



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## **STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

### **„Badania spektroskopowe i modelowe stanu biochemicznego erytrocytów i ich błon”**

**mgr Aneta Katarzyna Błat**

**Promotor: dr hab. Kamilla Małek, prof. UJ**

Krwinki czerwone są szczególnie narażone na stres oksydacyjny, czyli zaburzenia równowagi pomiędzy ilością szkodliwych wolnych rodników a przeciwutleniaczy, których rola polega na neutralizacji tych pierwszych. Pomimo wykształconego w erytrocytach antyoksydacyjnego systemu obronnego, różnorodne procesy patologiczne mogą prowadzić do jego uszkodzenia i/lub powstania nadmiaru reaktywnych form tlenu. Odbywa się to głównie poprzez obecność cząsteczek zapalnych wspólnie transportowanych w układzie krwionośnym. Ilość uszkodzeń oksydacyjnych erytrocytów wzrasta podczas starzenia się organizmu oraz w niektórych stanach chorobowych. W dotychczasowych badaniach, wykazano zależność pomiędzy zwiększoną ilością wolnych rodników a niedokrwistością w chorobach takich jak cukrzyca, nowotwory, niewydolność wątroby, serca, reumatoidalne zapalenie stawów czy przewlekła choroba nerek. Rola stresu oksydacyjnego w przyspieszaniu hemolizy krwinek czerwonych jest ogromna, jednakże mechanizmy jego działania powodujące w tych komórkach różne zmiany biochemiczne, morfologiczne czy mechaniczne, wciąż pozostają niejasne. Obecnie

uważa się, że pierwsze biochemiczne oznaki działania stresu oksydacyjnego w erytrocytach dotyczą błon komórkowych i pojawiają się jeszcze przed wystąpieniem zmian morfologicznych związanych ze stopniową utratą dwuwklęsłego kształtu komórek. Stąd też, w dalszym ciągu poszukuje się odpowiednich narzędzi badawczych, które byłyby skuteczne w detekcji tego typu uszkodzeń. W ostatnim czasie, dużym uznaniem i potencjalną użytecznością pod kątem badania zmian biochemicznych cieszą się techniki spektroskopii oscylacyjnej, które w przeciwieństwie do innych tradycyjnych metod pomiarowych nie wymagają specjalnego przygotowania próbek, często bezpośrednio wpływającego na ich skład.

Niniejsza rozprawa doktorska obejmuje badania związane z wykorzystaniem wybranych technik spektroskopowych i mikroskopowych do detekcji markerów stresu oksydacyjnego w krwinkach czerwonych, ze szczególnych uwzględnieniem spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni z techniką ATR-FTIR (ang. *Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Głównym jej celem jest analiza zmian powstających w erytrocytach na skutek szeroko rozumianego stresu oksydacyjnego w kilku różnych kontekstach. Badania prowadzono na komórkach pochodzących z mysich modeli starzenia i chorób sercowo-naczyniowych, koncentratkach krwinek czerwonych przechowywanych w warunkach naśladujących banki krwi oraz erytrocytach ludzkich, w których chemicznie wywoływano stres oksydacyjny poprzez dodanie różnych substancji chemicznych.

W pierwszym etapie badań skoncentrowano się na ocenie użyteczności wybranych technik spektroskopowych w identyfikacji uszkodzeń biochemicznych błon erytrocytów indukowanych stresem oksydacyjnym. Celem było przede wszystkim sprawdzenie, w jakim stopniu możliwe jest zastosowanie wybranych technik spektroskopii oscylacyjnej do śledzenia zmian ich składu biochemicznego bez konieczności doprowadzania całych komórek do hemolizy, by otrzymać wyizolowaną frakcję błon. Badania wykazały, że spektroskopia w podczerwieni oraz ramanowska są tylko częściowo skuteczne w tego typu pomiarach, ze względu na fakt, że obecna w komórkach hemoglobina przysłania sygnał pochodzący z błon w zakresie białek. Obie techniki sprawdzają się w analizie frakcji lipidowej błon, przy czym ta pierwsza dostarcza bardziej szczegółowych informacji na ten temat. Uzyskanie informacji dotyczących zawartości i struktury białek błonowych z pomiarów całych erytrocytów wiąże się z prowadzeniem badań na poziomie nanostrukturalnym, co wykazała technika nanospektroskopii w podczerwieni.



Głównym celem kolejnej części badań była analiza biochemicznych i morfologicznych zmian zachodzących w erytrocytach w procesach naturalnego i indukowanego starzenia oraz chorób sercowo-naczyniowych. Rozdział ten bazował na krwinkach czerwonych pobieranych od mysich modeli chorób cywilizacyjnych. Oceny stanu komórek dokonywano w oparciu o analizę danych spektroskopowych otrzymanych przy użyciu techniki ATR-FTIR z uwzględnieniem błon i struktury hemoglobiny oraz wyników uzyskanych za pomocą technik referencyjnych, takich jak morfologia krwi i analiza biochemiczna osocza. W cyklu prowadzonych eksperymentów wykazano, że stres oksydacyjny stanowi ważną ścieżkę patofizjologiczną w procesie starzenia organizmu, a także rozwoju i postępie miażdżycy oraz niedoczynności serca. Analiza spektroskopowa umożliwiła identyfikację markerów stresu oksydacyjnego obejmujących zmiany w organizacji błon oraz struktury hemoglobiny, które były charakterystyczne dla określonych dysfunkcji.

W kolejnej części pracy doktorskiej skupiono się na spektroskopowej analizie zmian jakości koncentratów krwinek czerwonych (KKCz) przechowywanych w warunkach naśladujących banki krwi. KKCz są preparatami składającymi się z erytrocytów i płynu konserwującego, którego zadaniem jest przedłużenie trwałości komórek. Cel był podyktowany faktem, że przechowywanie wywołuje szereg zmian w erytrocytach, na skutek których często zdarzają się różne powikłania i niepożądane skutki transfuzji. Najczęściej dotyczą one pacjentów szczególnie wrażliwych na obecność czynników prozapalnych, niedotlenienie, hemolizę czy zaburzenia elektrolitowe. Próbki badano przy użyciu spektroskopii w podczerwieni w przeciągu sześciu tygodni w odstępach tygodniowych w terminie ważności preparatu oraz dwa tygodnie po przekroczeniu tego terminu. W tym aspekcie, postawiono na identyfikację zmian zachodzących w drugorzędowej strukturze hemoglobiny, które wpływają negatywnie na biodostępność tlenu w organizmie biorcy. Wykazano, że wraz z czasem dochodzi do wielu niekorzystnych efektów w strukturze tego białka, m. in. wzrostu zawartości struktur nieuporządkowanych, tworzenia się agregatów międzycząsteczkowych, spadku struktur  $\beta$ -skreću oraz zakłócenia równowagi pomiędzy  $\beta$ -kartką a  $\alpha$ -helisą, która jest podstawowym motywem strukturalnym hemoglobiny. Takie zmiany mogą być nieodwracalne i najprawdopodobniej wiążą się z nieprawidłowym fałdowaniem oraz utratą funkcjonalności białka w przypadku starszych preparatów. W tej części dokonano także oceny zmian metabolicznych erytrocytów w zależności od wieku, płci, zawartości hemoglobiny we krwi dawcy oraz fragmentu worka, w którym

się znajdowały. W tym celu badano zmieniający się skład biochemiczny płynu konserwującego, który stanowi rezerwuuar glukozy będącej podstawowym substratem energetycznym krwinek czerwonych i może pośrednio dostarczać informacji na temat metabolizmu komórek. Jako markery spektralne wybrano pasma określające stosunek zawartości mleczanów do glukozy, zawartość hemoglobiny oraz lipidów, których zmiany intensywności opisują kolejno dynamikę procesu glikolizy, hemolizy i uwalniania lipidów z błon. Wykazano, że w preparatach płci żeńskiej tempo powyższych procesów jest wolniejsze, natomiast wiek czy zawartość hemoglobiny we krwi dawcy nie mają szczególnego znaczenia w tym aspekcie. Jednocześnie, erytrocyty szybciej starzeją w pilotkach w porównaniu do całej objętości worka, w związku z czym ocena przydatności z tej części worka powinna odbywać się z dużą ostrożnością.

Mając na celu pogłębienie, a zarazem podsumowanie wiedzy na temat działania stresu oksydacyjnego na erytrocyty, ostatni etap pracy związany jest z wykonywaniem badań *in vitro* na izolowanych komórkach z użyciem wybranych substancji chemicznych o właściwościach utleniających: nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) oraz wodoronadtlenku t-butylu (tBOOH). Przeprowadzenie badań z wykorzystaniem spektroskopii absorpcyjnej w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis; ang. *Ultraviolet-Visible spectroscopy*), ATR-FTIR oraz techniki mikroskopowej AFM (ang. *Atomic Force Microscopy*) pozwoliło na kompleksową ocenę powstających uszkodzeń oksydacyjnych i porównanie obu utleniaczy pod względem zmian morfologicznych, strukturalnych i biochemicznych powodowanych w komórkach. Takie podejście umożliwiło zobrazowanie dwóch reprezentatywnych modeli mechanizmów uszkodzania erytrocytów na skutek stresu oksydacyjnego, zależnych od chemicznych właściwości zastosowanego związku utleniającego. Wykazano, że zmiany strukturalne w hemoglobinie są bardziej znamienne dla  $H_2O_2$ , natomiast modyfikacje błon, w szczególności te związane z frakcją lipidową, dotyczą przede wszystkim działania tBOOH.

Podsumowując, wyniki uzyskane w cyklu eksperymentów przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły na opracowanie panelu markerów, które mogą posłużyć do przyszłych badań z zastosowaniem tej metodologii, jak również stanowią wskazówki do dokładniejszych badań metabolomicznych błon erytrocytów. Ponadto, wykazały olbrzymi potencjał technik spektroskopowych do szybkiej analizy składu erytrocytów z niewielkiej ilości pobranej próbki bez konieczności wykonywania kosztownych badań. W pracy ukazano przydatność techniki ATR-FTIR szczególnie w kontroli jakości preparatów przeznaczonych

do transfuzji. W przyszłości, uzyskane wyniki mogą posłużyć do opracowania standardowych kryteriów, które pozwolą na odróżnienie KKCz o niskiej jakości od tych nadających się do przetoczenia, nawet do grupy pacjentów wrażliwych.

Aneta Biał