



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Chemii

Spektroskopia oscylacyjna w farmakologii śródbłónka

Katarzyna Majzner

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Promotorzy: Prof. dr hab. Małgorzata Barańska

Prof. dr hab. n.med. Stefan Chłopicki

Kraków 2015



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu pn. Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007-2013.



Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny”

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk
ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków

tel. 12 63 95 100
fax. 12 425 19 23
www.ik-pan.krakow.pl
e-mail: ncmolmed@cyf-kr.edu.pl

Projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego



Autorka uzyskała środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej z **Narodowego Centrum Nauki** w ramach finansowania stypendium doktorskiego na podstawie decyzji numer DEC- 2014/12/T/ST4/00686.



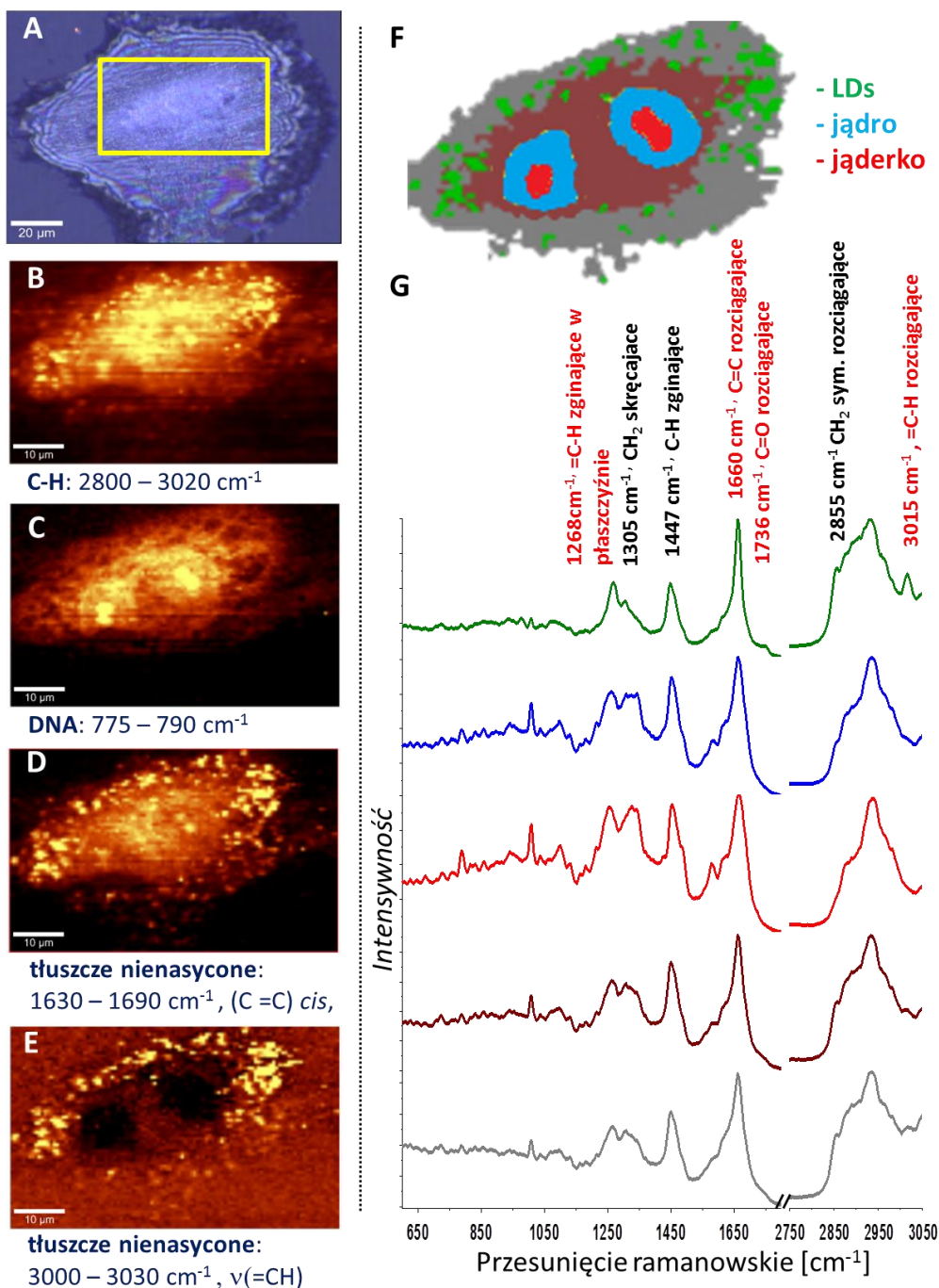
NARODOWE CENTRUM NAUKI

W oparciu o widmo ramanowskie, które jest unikatowym spektroskopowym identyfikatorem badanej substancji chemicznej oraz korzystając z wielowymiarowych metod statystycznych i chemometrii możliwe jest badanie zmian biochemicznych wywołanych stymulacją farmakologiczną w pojedynczych komórkach w warunkach *in vitro*. Mapowanie ramanowskie pojedynczej komórki pozwala na badanie różnych procesów komórkowych oraz monitorowanie interakcji komórka-lek.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie innowacyjnej metodologii wykorzystującej mikroskopię ramanowską do oceny wewnątrzkomórkowych zmian biochemicznych w pojedynczej komórce śródbłonka zachodzących w wyniku stymulacji farmakologicznej. Obrazowanie ramanowskie, ze względu na możliwość jednoczesnej identyfikacji oraz badania przestrzennej dystrybucji wszystkich składników biochemicznych w próbce, zapewniając wysoki poziom selektywności i rozdzielczości, jawi się jako potężne narzędzie w badaniach nad rolą śródbłonka w układzie sercowo-naczyniowym. Zważywszy, że śródbłonek odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu homeostazy, a jego dysfunkcja prowadzi do wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, poznanie mechanizmów odpowiedzi śródbłonka na stymulację może mieć kluczowe znaczenie diagnostyczne i przyczynić się do lepszego poznania fizjologii, patologii i farmakologii śródbłonka.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej zbadano: 1/ tworzenie ciałek lipidowych wywołanych stymulacją kwasem arachidonowym (ang. *arachidonic acid*, AA); 2/ wpływ antracyklin (doksorubicyny (DOX), daunorubicyny (DNR), epidoksorubicyny (EDOX), epidaunorubicyny (EDNR)) na komórki śródbłonka; 3/ działanie stresu oksydacyjnego wywołanego w komórkach śródbłonka inkubowanych w wysokim stężeniu glukozy. Wszystkie trzy wątki tej pracy doktorskiej łączy stres siateczki śródplazmatycznej, której aktywacja wywołuje wyraźne zmiany biochemiczne – m.in. nasiloną biosyntezę lipidów.

Krople lipidowe (ang. *lipid droplets*, LDs), czasem określane są w literaturze jako ciała lipidowe, są organellami występującymi w neutrofilach, eozynofilach lub komórkach nowotworowych, jednak ich obecność i działanie w śródbłonku w dużej mierze wciąż pozostają niezbadane. W pracy badano powstawanie LDs w ludzkich komórkach śródbłonka w wyniku inkubacji z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi. W tym celu wykorzystano konfokalną spektroskopię ramanowską do badania LDs formowanych w warunkach *in vitro* w pojedynczej komórce śródbłonka (rycina 1).



Rycina 1. Lewy panel (A-E): fotografia mikroskopowa mapowanego obszaru komórki HAoEC ($65 \times 40 \mu\text{m}^2$, 108 x 66 punktów) inkubowanej 24h z AANA ($25 \mu\text{M}$) oraz mapy integracyjne wybranych pasm markerowych: 2800-3020 cm^{-1} , 775-790 cm^{-1} , 1630-1690 cm^{-1} i 3000-3030 cm^{-1} . Prawy panel (F-G): wyniki analizy skupień metodą KMC – mapa dystrybucji klas (F) wraz z widmami średnimi skupień (G). Intensywność ramanowska dla zakresu daktyloskopowego ($600\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$) została powiększona 3-3,5 razy w stosunku do intensywności pasm w zakresie 2800-3200 cm^{-1} dla podkreślenia różnic spektralnych pomiędzy kolejnymi klasami [Majzner et al., Analytical Chemistry, 2014, 86:6666–6674].

Spektroskopia ramanowska wykorzystana została również do monitorowania zmian zachodzących w wyniku stymulacji komórek śródbłonna za pomocą kwasu

arachidonowego (AA), w obecności i bez 1-metylonikotynamidu (MNA). Innym wielonienasyconym kwasem tłuszczowym wykorzystanym w niniejszej pracy do badania zdolności komórek śródbłonna do tworzenia LDs był kwas eikozapentaenowy (ang. *eicosapentaenoic acid*, EPA). Jako metodę referencyjną wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną i barwienia z użyciem Czerwieni Nilu. Uzyskane za pomocą cytometrii obrazowej wyniki potwierdzają wnioski z badań ramanowskich, że komórki śródbłonna stymulowane nienasyconymi kwasami tłuszczowymi mogą tworzyć LDs wewnątrz cytoplazmy.

W przypadku badań nad wpływem stresu oksydacyjnego na komórki śródbłonna wykazano, że wysokie stężenie glukozy (25 mM) powoduje zwiększoną produkcję tłuszczu nienasyconych w okolicy jądra komórkowego, co może być związane ze zwiększoną aktywnością siateczki śródplazmatycznej.

Antracykliny, takie jak dokсорubicyna (DOX) czy daunorubicyna (DNR) są cytostatykami, które ze względu na ich szerokie spektrum działania przeciwnowotworowego są szeroko stosowane w leczeniu wielu chorób nowotworowych. Ich funkcja jest związana z hamowaniem topoizomerazy, kluczowego dla DNA enzymu, który uniemożliwia replikację DNA i prowadzi do śmierci komórki. Antracykliny wykazują też silną kardiotoxycyzość, która może być związana z uszkodzeniem komórek śródbłonna. Nowe pochodne antracyklin (np. morfolinowe i piperidynowe) mają porównywalne lub nawet silniejsze działanie antyproliferacyjne niż antybiotyki macierzyste (DOX, DNR). Dodatkowo, toksycyzość nowych analogów dla układu sercowo-naczyniowego jest znacznie niższa niż w przypadku leków macierzystych.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań nad wpływem antracyklin na komórki śródbłonna (linii EA.hy926) wykazały zróżnicowaną ich akumulację w jądrze komórkowym. Widma ramanowskie standardów badanych antracyklin charakteryzują się podniesieniem tła w zakresie spektralnym wysokich liczb falowych. Zakres ten pokrywa się z maksimum fluorescencji tych związków. Zjawisko to obserwowano również w widmie ramanowskim dla komórek stymulowanych antracyklinami, co sprawia, że zakres fluorescencji antracyklin wydaje się być dobrym markerem obecności antracyklin w jądrze. Różnorodność w akumulacji DOX i DNR sugeruje wyraźną różnicę pomiędzy genotoksycyzością tych antracyklin. Przedstawione wyniki badań, które z pewnością będą rozwijane, mają na celu przyczynienie się do lepszego poznania cytotoxycyznego efektu popularnych w onkologii cytostatyków

antracyklinowych na śródbłonek oraz dostarczyć nowej wiedzy m. in. na temat zmian biochemicznych zachodzących w śródbłonku na poziomie subkomórkowym.

W ramach rozprawy doktorskiej nie tylko opracowano unikatową w badaniach farmakologicznych metodykę mapowania ramanowskiego pojedynczych komórek śródbłonka, ale również opisano zmiany biochemiczne zachodzące na poziomie subkomórkowym w komórkach śródbłonka wskutek stymulacji farmakologicznej za pomocą nienasyconych kwasów tłuszczowych, wysokiego stężenie glukozy oraz antracyklin.