audinio biopsijos paėmimas chirurginiu būdu ir jo morfologijos įvertinimas [24]. Deja, šis būdas yra nepritaikomas *in vivo* ir nesuteikia galimybės tiksliai įvertinti navikų tais atvejais, kai biopsijos paėmimas yra neįmanomas [25]. Antra, pagrindinis sėkmingo smegenų naviko pašalinimo tikslas yra visiškas vėžinių ląstelių pašalinimas, tuo pačiu kiek įmanoma išsaugant funkcinį sveiką smegenų audinį. Naviko ribų nustatymas yra sudėtingas, kadangi vėžinės ląstelės yra likusios įsiskverbti į aplinkinį smegenų audinį, o navikų ribos yra neaiškios [26].

Dėl šių priežasčių yra svarbu plėtoti pažangius metodus, įgalinančius *in situ* smegenų navikų pataloginį įvertinimą ir operacijų metu įgalinančius navikų ribas nustatyti iki pavienių ląstelių. Kaip pastariesiems taikymams perspektyvus metodas, *CARS* mikroskopija buvo taikoma tirti pirminius ir antrinius smegenų navikus, išaugintus pelių smegenyse, bei žmogaus smegenų navikus, pašalintus chirurginių operacijų metu. *CARS* mikroskopijos sistema buvo suderinta žadinti $\nu_s(\text{CH}_2)$ virpesius ties 2850 cm^{-1} , nerviniame audinyje daugiausia sąlygojamus lipidų.

4.1 Eksperimentinė dalis

Smegenų navikų augimas pelių smegenyse buvo sukeltas atliekant stereotaktinę žmogaus vėžinių ląstelių implantaciją į smegenų audinį. Aštuoniems gyvūnams buvo implantuotos glioblastomos ląstelės, keturiems – melanomos ląstelės ir dar keturiems – krūties vėžio ląstelės. Kuomet augliai susiformavo, gyvūnams buvo atlika eutanazija, jų smegenys pašalintos, įterptos į audinių šaldymo terpę ir užšaldytos ant sauso ledo. 16 μm storio smegenų sluoksniai buvo perkelti ant stiklo optinių langelių *CARS*

mikroskopiniams tyrimams. Atlikus CARS vaizdinimo eksperimentus, sluoksniams buvo atliktas standartinis dažymas hematoksilinu ir eozinu (H&E). Paeiliui ar nepaeiliui einantiems sluoksniams buvo atliktas anti-Ki67 imunohistocheminis dažymas arba jie buvo perkelti ant CaF₂ optinių langelių Ramano spektrinės mikroskopijos tyrimams.

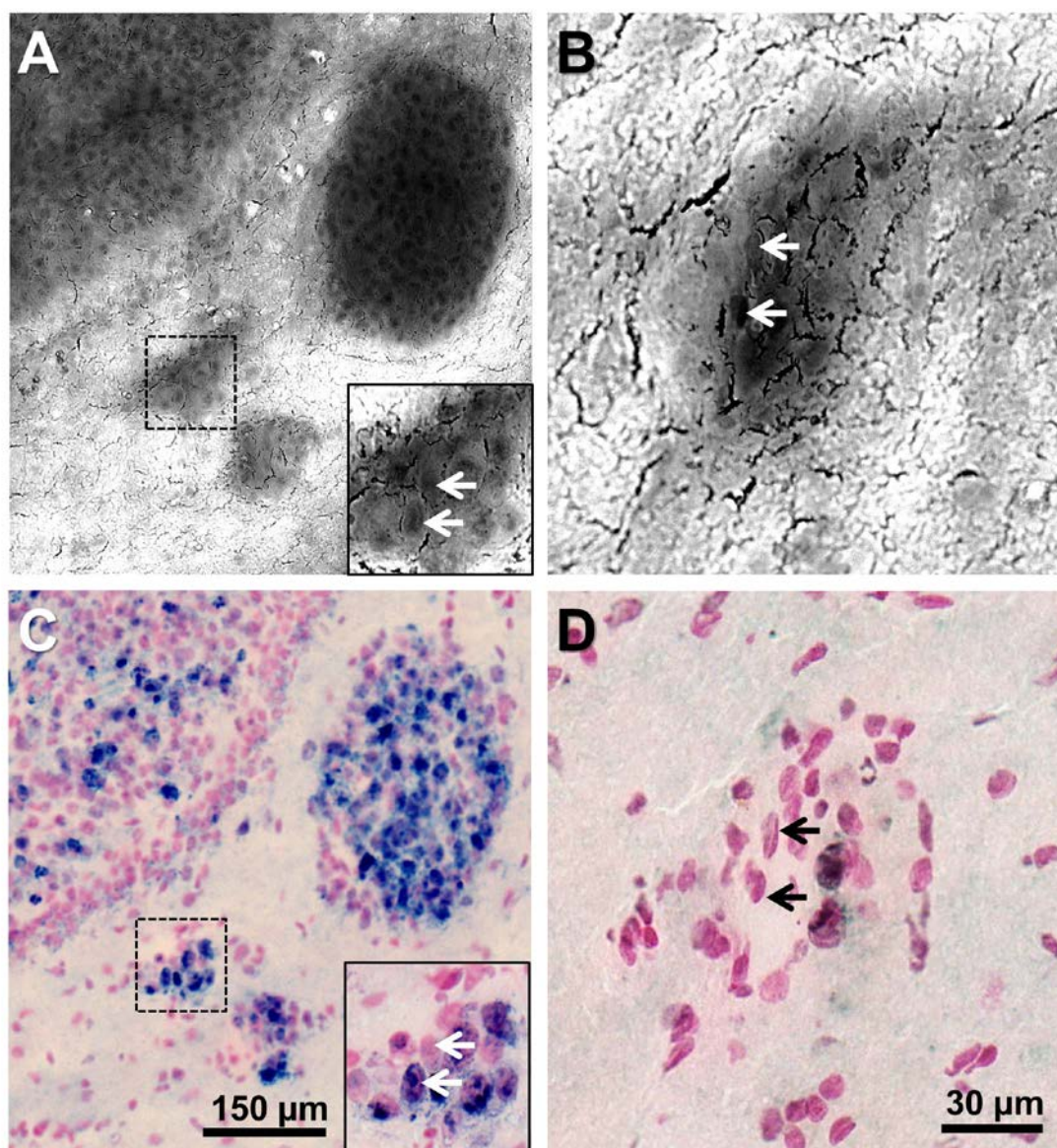
Ramano spektrai buvo registruojami 150–3250 cm⁻¹ Ramano poslinkio spektrinėje srityje su 4 cm⁻¹ spektrine skyra. Pasirinkus nuo 50 iki 70 vienoje tiesėje išdėstytų bandinio žadinimo taškų, kiekviename taške buvo registruojamas Ramano sklaidos spektras. Žadinamų taškų padėtys parinktos taip, kad linijinis spektrų masyvas apimtų spektrinės informacijos registravimą iš naviko bei sveiko audinio sričių. Naudojant žingsninį staliuką, viena kryptimi bandinys buvo perkeliamas kas 17 μm tarp taškų. Kiekviename žadinimo taške užregistruojami ir suvidurkinami du spontaninės Ramano sklaidos signalai. Vienas signalas žadinamas su 2 s spinduliuotės ekspozicijos trukme.

Vaizdinimas daugiakanaliu CARS mikroskopu buvo atliekamas kaip aprašyta [15]. Lazerių žadinimo spinduliuotė CARS vaizdinimo eksperimentuose buvo sufokusuota su C-Apochromat 32×/0,85 NA objektyvu.

4.2 Rezultatai

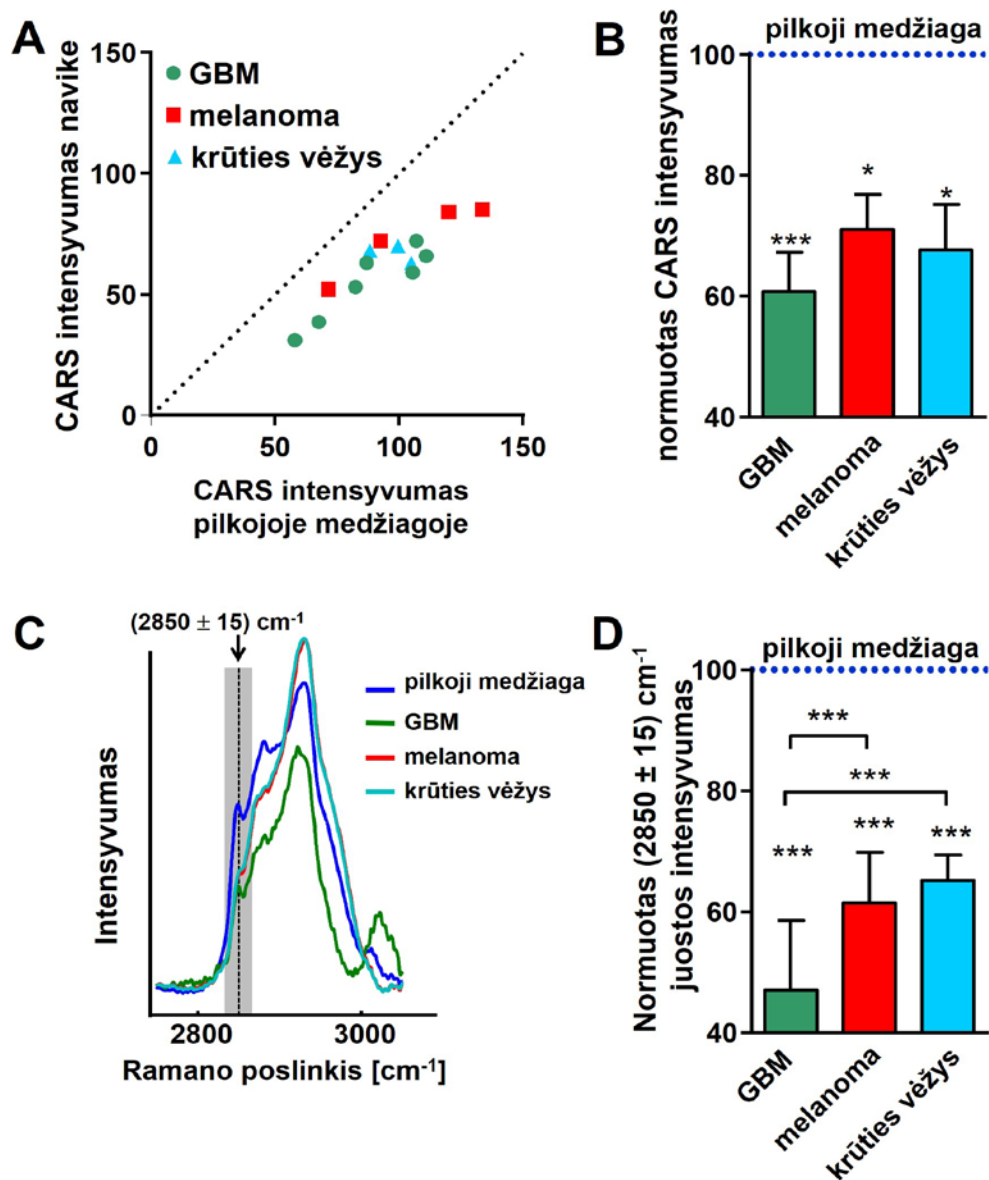
Šiame darbe buvo ištirtos 16 pelių smegenys su jose užaugintais pirminiais ir metastazių smegenų navikais. Tyrimai parodė, kad CARS mikroskopijos atvaizduose tiek pirminiai navikai, tiek metastazės pasižymi mažesniu CARS signalo intensyvumu nei juos supantis normalus smegenų audinys. Auglių ribos buvo tiksliai nustatytos dėl lipidų koncentracijos kitimo sąlygoto CARS atvaizdų cheminio kontrasto. Be to, CARS atvaizdai įgalino atskirti glioblastomos (*glioblastoma multiforme* – *GBM*) auglius ir metastazes nuo normalių smegenų struktūrų, natūraliai pasižyminčių dideliu ląstelių tankiu. *GBM* auglių CARS atvaizdai leido išskirti vėžinių ląstelių infiltracijos į sveiką audinį sritis bei mažas vėžinių ląstelių saleles iki pavienių ląstelių (5 pav.).

CARS signalo intensyvumo sumažėjimas navikuose buvo kiekybiškai įvertintas, naudojant rodiklį $I_{\text{navikas}}/I_{\text{pilkoji medžiaga}}$, kur I_{navikas} ir $I_{\text{pilkoji medžiaga}}$ yra vidutinis CARS atvaizdo pikselių intensyvumas atitinkamai navike ir normalioje pilkojoje medžiagoje. Nustatyta, jog CARS signalo intensyvumas, lyginant su normalia pilkąja medžiaga (100%), atitiko 61% *GBM*, 71% melanomos metastazių ir 68% krūties vėžio metastazių atvejais



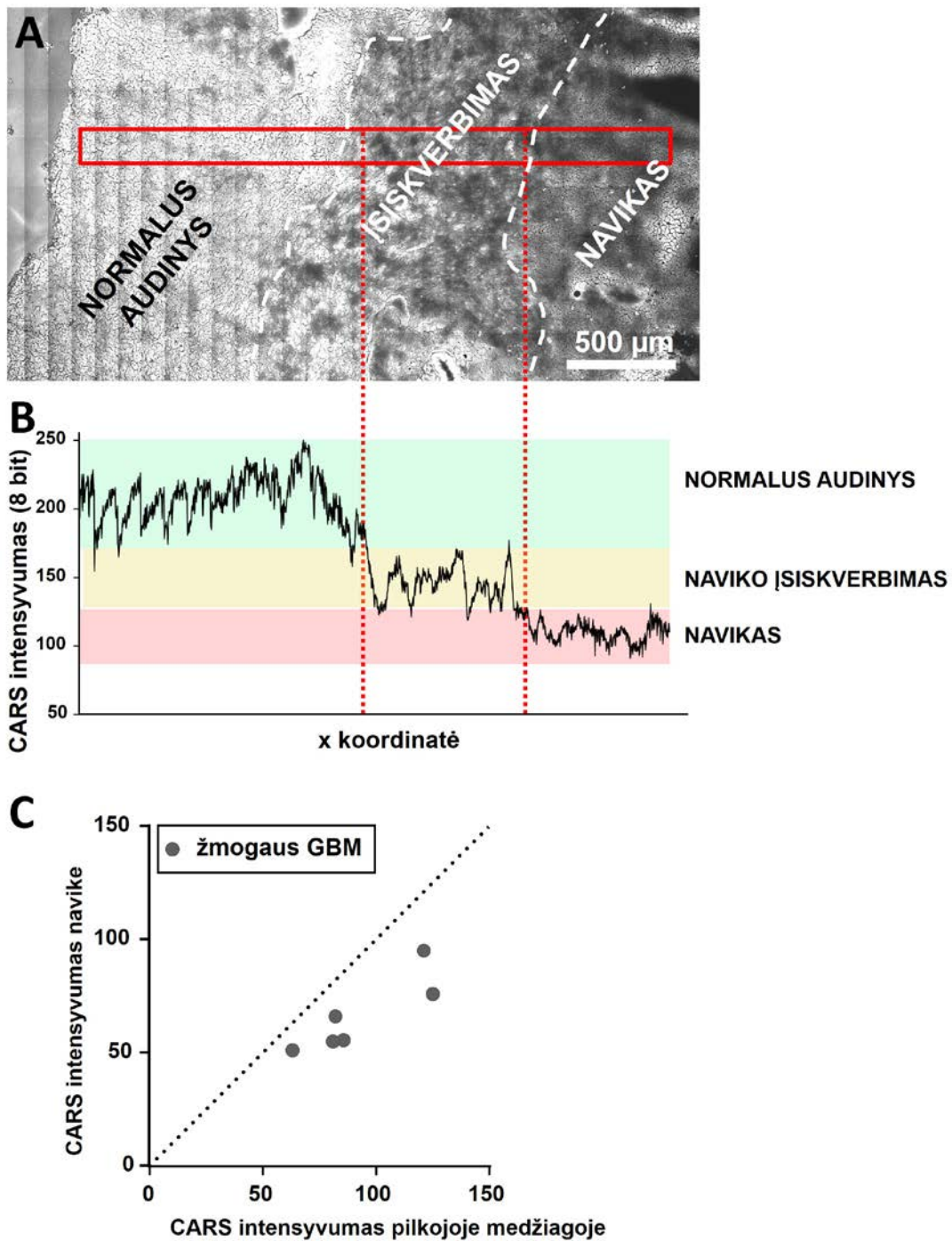
5 pav. CARS vaizdinimas besiskverbiančio naviko ribų nustatymui. (A): Žmogaus glioblastomos pelės smegenyse CARS atvaizdas. Brūkšninė linija apribota sritis parodyta padidintame atvaizde. (B): Mažos į sveiką audinį išplitusių glioblastomos ląstelių sąelės CARS atvaizdas. Pavieniai ląstelių branduoliai (A) ir (B) yra išskiriami kaip tamsiausios struktūros, citoplazminis ir tarpląstelinis užpildas yra tamsesnis nei aplinkinė pilkoji medžiaga. (C) ir (D): To pačio sluoksnio Anti-Ki67 imunohistocheminio dažymo šviesos mikroskopijos atvaizdai atitinkantys (A) ir (B). Rodyklėmis pažymėti keli pavienių ląstelių branduoliai.

(6 pav.). Ramano spektroskopija buvo pritaikyta įvertinti lipidų koncentracijos pokyčiams, atitinkantiems CARS signalo intensyvumų skirtumus. Buvo nagrinėjami Ramano spektrinės juostos ties 2850 cm^{-1} intensyvumų skirtimai navikuose ir normalioje pilkojoje medžiagoje. Nustatyta, jog, lyginant su abiejų tipų metastazėmis, šios Ramano spektrinės juostos intensyvumas glioblastomoje yra reikšmingai mažesnis ($P < 0.001$). Be to, lyginant su normalia pilkąja medžiaga (100 %), jis atitiko 47 % GBM, 61 % melanomos metastazių ir 65 % krūties vėžio metastazių atvejais. Tiesioginis Ramano spektrinės juostos ties 2850 cm^{-1} ir CARS signalo intensyvumų palyginimas nėra galimas [14], tačiau abiem metodais gautieji rezultatai vienas kitam nepieštaravo.



6 pav. CARS signalo intensyvumo ir atitinkamos Ramano spektrinės juostos pokyčių kiekybinis įvertinimas. (A): CARS signalo intensyvumo normalioje pilkojoje medžiagoje palyginimo su intensyvumu vėžiniame audinyje kiekvieno žmogaus naviko pelės modelyje atveju taškinė diagrama. (B): CARS signalo intensyvumai navikuose normuoti į atitinkamus intensyvumus pilkojoje medžiagoje. (C): Vidutiniai normalios pilkosios medžiagos, glioblastomos, melanomos ir krūties vėžio metastazių Ramano spektrai. (D): $\nu_s(\text{CH}_2)$ virpesius atitinkančios Ramano spektrinės juostos integriniai intensyvumai [$(2850 \pm 15) \text{ cm}^{-1}$] navikuose normuoti į atitinkamus intensyvumus pilkojoje medžiagoje. (B) ir (D) paveikslėliuose paklaidos brūkšniai rodo vidurkj ± standartinį nuokrypį; glioblastoma: $n = 8$; melanomos metastazės: $n = 4$; krūties vėžio metastazės: $n = 4$; * statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su pilkaja medžiaga: $P < 0,05$; statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su pilkaja medžiaga ar kaip parodyta: $P < 0,001$.

Šiame darbe buvo pirmą kartą detalai nagrinėjamos *CARS* signalo intensyvumo sumažėjimo navikuose priežastys, jas siejant su audinio ir ląstelių struktūromis, kuriuose lipidų kiekis natūraliai nėra didelis. Pirmiausia buvo suskaičiuoti vėžinių ląstelių branduolių užimami paviršiaus plotai ir palyginti su ląstelių branduolių užimamais plotais normaliame pilkajame audinyje: ląstelių branduolių užimami paviršiaus plotai navikuose buvo reikšmingai didesni nei normaliame pilkosios medžiagos audinyje. Tačiau, buvo nustatyta, jog ląstelių branduolių užimami paviršiaus plotai navikuose ir *CARS* signalo intensyvumo sumažėjimas tiesiogiai nekoreliavo. Kiekvienam augliui taip pat buvo nustatytas ląstelių proliferacijos rodiklis bei įvertinti mikrokraujagyslių tankis ir morfologija, tačiau visi šie parametrai, kaip pavieniai, taip pat nekoreliavo su *CARS* signalo intensyvumų sumažėjimu. Buvo prieita prie išvados, kad *CARS* signalo intensyvumo sumažėjimas nėra sąlygojamas vien tam tikrų pavienių mažai lipidų turinčių audinio struktūrų: mažesnė lipidų koncentracija tikriausiai yra bendresnė vėžinio audinio charakteristika.



7 pav. CARS signalo intensyvumo pokyčių žmogaus glioblastomoje kiekybinis įvertinimas. (A): Žmogaus glioblastomos bandinio, pašalinto įprastinės operacijos metu, užšaldyto pjūvio CARS atvaizdas. Taškinėmis linijomis pažymėtos ribos tarp vientiso naviko, vėžinių ląstelių įsiskverbimo srities ir normalaus audinio. (B): CARS signalo intensyvumo vertės išilgai srities, pažymėtos raudonai (A) paveiksle. Normalaus audinio, įsiskverbimo srities ir naviko intensyvumų ribos, atitinkamai pažymėtos žaliai, geltonai ir raudonai. (C): Taškinė diagrama, kurioje kiekvienam bandiniui lyginami CARS signalo intensyvumai iš žmogaus glioblastomos ir normalios pilkosios medžiagos.

Šioje darbo dalyje *CARS* mikroskopinis vaizdinimas taip pat buvo pritaikytas šešioms žmogaus glioblastomos navikams, pašalintiems įprastinių chirurginių operacijų metu. Buvo vaizdinami šių biopsijų sluoksniai. Žmogaus glioblastomos navikuose *CARS* intensyvumai taip pat buvo mažesni nei aplinkiniame sveikame smegenų audinyje (7 pav.). *CARS* morfocheminis kontrastas buvo pakankamas navikų riboms ir vėžinių ląstelių infiltracijos sritims nustatyti. Navikų srityje vidutinis *CARS* signalo intensyvumas buvo $72.2 \pm 8.8 \%$ ($n=6$, $P<0.005$), lyginant su sveiku audiniu (100 %).

4.3 Išvados

1. Nepriklausomai nuo smegenų naviko tipo ir charakteristikų, *CARS* atvaizdų morfocheminis kontrastas įgalina atskirti smegenų navikus nuo normalaus smegenų audinio.
2. Mažesnės *CARS* intensyvumo vertės nei normaliame smegenų audinyje įgalina nustatyti navikų ribas bei infiltracijos sritis iki pavienių ląstelių. *CARS* intensyvumo sumažėjimas yra didesnis glioblastomose nei smegenų metastazėse. Ramano spektrometrija patvirtino, jog *CARS* intensyvumo sumažėjimas yra susijęs su mažesne lipidų koncentracija auglyje.
3. Koreliacinis ryšys tarp naviko sukeltų pavienių ląstelių citologinių pokyčių ir *CARS* signalo intensyvumo sumažėjimo nebuvo nustatytas.

5 Virpesinės mikrospektrometrijos bei daugiakanalės *CARS* mikroskopijos taikymas tiriant stuburo smegenų audinio pažeidimų gydymo poveikį

Stuburo smegenų audinio pažeidimas sukelia visą eilę biomolekulinių pokyčių. Po pirminių ūminių pasekmių, tokių kaip kraujagyslių pažeidimas, ląstelių nekrozė ir kraujavimas [27], seka lėtinė pažeidimo fazė, kurios metu pasireiškia uždegiminiai procesai, edema ir išemija, lemiantys toliau vykstančius nervinio audinio pažeidimo ir fibrotinio randėjimo procesus [28]. Bendra žinduolių stuburo smegenų pažeidimo sąlygotų biocheminių pokyčių pasekmė yra sustabdyta savaiminė nervinio audinio regeneracija. Viena iš potencialių gydymo ir nervinio audinio regeneracijos strategijų yra implantai, kurių esmė – sudaryti neuronų augimui pralaidžią aplinką. Itin svarbūs yra biopolimeriniai implantai, iš kurių vienas yra alginato hidrogelis [29]. Alginato hidrogelis yra sudarytas iš tiesinių polisacharidų, tinkliškai susietų per multivalentinius jonus [30]. Kitų autorių tyrimuose jau buvo parodyta, jog alginato hidrogeliai sudaro neuronų augimui pralaidžią terpę *in vitro* [31]. Taip pat buvo parodyta, kad nefunkcionalizuotas minkštas alginato hidrogelis padeda neuritų augimui *in vitro* ir apsaugo neuronus nuo oksidacinio streso [32].

Siekiant kokybiškai ir kiekybiškai įvertinti stuburo smegenų pažeidimų gydymo strategijas, svarbi reikšmė tenka stuburo smegenų pažeidimų vaizdinimui, įgalinančiam tirti biocheminius audinio pokyčius, bei, implantų įterpimo atveju, stebėti implantus. Virpesinės spektrometrijos metodai, įskaitant IR ir Ramano spektrinę mikroskopijas, bei daugiakanalė daugiafotonė *CARS* mikroskopija įgalina audinio vaizdinimą be jokio papildomo molekulių dažymo žymekliais. Galli ir kt. jau paskelbė rezultatus studijos, kurioje stuburo smegenų pažeidimų tyrimams buvo taikomi virpesinės spektrinės mikroskopijos ir daugiakanalės *CARS* mikroskopijos metodai [15]. Disertacijos autorės darbe pastarieji vaizdinimo metodai buvo pirmą kartą taikomi alginato hidrogelio implantų įtaką stuburo smegenų pažeidimų regeneraciniams procesams stebėti ir jiems kokybiškai ir kiekybiškai įvertinti. Be to, stuburo smegenų pažeidimose pirmą kartą buvo išsamiai analizuojami uždegiminių procesų sukelti lipidų cheminiai pokyčiai.

5.1 Eksperimentinė dalis

Alginato hidrogeliui ruošti buvo panaudotas „Pronova“ natrio alginatas (Novamatrix, Sandvika, Norway), turintis 50 % manuronato. Paruoštas 4 % alginato tirpalas buvo išfiltruotas ir inkubuojamas 20 min. kambario temperatūroje. Ruošiant alginato hidrogelį, pastarasis tirpalas buvo padengtas CaCl_2 ir NaCl bei 12 valandų paliktas kambario temperatūroje. Galiausiai, tirpalas buvo pašalintas, o susiformavęs hidrogelis supjaustytas implantavimui.

Šioje darbo dalyje iš viso buvo tiriamos 28 suaugusios Wistar žiurkės, kurių stuburo smegenims buvo atlikta 2 mm hemisekcija. 14 žiurkių buvo implantuotas hidrogelio implantas (eksperimentinė grupė), o likusios 14 sudarė kontrolinę grupę. Tiek kontrolinė, tiek ir eksperimentinė grupės buvo padalintos dar kartą: iš kiekvienos grupės septynioms žiurkėms buvo leista gyventi 1 mėnesį, likusioms septynioms – 6 mėnesius. Po atitinkamo laiko tarpo žiurkės buvo užkonservuotos perfuzijos būdu, jų stuburo smegenys išimtos, dehidratuotos ir užkonservuotos šaldymu. 16 μm storio sluoksniai buvo paruošti ant CaF_2 ar stiklo optinių langelių. Paeiliui einantiems sluoksniams buvo atliktas H&E histocheminis dažymas.

Bandiniai buvo tiriami FT-IR ir Ramano mikrospektrometrijų bei daugiakanalės CARS mikroskopijos metodais. FT-IR spektrinių žemėlapių duomenys buvo surenkami, skenuojant bandinio paviršiaus plotą ir surenkant pro bandinį praėjusią IR spinduliuotę 68×68 taškų daugiakanaliu jutikliu. Kiekvienam pikseliui buvo užregistruoti ir suvidurkinti 8 spektrai su 6 cm^{-1} spektrine skyra 900–3500 cm^{-1} spektrinėje srityje. IR spektrai buvo matematiškai apdoroti, o duomenų analizei buvo naudojami Matlab programinės įrangos paketai (version 7, Math Works Inc., Natick, MA, USA).

Ramano spektriniai žemėlapiai buvo registruojami kas 23 μm tarp taškų, bandinį perkeliant žingsniniu staliuku. Kiekviename taške buvo registruojami ir suvidurkinami du 150–3250 cm^{-1} spektrinės srities bei 4 cm^{-1} spektrinės skyros Ramano sklaidos spektrai, kiekvieną jų registruojant su 750 ms žadinimo trukme. Spektrų apdorojimas buvo

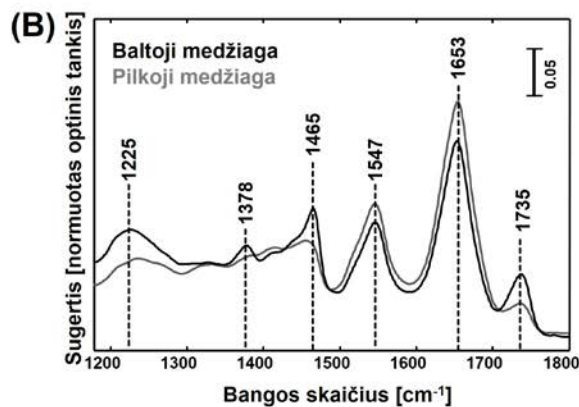
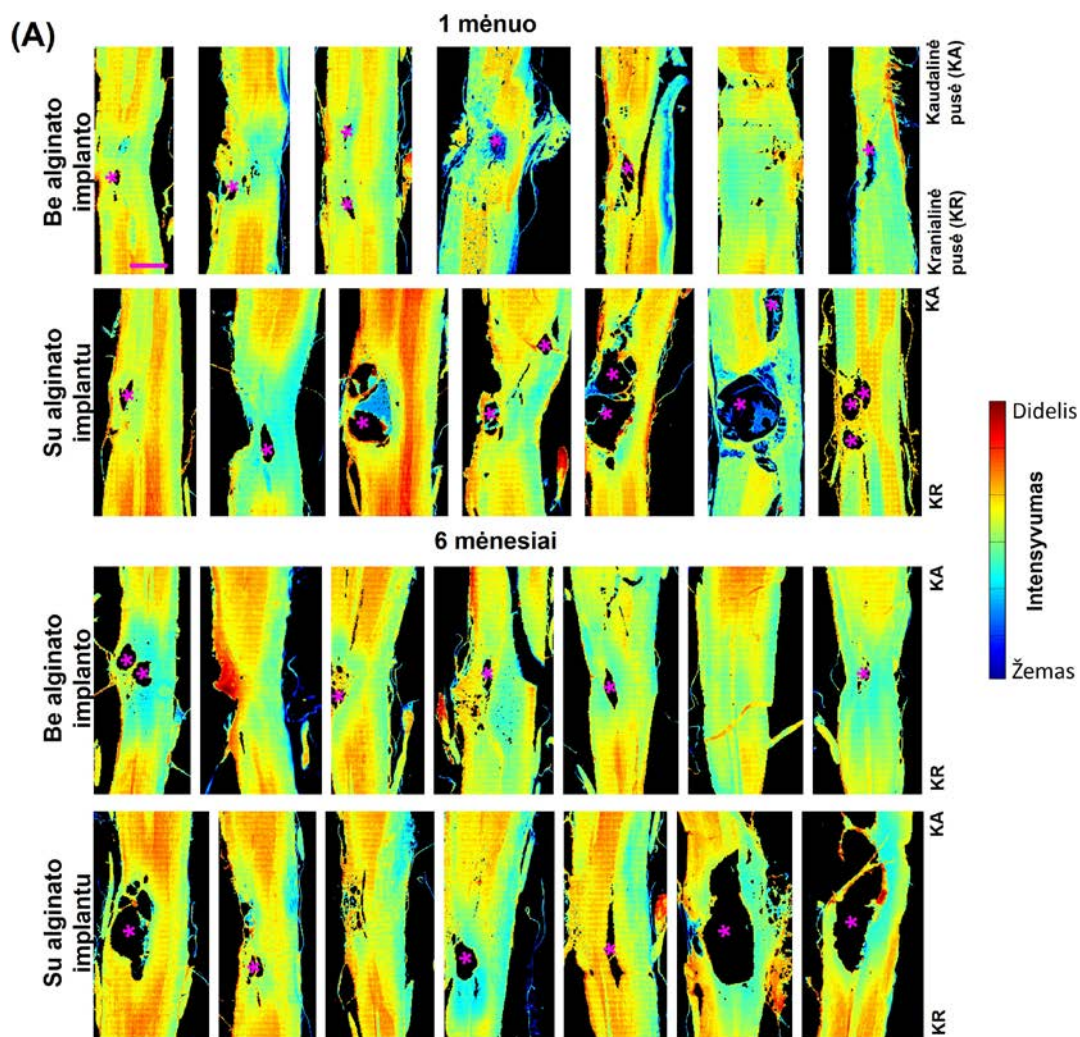
atliktas su MATLAB programinės įrangos paketais (version 7, Math Works Inc., Natick, MA, USA).

Vaizdinimas daugiakanaliu *CARS* mikroskopu buvo atliekamas kaip aprašyta [15]. *CARS*, *SGH* ir *TPEF* signalai buvo registruojami 20×/1.0 vandens imersiniu objektyvu.

5.2 Rezultatai

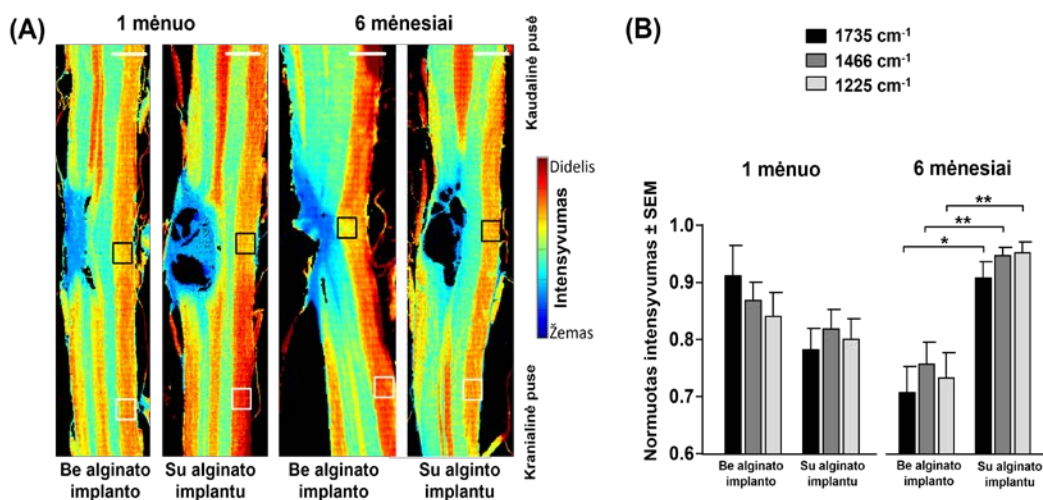
Šoje darbo dalyje pirmiausia yra pristatomi IR spektrinės mikroskopijos metodu gautieji rezultatai. Pagal IR spektrinius žemėlapius aptariami pažeistų nugaros smegenų žiurkių modelyje bendroji morfologinė struktūra (pilkosios ir baltosios medžiagos pasiskirstymas, pažaidos sritis) bei jos biocheminei struktūrai charakteringi spektriniai žymenys (8 pav.).

Atlikus specifinių spektrinių juostų integrinio intensyvumo skaičiavimus, kokybiškai (sukuriant IR intensyvumo atvaizdus) ir kiekybiškai (naudojantis statistiniais skaičiavimais) įvertintas ir palygintas lipidų bei kolageno pasiskirstymas eksperimentinių bei kontrolinių žiurkių stuburo smegenų pažaidų bandiniuose (1 mėn. ir 6 mėn. po stuburo smegenų hemisekcijos). Tokiu būdu buvo atitinkamai įvertinta stuburo smegenų pažaidų sukeltas mielino dangalų irimas – demielinizacija ir rando susidarymas.



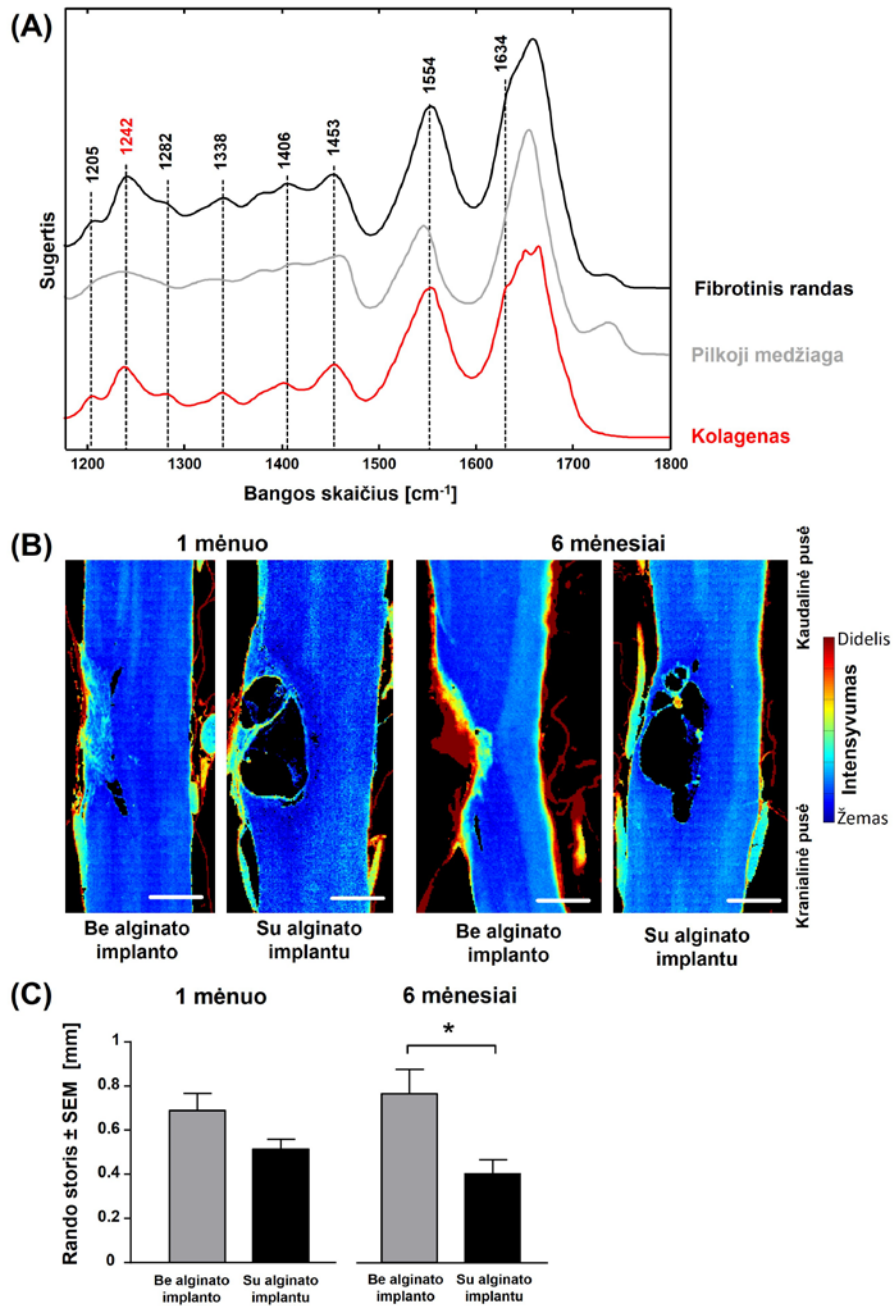
8 pav. FT-IR mikrospektroskopijos taikymas stuburo smegenų pažeidimų žiurkės modelyje su alginato hidrogelio implantu ir be jo, praėjus vienam ir šešiams mėnesiams po pažeidimo, tyrimui. (A): Visų 28 stuburo smegenų su hemisekcijos pažeidimais išilginių sluoksnių IR spektriniai atvaizdai, sudaryti suskaičiavus amido I spektrinės juostos ties 1653 cm^{-1} integrinį intensyvumą ir rodantys baltymų pasiskirstymą nugaros smegenyse. Žvaigždutės (*) žymi dideles cistas. Mastelio juosta: 1 mm. (B): Pavyzdiniai baltosios ir pilkosios medžiagos infraraudonosios sugerties spektrai.

IR spektriniai žemėlapiai, demonstruojantys lipidų pasiskirstymą bandiniuose, buvo gauti skaičiuojant spektrinės juostos ties 1735 cm^{-1} integrinį intensyvumą (9 pav.). Šie spektriniai žemėlapiai leido tinkamai atvaizduoti ir atskirti lipidų gausios baltosios medžiagos ruožus nuo pilkosios medžiagos ruožų su maža lipidų koncentracija. Visų bandinių baltosios medžiagos ruožo dalyse, esančiose tiesiai prieš pažaidą, buvo rasta sritis su mažesne lipidų koncentracija (lyginant su labiau nuo pažaidos atitolusiomis nuo šio ruožo sritimis). Minėtasis lipidų koncentracijos sumažėjimas demonstruoja mielinio dangalų demielinizaciją. Kiekybinis demielinizacijos įvertinimas tarp skirtingų bandinių grupių buvo paremtas lipidams būdingų spektrinių juostų ties 1735 cm^{-1} , 1466 cm^{-1} ir 1225 cm^{-1} integrinių intensyvumų skaičiavimu ir statistiniu palyginimu. Buvo nustatyta, jog demielinizacijos srityje lipidus atitinkančių spektrinių juostų intensyvumas sumažėja iki 70 %–90 %, palyginus su sveiku baltosios medžiagos audiniu (100 %). Nors vieno mėnesio pažaidos bandiniuose statistiškai reikšmingi integrinių intensyvumų skirtumai tarp kontrolinės ir eksperimentinės grupių nebuvo nustatyti, šešių mėnesių pažaidos eksperimentinės grupės bandiniuose nustatytas reikšmingas lipidų koncentracijos padidėjimas ($p=0.019$, $p=0.0095$, $p=0.0095$, atitinkamai spektrinėms juostoms ties 1735 cm^{-1} , 1466 cm^{-1} , 1225 cm^{-1}).

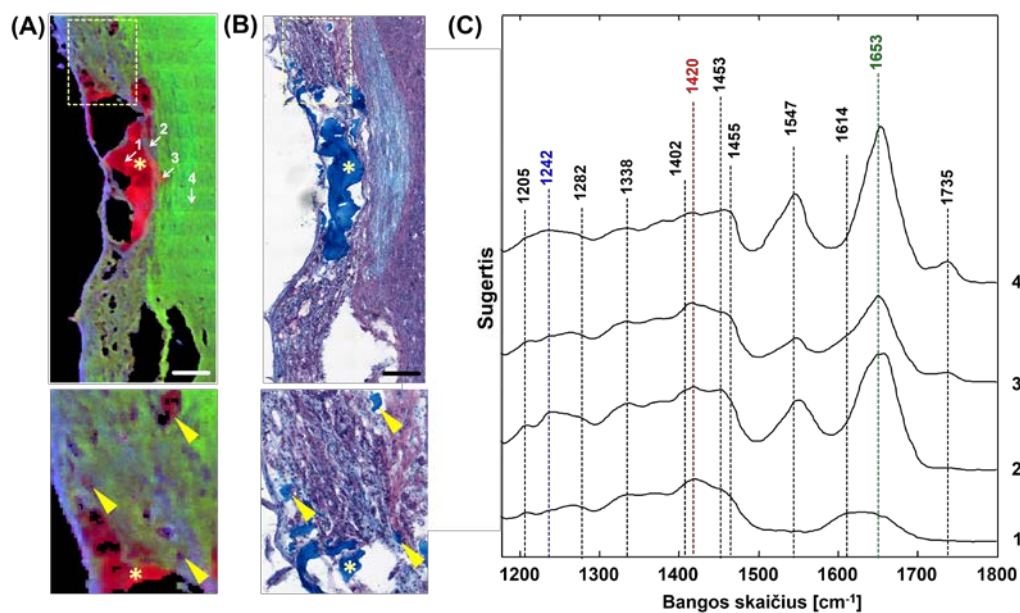


9 pav. Priešais pažaidą esančio baltosios medžiagos ruožo analizė. (A): IR spektriniai atvaizdai, sudaryti suskaičiuvus spektrinės juostos ties 1735 cm^{-1} [$\nu_s(\text{C}=\text{O})$] integrinį intensyvumą ir rodantys lipidų pasiskirstymą nugaros smegenyse. Pateikti vieno ir šešių mėnesių pažaidų be alginato implanto ir su juo pavyzdžiai. Mastelio juosta: 1 mm. (B): Spektrinių juostų ties 1735 cm^{-1} , 1466 cm^{-1} ($\delta[\text{CH}_2]$, irgi atitinkanti lipidus) ir 1225 cm^{-1} (atitinkanti fosfolipidus) intensyvumai priešais pažaidą esančios baltosios medžiagos ruožo srityje ((A) apribota juodu kvadratu). Kiekviename bandinyje pastarieji intensyvumai buvo normuoti į atitinkamų spektrinių juostų intensyvumus išsaugotos baltosios medžiagos srityje, esančioje tame pačiame baltosios medžiagos ruože ((A) apribota baltais kvadratais). Kiekvienai grupei $n=5-6$. „two – tailed“ testas, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Kadangi stuburo smegenų pažaidos sukkelto rando susiformavimas yra reikšmingas veiksnys, ribojantis sėkmingą nervinio audinio regeneraciją, taip pat buvo įvertinta, ar alginato hidrogelis daro įtaką rando formavimuisi. Pasitelkiant kolageniui tipinės IR spektrinės juostos ties 1242 cm^{-1} integrinio intensyvumo žemėlapius, visuose bandiniuose buvo apskaičiuotas fibrotinio rando storis (10 pav.). Jis buvo reikšmingai mažesnis šešių mėnesių pažaidos eksperimentinėje grupėje ($p=0,0153$). Tai leido daryti išvadą, jog alginato hidrogelis turi teigiamą įtaką, slopinant rando formavimąsi lėtinėje stuburo smegenų pažaidos stadijoje.



10 pav. Fibrotinio rando analizė. (A): Pavyzdiniai po šešių mėnesių pažeistose nugaros smegenyse susidariusio fibrotinio rando, normalios pilkosios medžiagos ir gryno kolageno IR spektrai. (B): IR spektriniai atvaizdai, sudaryti suskaičiavus spektrinės juotos ties 1242 cm⁻¹ integrinį intensyvumą, rodantys kolageno pasiskirstymą nugaros smegenyse. Pateikti vieno ir šešių mėnesių pažaidų be ir su alginato implantu pavyzdžiai. Mastelio juosta: 0,5 mm. (C): Fibrotinio rando storis bandiniuose su alginato implantu ir be jo po vieno ir po šešių mėnesių po pažaidos, n=5 – 7, „two – tailed“ testas, *: p < 0,05.



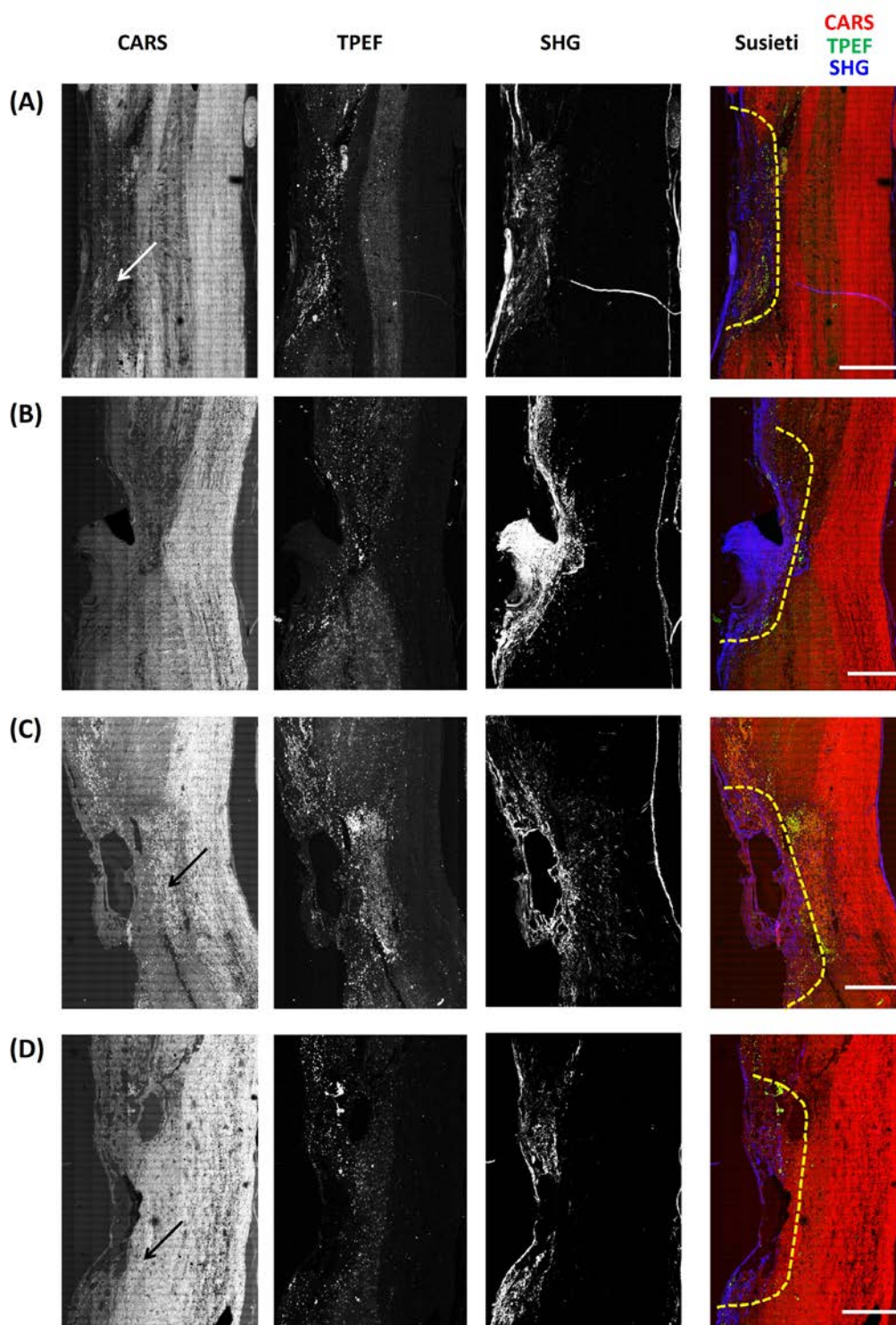
11 pav. Alginato hidrogelio pasiskirstymas nugaros smegenų pažeidime po šešių mėnesių. (A): IR RGB spektrinis atvaizdas, sudarytas sujungiant spektrinių juostų ties 1420 cm⁻¹ (atitinka alginato hidrogelį – raudona), 1653 cm⁻¹ (atitinka nervinį audinį – žalia) ir 1242 cm⁻¹ (atitinka kolageną – mėlyna) integrinio intensyvumo spektrinius žemėlapius. (B): Alciano mėlynos dažymo ant paeilui einančio audinio sluoksnio šviesos mikroskopijos atvaizdas. Mastelio juosta: 100 μm. Kvadratai (A) ir (B) paveikslėliuose žymi padidintų vaizdų sritis. Padidintuose vaizduose esančios rodyklės žymi nedideles alginato hidrogelio įsiterpimo į audinį sritis, kurių pozicijos spektriniame atvaizde ir dažymo atvaizde sutampa. Žvaigždutės (*) žymi alginato hidrogelio likučius didelėse cistose. (C): IR spektrai, demonstruojantys alginato hidrogelio sąveiką su audiniu. Spektro nr. atitinka numeruotas pozicijas (A) paveiksle.

Nustatyta, jog IR spektrinė mikroskopija yra parankus metodas stebėti alginato hidrogelio implantus. Siekiant geriausiai atvaizduoti alginato hidrogelio pasiskirstymą, stuburo smegenų pažeidime buvo sugeneruoti RGB spektriniai žemėlapiai, kuriuose spektrinės juostos ties 1420 cm⁻¹ integrinis intensyvumas atvaizdavo alginato hidrogelį, ties 1242 cm⁻¹ – kolageną ir ties 1650 cm⁻¹ – nervinį audinį (11 pav.). Alginato hidrogelis buvo rastas šešiuose iš septynių šešių mėnesių bandinių, kas atitinka jo lėtą iširimo tempą fiziologinėse terpėse. RGB spektriniai atvaizdai leido daryti prielaidą, jog hidrogelis maišosi su audiniu. Todėl, siekiant geriau suprasti audinio ir hidrogelio sąveiką, buvo analizuojami iš skirtingų bandinio sričių užregistruoti IR spektrai. Kolageno ir alginato spektrinių juostų persiklojimas parodė, jog kolagenas gali pereiti išilgai per hidrogelį. Buvo pastebėta, jog nervinis audinys taip pat galėtų augti per hidrogelį: amido

ir lipidų spektriniai komponentai buvo persikloję su alginato hidrogelio spektrinėmis juostomis ties 1420 cm^{-1} and 1643 cm^{-1} .

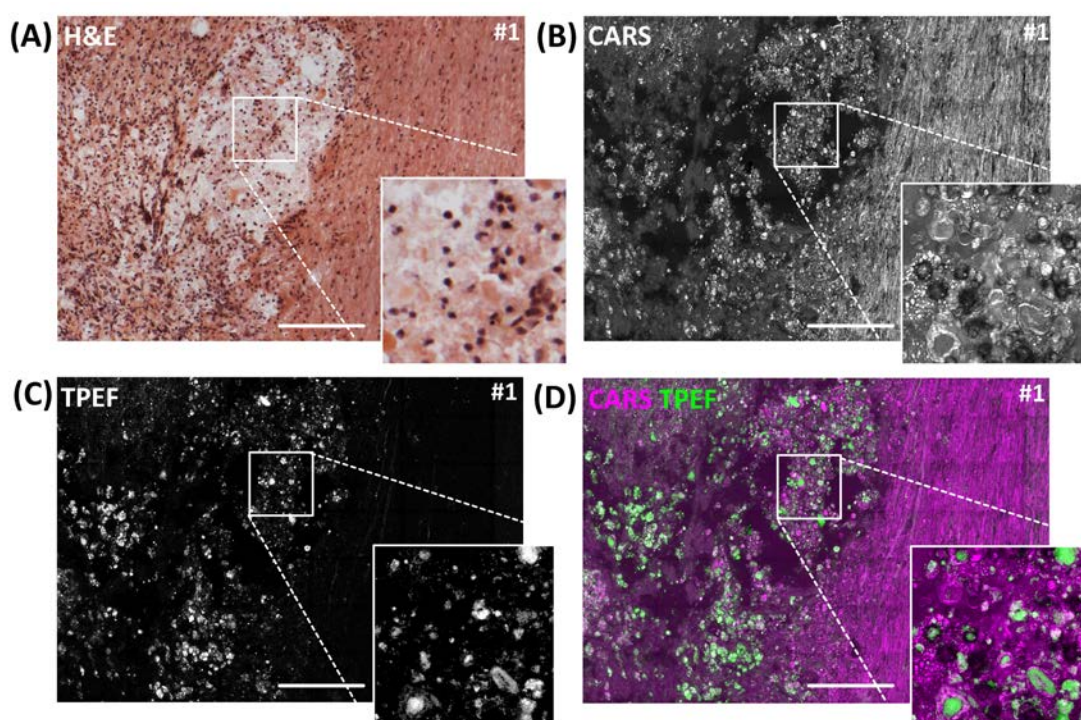
IR spektrinės mikroskopijos rezultatai buvo patvirtinti ir papildyti rezultatais, gautais Ramano spektrinės mikroskopijos būdu. Ramano spektrinių duomenų analizė buvo paremta klasterine spektrų klasifikacija. Visuose bandiniuose klasterinė analizė leido nustatyti ir lokalizuoti nervinio audinio, sudarančio stuburo smegenis, tipus. Be to, klasterinė analizė įgalino nustatyti demielinizacijos sritis, nusakomas mažesne lipidų koncentracija (dėl sąlyginai mažesnių cholesterolio spektrinės juostos ties 700 cm^{-1} ir CH deformacinių virpesių juostų ties 1300 ir 1440 cm^{-1} intensyvumų). Centrinis klasterinės analizės spektras, kuriame buvo audiniams charakteringos juostos ir alginato hidrogelio spektrinio signalo sąlygoti spektrinės juostos ties 1100 cm^{-1} intensyvumo bei formos pokyčiai, leido nustatyti, jog alginato hidrogelis yra ne tik pasiskirstęs pažaidos tuštumose, tačiau ir sąveikauja su audiniu.

Virpesinės spektrinės mikroskopijos eksperimentų trukmė buvo ilga (nuo kelių valandų FT-IR iki keliolikos valandų didesnių Ramano spektrinių žemėlapių duomenų surinkimui), o duomenų apdorojimas sąlyginai sudėtingas. Todėl stuburo smegenų bandiniams tirti buvo pritaikyta daugiakanalė *CARS* mikroskopija. Nors visuminė spektrinė informacija vienos-juostos *CARS* mikroskopijos būdu nėra surenkama, tačiau submikrometrinės skyros *CARS* atvaizdai, išskiriantys audinio degeneracijos ir regeneracijos įvertinimui svarbius audinio komponentus, buvo užregistruoti sąlyginai greitai (nuo kelių iki maksimaliai kelių dešimčių minučių). Kaip parodyta 12 paveiksle, daugiakanalio *CARS* atvaizde baltosios medžiagos ruožas, kuriame gausu lipidų, yra gerai išskiriamas. Taip pat matomas gausus lipidų regionas (pažymėta rodyklėmis), kurio kilmė yra plačiau aptariama tolesnėje darbo dalyje. Nepaisant to, kad plataus masto aksonų augimas per pažaidą nebuvo stebimas, pavieniai mielinu padengti aksonai buvo rasti keliuose bandiniuose. Pastarasis rezultatas pagrindžia idėją, jog alginato hidrogelis sudaro aksonų regeneracijai pralaidžią aplinką gyvūnų modeliuose. Makrofagai, kurie šalina pažeisto audinio likučius, buvo puikiai atvaizduojami *TPEF* signalo. Kolagenas dėl savo necentrosimetrinės struktūros generuoja *SHG* signalą. Pagal kolageno išplitimą buvo galima spręsti apie fibrotinio rando storį. Šie rezultatai idealiai sutapo su rezultatais, gautais virpesinės spektrinės mikroskopijos metodais.



12 pav. Stuburo smegenų pažeidimų daugiakanalis *CARS* vaizdinimas po vieno mėnesio be alginato implanto (A) ir su implantu (C) ir po šešių mėnesių be alginato implanto (B) ir su implantu (D). Daugiafotonės mikroskopijos atvaizdai paeiliui: *CARS*, *TPEF*, *SHG* intensyvumų atvaizdai (pilkumo tonai) ir visų šių signalų RGB atvaizdas (*CARS* – raudona, *TPEF* – žalia, *SHG* – mėlyna). Brūkšninė linija apriboja hemisekcijos centrą. Rodyklės žymi pažeidime ar priešais pažeidimą esančias lipidų gausias sritis. Mastelio juosta: 1 mm.

Be to, šiame darbe Ramano spektrometrija paremtais metodais buvo pirmą kartą išsamiai analizuojami lipidų cheminiai pokyčiai, sukelti stuburo smegenų pažeidimų uždegiminių procesų. Pirmiausia, buvo parodyta, jog Ramano spektriniai žemėlapiai, gauti skaičiuojant CH_2 deformacinių virpesių modos (1440 cm^{-1}) integrinį intensyvumą, įgalina atskirti pažeidimo sritis, kuriose lipidų koncentracija yra maža (t. y. mielino dangalų demielinizacijos sritis), ir išsaugotą baltąją nervinio audinio medžiagą, tačiau nesuteikia detalios biocheminės informacijos apie minėtas neiškios kilmės lipidų gausias sritis, eančias pačioje pažeidimoje ar iš karto šalia jos.

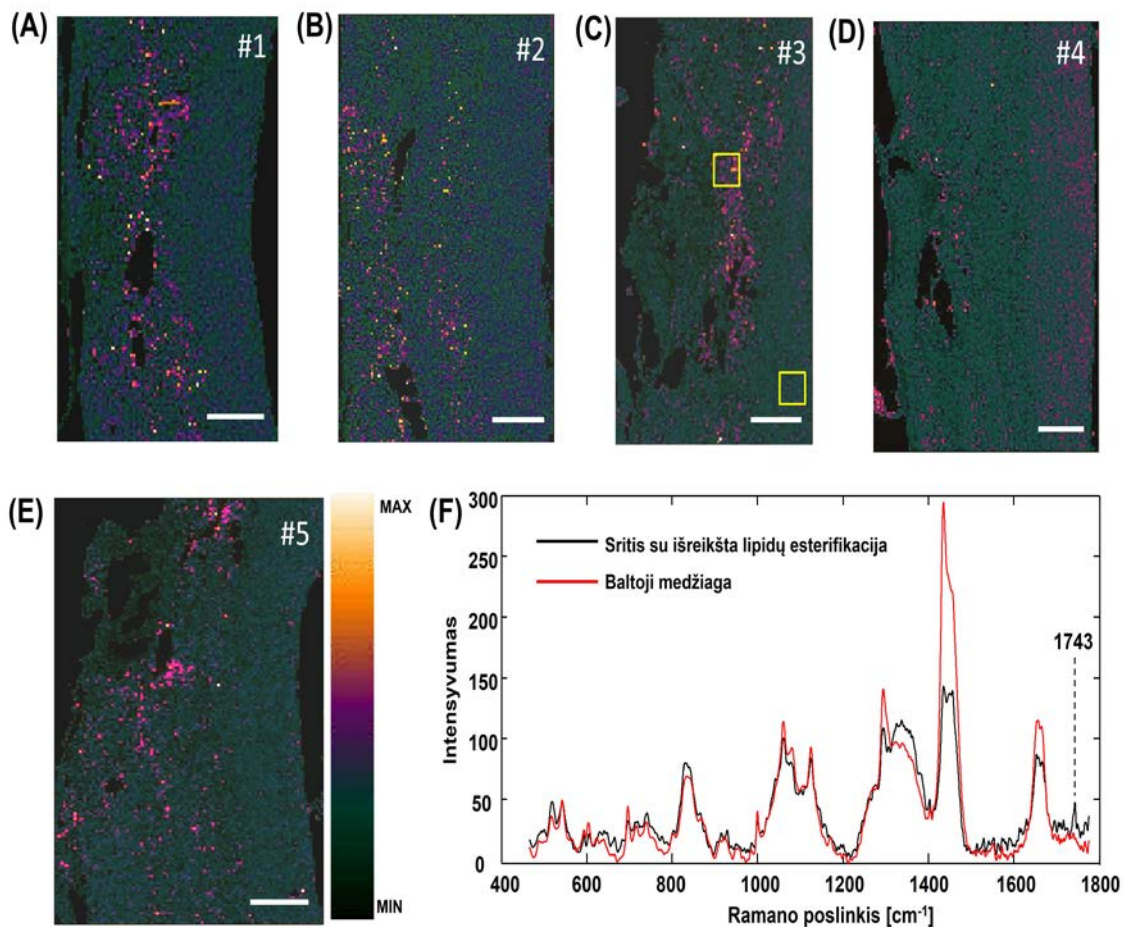


13 pav. Detalesni lipidų gausios srities ties pažeidimo centru atvaizdai. (A): H&E dažymo šviesos mikroskopijos atvaizdas, rodantis audinio morfologinę struktūrą. (B): *CARS* atvaizdas (pilkumo tonai) rodo iširusius mielino dangalus ir riebalų lašelius pažeidimoje bei tvarkingai išsilygiavusius aksonus pažeidimą ribojančioje nepažeistoje baltojoje medžiagoje. (C): *TPEF* (pilkumo tonai) atvaizdas demonstruoja aktyvuotas mikroglijos/makrofagų ląsteles, t. y. uždegimo sritis. (D): *CARS/TPEF* signalų apjungtas atvaizdas: lipidų lašelių ir aktyvuotų mikroglijos/makrofagų ląstelių padėties sutampa. Mastelio juosta: 200 μm .

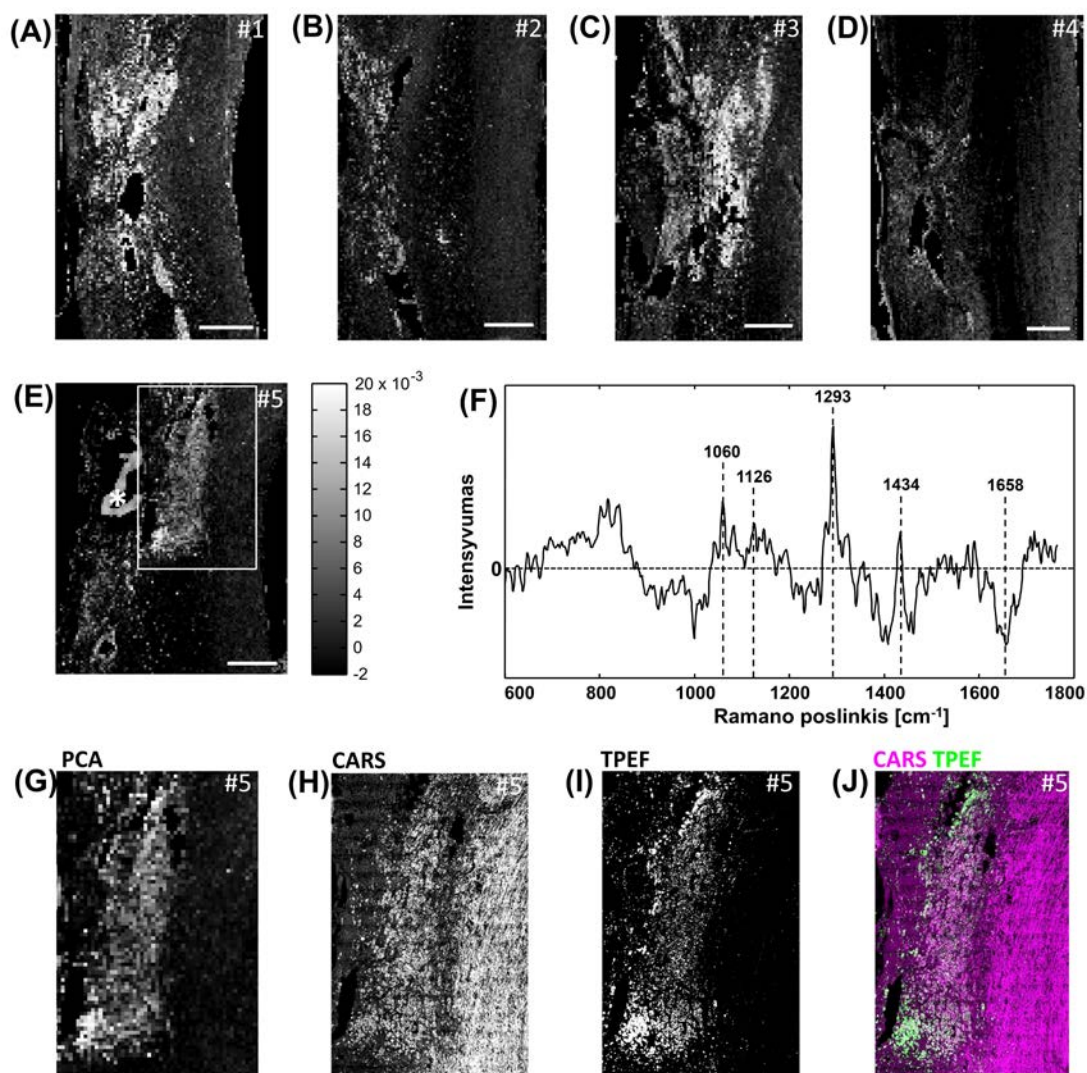
Toliau šiame darbe buvo aiškinamasi pastarųjų lipidais gausių sričių kilmė. Riebalų lašeliais užpildytų uždegiminių ląstelių – putliųjų ląstelių, šalinančių pažeistą baltąją medžiagą ir keičiančių jos lipidų cheminę struktūrą, pasiskirstymas stuburo smegenų pažeidimoje pirmiausia buvo nustatytas iš dvikanalių *CARS/TPEF* atvaizdų (13 pav.).

Be to, buvo sudaryti karbonilo grupės virpesių spektrinės juostos ties 1743 cm^{-1} Ramano intensyvumo žemėlapiai, kurie atvaizdavo didžiausios esterifikacijos regionus. Svarbu, jog pastarieji regionai sutapo su lipidais gausiomis pažaidų sritimis ir atitiko *CARS/TPEF* mikroskopijos atvaizdų sritis, kuriuose buvo identifikuotos uždegiminės aktyvuotos mikroglijos / makrofagų ląstelės (14 pav.).

Pagrindinių komponentų analizė, pritaikyta Ramano spektriniam duomenims, įgalino įvertinti biocheminius lipidų gausių sričių skirtumus. Penktojo krūvio vektoriaus (angl.



14 pav. (A) – (E): Penkių bandinių, pasižyminčių uždegimu, karbonilo virpesių (1743 cm^{-1}) integrinio intensyvumo Ramano žemėlapiai, rodantys esterifikuotų lipidų pasiskirstymą. Mastelio juosta: 0,5 mm. (F): Sričių su išreikšta (pažaida) ir su nežymia lipidų esterifikacija (baltoji medžiaga) Ramano spektrai. Pateiktieji spektrai buvo suskaičiuoti kaip vidurkiai visų spektrų, esančių 12×12 pikselių apribotose atitinkamose bandinio srityse, parodytose (C).



15 pav. Pagrindinių komponentių analizė Ramano spektriniais duomenims. Penktosios pagrindinės komponentės įverčių reiškinių žemėlapiai visiems bandiniams (A) – (E), kuriuose visuose didesnių įverčių reikšmių pikselių pozicijos atitiko uždegimines sritis su fluorescuojančiais makrofagais, ir krūvio vektorius (F), rodantis sočiosioms riebalų rūgštims būdingus virpesius. (G): #5 bandinyje pažymėtos srities padidintas atvaizdas; (H) – (J): CARS, TPEF ir sujungti CARS/TPEF atvaizdai toje pačioje srityje kaip ir (G). Mastelio juosta: 0,5 mm. Žvaigždutė (*) žymi alginato hidrogelio implantą.

loading vector) spektrinių komponentų analizė parodė, jog uždegiminėse srityse yra susikaupusios būtent sočiosios riebalų rūgštys (15 pav.). Remiantis CARS/TPEF ir Ramano spektrinių duomenų analizės rezultatais, disertacijoje buvo plačiau aptarta sočiųjų riebalų rūgščių uždegiminėse stuburo smegenų srityse kilmė.

5.3 Išvados

1. FT-IR ir Ramano mikrospektrometrinis vaizdinimas įgalino įvertinti skirtingus biocheminius stuburo smegenų pažeidimo sukeltus CNS audinio pokyčius.
2. 28 žiurkių stuburo smegenų pažeidimų FT-IR ir Ramano mikrospektrometrijos atvaizdai įgalino atlikti stuburo smegenų audinio demielinizacijos ir randėjimo kiekybinį įvertinimą, siekiant įvertinti nefunkcionalizuotų minkštų alginato hidrogelių implantų gydomąjį poveikį stuburo smegenų pažeidimams. Buvo nustatyta, kad pastarieji implantai (i) stuburo smegenų pažeidose padeda išlaikyti bendrąją audinio architektūrą ir morfologiją bei (ii) lėtinėje stuburo smegenų pažeidimo fazėje riboja tebevykstančią demielinizaciją ir audinio randėjimą.
3. FT-IR ir Ramano mikrospektrometrinis vaizdinimas puikiai tinka stebėti nefunkcionalizuoto minkšto alginato hidrogelio implantus stuburo smegenų pažeidose: buvo nustatyta, kad šie implantai pasižymi ilgalaikiu cheminiu stabilumu, siekiančiu iki šešių mėnesių po implantacijos į žiurkių stuburo smegenų audinį.
4. CARS vaizdinimas neparodė plataus masto aksonų ataugimo per stuburo smegenų pažeidimą. Visgi, keletas pavienių aksonų, kertančių implantą, eksperimentiniuose bandiniuose buvo stebimi. Tai leidžia pagrįsti prielaidą, jog tirtasis alginato hidrogelis gyvūnų modeliuose yra pralaidus augantiems aksonams.
5. Šiame darbe Ramano mikrospektrometrijos ir CARS/TPEF mikroskopijos metodai pirmą kartą buvo pritaikyti stuburo smegenų pažeidimų sukeltam uždegimui ir su juo susijusiems lipidų pokyčiams tirti. Buvo parodyta, kad: (i) Ramano žemėlapiai, kuriuose lipidų pasiskirstymas yra atvaizduojamas, skaičiuojant CH_2 virpesių Ramano spektrinės juostos integrinį intensyvumą, neleidžia atskirti išsaugotos ar regeneruojančios baltosios medžiagos nuo lipidais gausių uždegiminių sričių; (ii) karbonilo spektrinės juostos ties 1743 cm^{-1} intensyvumo Ramano žemėlapiai parodo esterifikuotų lipidų pasiskirstymą ir yra tinkamas būdas uždegiminių

sričių su lipidų gausiomis putliosiomis ląstelėmis padėčių nustatymui; (iii) uždegiminiai stuburo smegenų pažeidimų regionai yra gausūs sočiųjų riebalų rūgščių, kurios, tikėtina, dalyvauja lipidų metaboliniuose procesuose, vykstančiuose aktyvuotų mikroglijos/makrofagų ląstelėse.

BIBLIOGRAFIJA

- [1] W. Du, Y. Wang, Q. Luo, and B. F. Liu, "Optical molecular imaging for systems biology: From molecule to organism," *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 444–457 (2006).
- [2] N. Farahani and C. Monteith, "The coming paradigm shift: A transition from manual to automated microscopy," *J. Pathol. Inform.* **7**, 35 (2016).
- [3] C. Preza, D. L. Snyder, and J.-A. Conchello, "Theoretical development and experimental evaluation of imaging models for differential-interference-contrast microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A* **16**, 2185 (1999).
- [4] L. L. de Matos, D. C. Trufelli, M. G. L. de Matos, and M. A. da S. Pinhal, "Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice," in *Biomark. Insights* **2010** (2010).
- [5] R. M. Levenson, A. Fornari, and M. Loda, "Multispectral imaging and pathology: seeing and doing more," *Expert Opin. Med. Diagn.* **2**, 1067–1081 (2008).
- [6] H. J. Butler, L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N. J. Fullwood, B. Gardner, et al., "Using Raman spectroscopy to characterize biological materials," *Nat. Protoc.* **11**, 664–687 (2016).
- [7] M. J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H. J. Butler, K. M. Dorling, P. R. Fielden, S. W. Fogarty, N. J. Fullwood, et al., "Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials," *Nat. Protoc.* **9**, 1771–1791 (2014).
- [8] S. Y. Lin, M. J. Li, and W. T. Cheng, "FT-IR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biondiagnosis of human tissues," in *Spectroscopy* **21** (2007).
- [9] M. Hermes, R. B. Morrish, L. Huot, L. Meng, S. Junaid, J. Tomko, G. R. Lloyd, W. T. Masselink, P. Tidemand-Lichtenberg, et al., "Mid-IR hyperspectral imaging for label-free histopathology and cytology," in *J. Opt. (United Kingdom)* **20** (2018).

- [10] B. H. Hokr and V. V. Yakovlev, "Raman signal enhancement via elastic light scattering," *Opt. Express* **21**, 11757 (2013).
- [11] A. Volkmer, "Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-stokes raman scattering microscopy," in *J. Phys. D. Appl. Phys.* **38** (2005).
- [12] J. P. Pezacki, J. A. Blake, D. C. Danielson, D. C. Kennedy, R. K. Lyn, and R. Singaravelu, "Chemical contrast for imaging living systems: Molecular vibrations drive CARS microscopy," in *Nat. Chem. Biol.* **7** (2011).
- [13] A. S. Marco Andreana, "Optical Microscopy: From Biophotonics to Geophotonics," *Opn*, 42–49 (2014).
- [14] T. T. Le, S. Yue, and J.-X. Cheng, "Shedding new light on lipid biology with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *J. Lipid Res.* **51**, 3091–3102 (2010).
- [15] R. Galli, O. Uckermann, M. J. Winterhalder, K. H. Sitoci-Ficici, K. D. Geiger, E. Koch, G. Schackert, A. Zumbusch, G. Steiner, et al., "Vibrational spectroscopic imaging and multiphoton microscopy of spinal cord injury," *Anal. Chem.* **84**, 8707–8714 (2012).
- [16] C. L. Evans, X. Xu, S. Kesari, X. S. Xie, S. T. C. Wong, and G. S. Young, "Chemically-selective imaging of brain structures with CARS microscopy," *Opt. Express* **15**, 12076 (2007).
- [17] T. Meyer, N. Bergner, C. Bielecki, C. Krafft, D. Akimov, B. F. M. Romeike, R. Reichart, R. Kalff, B. Dietzek, et al., "Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis," *J. Biomed. Opt.* **16**, 021113 (2011).
- [18] T. Meyer, N. Bergner, A. Medyukhina, B. Dietzek, C. Krafft, B. F. M. Romeike, R. Reichart, R. Kalff, and J. Popp, "Interpreting CARS images of tissue within the C-H-stretching region," in *J. Biophotonics* **5** (2012).
- [19] R. Galli, O. Uckermann, A. Temme, E. Leipnitz, M. Meinhardt, E. Koch, G. Schackert, G. Steiner, and M. Kirsch, "Assessing the efficacy of coherent anti-

- Stokes Raman scattering microscopy for the detection of infiltrating glioblastoma in fresh brain samples,” *J. Biophotonics* **10**, 404–414 (2017).
- [20] H. Wills, R. Kast, C. Stewart, R. Rabah, A. Pandya, J. Poulik, G. Auner, and M. D. Klein, “Raman spectroscopy detects and distinguishes neuroblastoma and related tissues in fresh and (banked) frozen specimens,” *J. Pediatr. Surg.* **44**, 386–391 (2009).
- [21] H. Wills, R. Kast, C. Stewart, B. Sullivan, R. Rabah, J. Poulik, A. Pandya, G. Auner, and M. D. Klein, “Diagnosis of Wilms’ tumor using near-infrared Raman spectroscopy,” *J. Pediatr. Surg.* **44**, 1152–1158 (2009).
- [22] S. K. Suvarna, C. Layton, and J. D. Bancroft, *Bancroft’s Theory and Practice of Histological Techniques*, 7th ed. (Elsevier Health Sciences, 2013).
- [23] D. Orringer, D. Lau, S. Khatri, G. J. Zamora-Berridi, K. Zhang, C. Wu, N. Chaudhary, and O. Sagher, “Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival,” *J. Neurosurg.* **117**, 851–859 (2012).
- [24] A. Behin, K. Hoang-Xuan, A. F. Carpentier, and J.-Y. Delattre, “Primary brain tumours in adults.,” *Lancet* **361**, 323–331 (2003).
- [25] H. L. Somerset and B. K. Kleinschmidt-DeMasters, “Approach to the intraoperative consultation for neurosurgical specimens,” in *Adv. Anat. Pathol.* **18** (2011).
- [26] K. Petrecca, M. C. Guiot, V. Panet-Raymond, and L. Souhami, “Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma,” *J. Neurooncol.* **111**, 19–23 (2013).
- [27] R. J. Dumont, D. O. Okonkwo, S. Verma, R. J. Hurlbert, P. T. Boulos, D. B. Ellegala, and a S. Dumont, “Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms,” *Clin. Neuropharmacol.* **24**, 254–264 (2001).

- [28] J. Silver and J. H. Miller, "Regeneration beyond the glial scar," in *Nat. Rev. Neurosci.* **5** (2004).
- [29] M. M. Pakulska, B. G. Ballios, and M. S. Shoichet, "Injectable hydrogels for central nervous system therapy," in *Biomed. Mater.* **7** (2012).
- [30] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Alginate: Properties and biomedical applications," *Prog. Polym. Sci.* **37**, 106–126 (2012).
- [31] K. Kataoka, Y. Suzuki, M. Kitada, T. Hashimoto, H. Chou, H. Bai, M. Ohta, S. Wu, K. Suzuki, et al., "Alginate enhances elongation of early regenerating axons in spinal cord of young rats.," *Tissue Eng.* **10**, 493–504 (2004).
- [32] M. Matyash, F. Despang, R. Mandal, D. Fiore, M. Gelinsky, and C. Ikonomidou, "Novel Soft Alginate Hydrogel Strongly Supports Neurite Growth and Protects Neurons Against Oxidative Stress," *Tissue Eng. Part A* **18**, 55–66 (2012).

SUMMARY

Studies of biological tissues and biomolecules, which are essential for both structure and growth of living systems, is of a key importance in biomedical and bioanalytical applications. Various methods are widely used in this field of studies, including optical microscopy and spectroscopy. Conventional optical microscopy techniques are capable to provide morphological information of a biological tissue, but do not carry specific chemical information. Current immunohistochemical visualization techniques, which are based on labeling the molecules with special dyes, provide crucial visual and chemical information. However, binding the molecules with special dyes is an invasive method. What is more, the sample preprocessing is usually long and complicated, the success of evaluation is greatly based on the experience of the pathologist and the provided chemical information is not complete.

Due to the growing need of clinical applications and of improvements in disease diagnosis, the importance to establish sensitive, chemically selective and label-free imaging techniques that are based on fundamental properties of biomolecules and thus are non-invasive is of a great demand.

Vibrational spectroscopy imaging, which is based on intrinsic molecular vibrations, is capable to provide chemical information without exogenous labeling of biomolecules in a form of vibrational spectra. However, the main limiting factors of infrared (IR) spectroscopic imaging are (i) low spatial resolution due to considerably long wavelength of IR radiation and (ii) strong water absorption in biological samples. Raman microscopy does not suffer from the mentioned problems. On the other hand, when applied for biological samples, the spontaneous Raman scattering (or inelastic scattering) imaging also faces several limitations. Firstly, the cross sections of spontaneous Raman scattering are roughly only one out of 10^3 to 10^6 scattered photons to be scattered inelastically. Thus, the acquisition of Raman spectra requires high laser powers and integration times up to a few seconds per spectrum. Also, the background

autofluorescence signal of the sample often obstructs the sample specific vibrational spectral information.

Detailed morphochemical information can be attained by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) microscopy, which is a non-linear variant of spontaneous Raman scattering imaging. The method is based on the non-linear interaction between molecules and pulsed laser radiation. During the event, information can be gained from chemically selective signals, probing particular Raman scattering mode. Therefore, endogenous morphochemical contrast of the tissue specimen can be achieved without any additional labeling. When compared with spontaneous Raman scattering microscopy, the full vibrational spectral data is not acquired and the chemical profile of the sample is incomplete. This disadvantage is compensated by the fact that CARS signal is by nature coherent and intensive, which makes the data acquisition considerably faster. By simultaneous generation and acquisition of CARS, second harmonic generation (SHG) and two-photon excited fluorescence (TPEF) signals on a scanning laser microscope, a highly chemically informative multimodal image can be recorded by single imaging experiment.

Revived by innovation, these modern imaging techniques rapidly grow scientific interest for variety of potential applications and further development. Nevertheless, possible sample preparation methods, which would allow to successfully apply vibrational spectroscopy-based imaging for tissue morphochemical investigations are still unclear or unproven and, therefore, require additional studies. For example, formalin-fixed paraffin-preserved (FFPP) brain tissue samples could be an important source of extensive retrospective studies. However, the applicability and potential of CARS imaging of particular samples was not yet addressed. Furthermore, the diagnostic capabilities of vibrational spectroscopic imaging and CARS microscopy are especially promising to investigate nervous tissue of central nervous system (CNS) and, especially, lipid content altering diseases of CNS, such as spinal cord injury or brain tumors. Despite this fact, linear vibrational spectroscopic imaging and CARS microscopy still requires more extensive studies in the field of neuroimaging. Also, the potential of

these particular means of imaging to be applied in a complementary fashion is not yet extensively exploited.

Goals and tasks of the thesis

The fundamental goal of this thesis was to combine experimental vibrational spectroscopy-based imaging techniques and spectral data analysis approaches to (i) evaluate these imaging modalities as a tool for diagnostic neuropathology and monitoring of SCI treatment strategies and to (ii) gain new insights in biochemical status of diseased nervous tissue. Therefore, this work covers the following tasks:

1. Analyze the effects of formalin-fixed paraffin-preserved brain tissue sections deparaffinization in order to evaluate compatibility of formalin-fixed paraffin-preserved brain tissue samples for multimodal CARS imaging and to decide for the most suitable brain tissue sample preservation approach for CARS microscopic imaging.
2. Validate applicability of CARS microscopy as a tool for precise delineation and assessment of primary and secondary brain tumors and confirm the results with the help of Raman microspectroscopy.
3. Apply and evaluate infrared and Raman microspectroscopy as well as multimodal CARS microscopy for assessing the effects of and monitoring novel soft alginate hydrogel implants for spinal cord injury treatment.
4. Apply Raman microspectroscopy in a combination with CARS and TPEF microscopy to retrieve the biochemical information about the inflammation-related alterations of lipids triggered by spinal cord injury.

Statements of the thesis

1. Despite the loss of lipids and artifacts induced by residual paraffin, sections of deparaffinized brain tissue provide morphochemical information, when imaged by Raman microspectroscopy and CARS microscopy. However, the study of brain tissue pathologies is limited, when deparaffinized sections are used, and sample cryoprotection is a better choice for more biochemically comprehensive results.

2. The average reduction of CARS signal intensity in brain tumors was decreased by 30% – 40% with respect to normal gray matter, depending on type of tumor. Therefore, CARS signal intensity ratio between tumor and normal gray matter can be used as a robust parameter to identify tumor borders, infiltrations and small tumor islands.
3. According to semi-quantitative infrared spectral data analysis, in the chronic state of spinal cord injury, implants of soft alginate hydrogel result in significantly higher lipid content in contralateral white matter and significantly reduced fibrotic scarring.
4. Spectral information provided by FTIR and Raman microspectroscopy techniques enables to detect alginate hydrogel implant and monitor its chemical stability in spinal cord injury.
5. Mapping the intensity of carbonyl Raman band at 1743 cm^{-1} allows to localize inflammatory regions of spinal cord injury, while chemometrical analysis of Raman spectral data reveals these regions to be enriched with saturated fatty acids.

Novelty and relevance of the results

- Vibrational spectroscopic imaging and multimodal CARS microscopy have a great potential to be applied as separate methods as well as in a complementary manner to morphochemically visualize various CNS tissue pathologies with the future diagnostic, monitoring of treatment and even intraoperative prospects in clinical application.
- As detailed and comparative approach was still lacking to evaluate CARS imaging potential for brain tumor delineation and characterization, extended set of primary and secondary tumors grown in mouse model as well as human tumors were investigated in this work.
- The decrease of CARS signal intensity in brain tumors was for the first time evaluated in detail and correlated with tissue structures and cellularity: it might result

not only from higher occurrence of lipid-poor structures within the tissue, but also be related with a general biochemical signature of tumorous tissue.

- Novel unfunctionalized soft alginate hydrogel implant was applied as a treatment strategy to SCI in rat model. Combined approach to apply FT-IR, Raman and multimodal CARS imaging is excellent for comprehensive biochemical assessment of SCI treatment strategies.
- Until now only SCI-induced demyelination and scarring were already studied elsewhere by Raman spectroscopy. Inflammation was so far neglected in spectroscopic studies of SCI and was successfully addressed in this work.

Results

The multimodal CARS-SHG-TPEF images from deparaffinized sections of mouse brain were compared with those from cryosections. Axons were selected to compare the images. The deparaffinization conserved the general tissue morphology. However, the deparaffinized samples showed reduced CARS signal intensities: the tissue morphochemical contrast available from CARS signal was based on different protein content, as lipids are removed during deparaffinization. Several paraffin solvents were tested and all resulted to CARS images with no contrast between axons and surrounding cell bodies. A trend of TPEF signal intensity increase was observed in deparaffinized samples. Also, CARS images of deparaffinized tissue samples contained some artifacts, which by applying Raman microspectroscopy were attributed to residuals of paraffin wax.

All multimodal images acquired from the deparaffinized sections of human brain provided good chemical contrast to observe various brain tissue structures. Tumor tissue and surrounding brain parenchyma could be readily distinguished due morphological differences provided by multiphoton signals as confirmed by H&E stainings. Similar to the findings obtained in mouse brain, several paraffin artifacts generating intense CARS signal were observed in all the samples investigated.

CARS imaging was evaluated as a technique for label-free discrimination between the brain tumors and the surrounding normal brain parenchyma in mouse model. The focal brain tumors were induced in mice using human glioblastoma cells, metastasis of human melanoma and of human breast cancer cells. The primary and secondary tumors could be localized in the CARS images, because of the lower lipid content in tumors and resulting lower intensities of CARS signal. The borders of the tumors were localized with high precision. CARS images were in perfect agreement with the corresponding images of H&E stainings. In all investigated samples, the CARS signal intensity within the tumor was lower than within gray matter. The decrease was more pronounced in glioblastoma than in both types of metastases. On average, the CARS signal intensity was decreased by 30 – 40 percent depending on tumor type.

Even more, CARS images provide cellular resolution. This enabled to detect small tumor infiltrates down to few cells: cell nuclei were characterized as dark structures in CARS images. CARS imaging also enabled to discern regions of tumor infiltration due to gradual decline of the CARS signal intensity values from normal gray matter via infiltration zone to solid tumor.

Raman spectroscopy was performed to alleviate any uncertainty about the lipid contribution to the observed CARS signals. The quantification of the intensity of the Raman band at 2850 cm^{-1} - the one, which is addressed in CARS imaging - confirmed the findings of the CARS signal measurements: the intensity reduction was significantly more pronounced in tumors than in normal grey matter.

The CARS imaging of a six human glioblastoma biopsies confirmed the findings obtained in the mouse model. The tumor was characterized by lower CARS signal intensities than the surrounding normal tissue. CARS signal intensity changes were sufficient to discern normal tissue, the infiltration zone, and the solid tumor. Quantification demonstrated a reduced CARS signal intensity within the tumor compared to adjacent almost normal brain tissue in all samples of human glioblastoma investigated. The average decrease was approximately by 30%.

Spinal cord injury and its treatment with alginate hydrogel implants were investigated in rat model. In total, 28 rats were investigated. They all received hemisection injury and were divided into groups of 14 alginate-implanted and 14 control animals without alginate implant. At one month post-injury, 7 animals from each group were selected randomly and longitudinal cryosections of spinal cords were prepared. The same procedure were done for the rest of the animals at six months post-injury.

IR spectroscopic mapping allowed to address the demyelination and scarring as well as to monitor the alginate hydrogel implants. To generate images showing the distribution of lipids, the integral intensity of band 1735 cm^{-1} was calculated. Tracts of white matter containing more lipids could be distinguished from grey matter. Lipid depleted region corresponding to secondary demyelination next to injury site was identified in all the samples. To semi-quantify the differences of demyelination between different samples groups, the integral intensities of bands corresponding to lipids at 1735 cm^{-1} , 1466 cm^{-1} , 1225 cm^{-1} were analyzed. Significantly higher lipid content ($p=0.019$, $p=0.0095$, $p=0.0095$, for 1735 cm^{-1} , 1466 cm^{-1} , 1225 cm^{-1} , respectively) was in the alginate-implanted group of six months.

To investigate, whether implantation of alginate affects the scarring, the quantity of collagen was analyzed. The intensity of the band at 1242 cm^{-1} was used to retrieve spectroscopic images, which showed the location and the extent of the scar. The mean thickness of collagenous tissue was quantified. It was found to be significantly reduced in alginate-implanted samples, compared to the untreated controls at six months post-injury.

Also, the stability of implants in injured spinal cord tissue was investigated. The spectral pattern of implanted and native alginate was similar and the positions of spectral bands were consistent: no exchange of crosslinking ions took place in the hydrogel after implantation. Residues of the implants were identified in 6/7 and in 5/7 spinal cord samples at one month and at six months after injury, respectively.

CARS microscopy was applied to combine the chemical information with the morphology of spinal cord tissue with submicrometer resolution. Even though, that no massive axonal growth across the lesion could be proved, isolated axons inside the lesion were found in several samples.

Raman microspectroscopy was applied in a combination with CARS-TPEF microscopy to retrieve the biochemical information about the inflammation-related alterations of lipids triggered by spinal cord injury. Raman integral intensity maps of a band at 1743 cm^{-1} (carbonyl vibration) precisely represented regions of inflammation (distribution of esterified lipids) and co-localized with the foam cells as detected with CARS/TPEF microscopy.

Principal component analysis was applied on the entire dataset, namely the one produced by merging Raman spectral data from all samples. The fifth component appeared to be related with inflammatory regions. The corresponding loading vector was consistent with saturated fatty acids, in particular, myristic acid. The score maps mimicked the pattern of TPEF more than the distribution of lipid droplets as seen by CARS.

Conclusions

Lipids are removed from the tissue during its deparaffinization. The morphochemical contrast in CARS images of deparaffinized sections is, therefore, provided by varying content of proteins. Compared with cryosections, TPEF signal intensity values and morphological contrast in TPEF images of deparaffinized brain tissue sections are increased. This contributes for better definition of various brain tissue structures. Paraffin is not completely removed from FFPP tissue sections during conventional deparaffinization process. Paraffin artifacts have to be taken in account when interpreting CARS images of deparaffinized brain tissue samples. In deparaffinized samples, multimodal CARS/TPEF/SHG microscopy is suitable to image various structures of mouse and human brain tissue and to distinguish brain tumor borders. However, the morphochemical information provided by variations of lipid content is no longer

available. The resultant lack of lipid-related CARS contrast brings substantial limitations to studies of CNS tissue pathologies, which are related with lipid content alterations. In this case, cryoprotected or fresh tissue specimens are best choice for conventional CARS imaging based on addressing the Raman band at 2850 cm^{-1} of CH_2 vibrations.

Morphochemical contrast of CARS images enables to discern brain tumors from the normal parenchyma irrespective of the tumor type and characteristics. Tumor margins, infiltrations and small tumor islands can be identified with cellular resolution due to lower intensity values of CARS signal in tumor than in normal brain parenchyma. The reduction of CARS signal intensity is more pronounced in glioblastoma than in metastases. The decrease of CARS intensity is related with the decrease of total lipid content in tumors as confirmed by Raman spectroscopy. No correlation between independent tumor-induced cytological changes and the degree of CARS signal intensity reduction were found.

FTIR and Raman microspectroscopic imaging enable to address different biochemical aspects of central nervous system tissue alterations induced by spinal cord injury. FTIR and Raman chemical images of 28 injured rat spinal cords allowed to perform quantitative assessment of tissue demyelination and scarring in order to assess the therapeutic effects of non-functionalized soft alginate hydrogel implants. These implants (i) may help to preserve the overall tissue architecture and morphology, (ii) may limit the ongoing demyelination of CNS tissue and (iii) may reduce scarring at the chronic stage of SCI. Both FTIR and Raman microspectroscopic imaging are superior for monitoring non-functionalized soft alginate hydrogel implants in SCI: particular implants have a long-term chemical stability up to six-months after the implantation in nervous tissue of rat spinal cord. No massive axonal growth across the lesion could be proved in animals treated by using alginate hydrogel. Nevertheless, isolated axons inside the lesion were found by CARS imaging in several experimental samples supporting that the non-functionalized soft alginate hydrogel implants are permissive to axon growth in animal model. Alterations of lipids, which are triggered by spinal cord injury-induced inflammation, was for the first time addressed by spectroscopic studies. It was shown that: (i) unspecific mapping of CH_2 (and sterol ring) Raman band intensity

to address the lipid distribution does not enable to discern between preserved white matter and inflammatory regions; (ii) mapping of carbonyl Raman band intensity to address distribution of esterified lipids is an appropriate approach to localize inflammatory regions with lipid laden microglia/macrophages; (iii) inflammatory regions of SCI are rich of saturated fatty acids, which are likely taking part in the lipid metabolism of activated microglia/macrophages.