



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

### **Obrazowanie zmian chemicznych towarzyszących modyfikacjom fenotypu komórek w modelach patologii układu krwionośnego z wykorzystaniem mikroskopii ramanowskiej**

Autor: Krzysztof Czamara

Promotor: dr hab. Agnieszka Kaczor

Praca doktorska wykonana w Zespole Obrazowania Ramanowskiego

w Zakładzie Fizyki Chemicznej Wydziału Chemii

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Śródbłonek, będący barierą między krwią, a wewnętrzną częścią naczyń i bardzo aktywnym organem regulatorowym, jest niezwykle podatny na wpływ czynników patologicznych. Postuluje się, że większość chorób układu sercowo-naczyniowego ma swój początek w dysfunkcji śródbłonka, tym samym komórki śródbłonka stanowią wygodny i odpowiedni model do badań *in vitro* nad rozwojem patologii układu krwionośnego.

Zasadniczym celem pracy doktorskiej było zbadanie zmian chemicznych towarzyszących modyfikacjom fenotypu komórek śródbłonna w stanie zapalnym oraz apoptozie i zweryfikowanie otrzymanych wyników w badaniach stanu zapalnego w stenozie aortalnej w tkance *ex vivo* z zastosowaniem obrazowania ramanowskiego, oraz pomocniczo obrazowania z użyciem mikroskopii sił atomowych oraz testów biochemicznych i barwień histochemicznych.

W ramach pracy zbadano zmiany chemiczne w komórkach śródbłonna HMEC-1, w których wzbudzone procesy stanu zapalnego z wykorzystaniem dwóch czynników angażujących różne receptory błonowe: czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ ) oraz lipopolisacharydy (LPS), pochodzące z bakterii *E. Coli*, oraz wczesną apoptozę indukowaną na komórkach EA.hy926 pod wpływem receptora błonowego dla Fas ligandu (FasL) oraz cykloheksymidu (CHX). Aby wykluczyć wpływ proliferacji komórek na obserwowane chemiczne i fenotypowe zmiany, przeprowadzono także analizę spektroskopową faz cyklu komórkowego dla komórek kontrolnych oraz zmienionych w wyniku działania TNF- $\alpha$  oraz cytochalazyny B (CB). Wyniki badań nad stanem zapalnym, uzyskane dla modelu komórkowego, wykorzystano do analizy tego procesu dla tkanek *ex vivo* zastawek aortalnych ze stwierdzoną stenozą aortalną.

Proces stanu zapalnego łączy się z reorganizacją i lokalnym zwiększeniem poziomu zawartości lipidów. Tym samym badania spektroskopowe skomplikowanych układów, jakimi są komórki i tkanki, wymagały uprzedniej charakterystyki widm ramanowskich podstawowych lipidów zawierających różne grupy funkcyjne. Na podstawie profilu widm ramanowskich wskazano pasma charakterystyczne dla każdej z badanych grup lipidów, a także pochodzące od nienasyconych wiązań w łańcuchu węglowodorowym. Dane otrzymane dla kwasów tłuszczowych posłużyły do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej stopnia nienasylenia.

W badanych modelach *in vitro* stanu zapalnego zaobserwowano pojawienie się licznych kropli lipidowych w cytoplazmie, których liczba istotnie statystycznie wzrastała ze wzrostem czasu ekspozycji na czynnik zapalny. Dzięki zastosowaniu profilowania ramanowskiego 3D zbadano ich dystrybucję w komórce, a także określono ich strukturę i charakter chemiczny. Niezależnie od czynnika wzbudzającego proces zapalny, zidentyfikowano obecność dwóch typów kropli lipidowych. Dla modelu z TNF- $\alpha$  pierwsze z nich posiadały w swojej strukturze fosfolipidy oraz nasycone estry cholesterolu,

w odróżnieniu od znacznie liczniejszych, drugiego typu z lipidami o wysokim stopniu nienasylenia i większej zawartości cholesterolu. Skład lipidów w modelu stanu zapalnego indukowanym LPS znacząco się różnił, dominowały krople zawierające nasycone estry cholesterolu, podczas gdy znacznie mniej liczną grupę stanowiły krople o nienasyconym charakterze chemicznym. Badane modele komórkowe wykazały, że rozwojowi stanu zapalnego komórek śródbłonna, potwierdzonemu zwiększoną ekspresją białka ICAM-1 na obrazach z barwień immunohistochemicznych, towarzyszy znaczna zmiana lokalnego składu chemicznego komórki objawiająca się pojawieniem kropli lipidowych o nienasyconym i nasyconym charakterze chemicznym.

Dla linii EA.hy926 komórek śródbłonna określono zmiany chemiczne towarzyszące wczesnej apoptozie wewnątrz głównych struktur komórkowych tj. jąder, jądra komórkowego, cytoplazmy oraz siateczki śródplazmatycznej. Dla obu badanych czynników, FasL i CHX, uzyskane wyniki wykazały spadek ilości białek we wszystkich wspomnianych elementach morfotycznych komórki z jednoczesnym istotnym statystycznie wzrostem zawartości DNA/RNA w jądrze komórkowym i jąderkach. Zmiany chemiczne obserwowane dla poszczególnych organelli są również odzwierciedlone w uśrednionych widmach ramanowskich dla całych komórek, jednak w tym podejściu ginie informacja o lokalizacji tych zmian, co pokazuje istotną korzyść wysokorozdzielczych przestrzennie pomiarów w badaniach mechanizmów molekularnych zmian patologicznych w komórkach. Obserwacje spektroskopowe zostały uzupełnione o obrazy mikroskopowe, umożliwiające śledzenie zmian morfologicznych. Wyniki obu eksperymentów wskazują na cechy charakterystyczne wczesnej apoptozy, niezależne od szlaku jej wywołania.

Badania nad cyklem komórkowym pokazały, że profil spektralny komórek śródbłonna w różnych fazach cyklu komórkowego jest inny, co pozwala na ich rozdział na podstawie widm ramanowskich z zastosowaniem metod chemometrycznych. Różnice widm ramanowskich komórek w różnych fazach cyklu komórkowego są na tyle znaczące, iż wpływają na rozdział komórek kontrolnych od komórek w stanie zapalnym, uniemożliwiając ich jednoznaczną klasyfikację na komórki zdrowe/chore. Ponadto wykazano, iż konfluencja komórek śródbłonna ma istotny wpływ na profil widm ramanowskich i w konsekwencji na możliwość chemometrycznego rozdzielenia komórek z różnych faz cyklu komórkowego na podstawie ich widm ramanowskich. Dla optymalnej konfluencji (70-80%) najbardziej istotne różnice w widmach zaobserwowano w zakresie spektralnym odpowiadającym drganiom białek i lipidów, natomiast widma ramanowskie

komórek hodowanych w dużej konfluencji (100%) wykazują jedynie subtelne różnice w tym zakresie spektralnym. Wynik ten sugerować może podobieństwo składu chemicznego oraz fenotypu komórek w monowarstwie.

Rezultaty uzyskane dla modelu stanu zapalnego oraz bazę widm ramanowskich lipidów wykorzystano do analizy tkanek *ex vivo* zastawek stenotycznych, w których proces zapalenia występuje jako pierwszy objaw choroby prowadzącej do zwapnienia tkanki. W tym badaniu stwierdzono obecność lipidów: estrów cholesterolu i wolnego cholesterolu w miejscach tworzenia się ziaren soli wapnia, co zgadza się z wynikami otrzymanymi dla linii komórkowych i potwierdza zasadność prowadzonych badań *in vitro*.

Otrzymane rezultaty niewątpliwie poszerzają wiedzę na temat mechanizmów rozwoju patologii śródbłonna i mogą być użyteczne w rozwijaniu metod diagnostyki spektroskopowej śródbłonna naczyniowego.