



Резюме на проект по Фонд „Наука“ № 16007 – Конкурсна сесия 2016:

„Триизмерна визуализация на глиални клетъчни израстъци и туморни клетки при колоректален рак“

Ръководител: Проф. д-р Никола Йорданов Колев, дмн

Заложена цел: Триизмерна визуализация на ентерична глия в тумори от колоректален рак и нормална дебелочревна мукоза.

Предвидена за закупуване **апаратура:** Инвертен микроскоп и софтуерни модули към налична многоканална флуоресцентна микроскопска система, които ще позволят обработката на триизмерни обекти.

Очаквани резултати: Проектът ще подкрепи дисертационния труд на д-р Александър Златаров от Катедрата по обща и оперативна хирургия, МУ-Варна, както и ще подпомогне научната работа на млади учени (д-р Павел Павлов, д-р Недялка Згурова от Клиниката по патология, УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна). Очаква се и една публикация в международно списание с импакт фактор.

Постигнати резултати: Чрез промяна в протокола беше модифициран един от методите за тъканно просветляване, наречен CUBIC. Този метод беше избран за тъканното опрозряване, тъй като се използва само инкубиране в химически съединения, без да е необходимо да се прилага допълнително скъпо оборудване като платинени електроди, които не се предлагат в стандартните хистологични лаборатории. Целта беше да се оптимизира за възможността за 3D визуализация на тъкан от колон на човек без да е нужно използването на конфокален микроскоп. Оптимизацията включва модификации на различни стъпки, които позволиха по-добри резултати. Чрез прилагане на оптимизациите бе открит силен сигнал за $\beta 3$ -тубулин в ламина проприя на нормалната чревна стена, както и в тумор. Само чрез стандартна епифлуоресценция бе постигнат добър сигнал на дълбочина 300-500 μm дебелина на тъканния срез, както и при дебелина на среза 3-4 мм. Флуоресцентните изображения бяха трансформирани в 3D реконструкцията чрез използване на лесно достъпни програми като Fiji и ilastik. Първо беше визуализирана инервацията в материал от дебело черво на човек и съседния колоректален карцином чрез класическа имунофлуоресценция. Бяха оцветени нервни структури както в нормалната стена на дебелото черво, така и в тумора, невроендокринните клетки в нормалните крипти и туморните клетки, като за по-нататъшно изследване и по-добра 3D реконструкция

дебелината на среза беше увеличена над 50 μm , което доведе до понижено качество на изображението със стандартни методи. Като решение беше модифициран и приложен методът за изчистване на тъкани CUBIC и по този начин успешно бяха обработени тъканни резени с дебелина до 100 μm . β 3-тубулинът дава стабилно оцветяване след третиране с CUBIC и може да служи като контрол при изследване на човешката стена на дебелото черво и тумор, използвайки други антитела за маркиране.